50376
1999
435

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

U.F.R. de Biologie

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE

présentée par

Jean Charles LAMBERT

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE

RECHERCHE DE DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES SUSCEPTIBLES DE MODULER L'IMPACT DE L'APOLIPOPROTÉINE E DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

Composition du Jury :

Madame le Professeur Geneviève Spik :	Présidente du jury
Monsieur le Professeur Alexis Brice :	Rapporteur
Monsieur le Professeur Charles Duyckaerts :	Rapporteur
Monsieur le Docteur Jordi Pérez-Tur :	Examinateur
Madame le Docteur Marie-Christine Chartier-Harlin :	Directrice de thèse
Monsieur le Professeur Philippe Amouyel :	Directeur du laboratoire

Date de soutenance : le 15 Novembre 1999.

A mes parents

A ma Sœur

A Marc

Ce travail a été réalisé dans l'unité d'Epidémiologie des maladies chroniques :

Impact des interactions Gène Environnement sur la santé des Populations

Unité INSERM 508, Institut Pasteur de Lille,

Dirigée par le Professeur Philippe Amouyel

A Monsieur le Professeur Philippe Amouyel

Je te remercie du privilège de m'avoir accueilli au sein de ton équipe si dynamique. Ton intérêt, tes compétences scientifiques et la confiance que tu sais instaurer, m'ont beaucoup aidé pour la réalisation de ce travail. De plus, malgré tes multiples engagements, tu as pu être disponible et m'encourager durant les périodes parfois difficiles. Que cette thèse soit l'expression de ma profonde reconnaissance et de toute mon estime.

A Madame Le Docteur Marie-Christine Chartier-Harlin

Il est très difficile pour moi de trouver les mots adéquats pour te montrer tout le respect et le bonheur que j'ai eu à travailler avec toi durant ces 5 dernières années. Ta gentillesse, ton enthousiasme et ton intuition m'ont sans cesse motivé dans ce travail. Au delà du travail de laboratoire, j'ai compris grâce à toi le sens de l'intégrité et de l'éthique scientifique. Pour toutes ces raisons et toutes celles que je n'exprime pas, trouve ici le témoignage d'un profond respect et de ma grande admiration.

A Monsieur Le Professeur Alexis Brice

Vos compétences scientifiques dans le domaine de la génétique de la maladie d'Alzheimer font de votre avis et de vos conseils un apport d'une valeur inestimable pour ce travail. Votre venue en tant que rapporteur m'honore particulièrement.

A Monsieur le Professeur Charles Duyckaerts

Je suis très heureux que vous ayez accepté d'être rapporteur de cette thèse. Votre jugement est pour moi très important. Votre présence m'honore au plus haut point.

A Monsieur le Docteur Jordi Pérez-Tur

Je ne saurais jamais trop te remercier de l'intérêt et de la patience dont tu as fait preuve avec moi. Ta disponibilité, ta gentillesse, tes conseils et ta passion m'ont toujours été d'une grande aide. C 'est avec un réel plaisir que je te compte aujourd'hui parmi les membres de mon jury.

A Madame le Professeur Geneviève Spik

Je suis très honoré que vous ayez accepté de présider ce jury. Recevez ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier :

- Aline Meirhaeghe, à la fois pour tous les très bons moments et ceux un peu moins faciles que nous avons partagés durant notre thèse.

- Thierry Brousseau et Nicole Helbecque pour leurs aides et discussions.

- Valérie Codron, Louisa Goumidi, Xavier Hermant et Vincent Mouroux pour le travail réalisé ensemble et tous ces bons moments partagés.

- Fabienne Wavrant-De Wrièze pour notre travail en commun sur le LRP.

- Chantal Stéclebout pour sa disponibilité.

- Dominique Cottel, Michèle Montaye, Nadine Marécaux, Jean Dallongeville, Joseph-Henri Parra, Stéphanette Beauchant, Brigitte Lemaire et Catherine Graux pour leur gentillesse.

- Nathalie Fievet et Laurence Poisonnier pour les très nombreux séquençages et moments partagés.

- Les stagiaires qui ont travaillé avec moi : Véronique, Julien, Sandrine, Fanny, Perrine et Emilie.

- Monsieur le Docteur André Delacourte, pour m'avoir permis de réaliser mon stage de DEA au sein de l'unité INSERM 422 et de continuer à collaborer avec son équipe.

- Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain, pour sa gentillesse.

- Marie-Laure Caillet-Boudin pour le "bonheur" de la culture cellulaire.

- Luc buée pour ses compétences et son amitié.

- Valérie Buée-Scherrer pour son amitié et sa gentillesse.

- Toutes les personnes que j'ai rencontrées à l'unité INSERM 422 et avec qui j'ai passé de si bons moments :Thierry Buissière, Valérie Dimster, Marie-Joelle Dupire, Stéphanie

Ferriera, Didier Lefranc, Christelle Maillot, Bruno Permanne, Vincent Prévost, Pierre Eric Sautière, Nicolas Sergeant.

- Madame Le professeur Florence Pasquier pour sa disponibilité et la nécessaire interface entre recherche et clinique.

- Monsieur le Docteur Bernard Frigard, pour sa promptitude, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes avec qui j'ai évolué au sein de l'Institut Pasteur de Lille et plus particulièrement :

- Roméo Ceccheli, Marie-Pierre Dehouck et Hélène Duez, pour leur sympathie.

- Eric Baugé, Giula Chinetti, Philippe Delerive et Inès Pineda-Torra pour leurs aides si souvent demandées et leur patience.

Je remercie également Sébastien et Sandrine Leroy, Eric Gandouin et Christelle Kula, Cécile Bultez, Olivier Dournon, Olivier et Stéphanie Roche pour leur Amitié qui ne s'est jamais démentie.

Enfin, je ne peux conclure ces remerciements sans une pensée affectueuse à ma famille. Il ne sert à rien de trop en dire, car je sais tout ce que je vous dois et peu de mots sont assez forts pour exprimer ma reconnaissance et mon amour.

Ce travail a donné lieu aux publications, brevets et communications suivantes :

Liste des publications:

96.1 Pérez-Tur, J., Wavrant-de Vrièze, F., **Lambert, J.-C.**, Chartier-Harlin, M.-C. and the Alzheimer's study group. The intronic polymorphism in the presenilin-1 gene does not affect late-onset Alzheimer's disease in a french population. *Lancet*, 1996, 347, 1560-1561.

96.2 **Lambert, J.-C.**, Pérez-Tur, J., Dupire, M-J., Delacourte, A., Frigard, B. and Chartier, Harlin, M.-C. Analysis of the APOE alleles impact in Down's syndrome. *Neurosci. Lett.*, 1996, 220, 57-60.

97.1 Wavrant-De Wrièze, F., Pérez-Tur, J., **Lambert, J.-C.**, Frigard, B., Pasquier, F., Delacourte, A., Amouyel, P., Hardy, J. And Chartier-Harlin, M.-C.. Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 1997, 227, 68-70.

97.2 **Lambert, J.-C., Pérez-Tur, J., Dupire, M.-J., Galasko, D., Mann, D., Amouyel, P., Hardy, J., Delacourte, A. And Chartier-Harlin, M.-C. Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 1997, 6, 2151-2154.

98.1 **Lambert, J.-C., Pasquier, F., Cottel, D., Frigard, B., Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M.-C. A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 1998, 7, 533-540.

98.2 **Lambert, J.-C., Wavrant- De vrièze, F., Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M-C. Evidence of a genetic association at the LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Lancet*, 351, 1998, 1787-1788.

98.3 **Lambert, J-C., Berr, C., Pasquier, F., Delacourte, A., Frigard, B., Cottel, D., Pérez-Tur, J., Mouroux, V., Mohr, Michel, Cécyre, D., Galasko, D., Lendon, C., Poirier, J., Hardy, J., Mann, D., Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M.-C. Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared to -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's Disease. *Hum. Mol. Genet.*, 1998, 7, 1511-1516.

99.1 Brique, S., Destée, A., **Lambert, J.-C.**, Mouroux, V., Delacourte, A., Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M.-C. A new GTP-cyclohydrolase I mutation in an unusual Dopa-Responsive Dystonia's familial form. *Neuroreport,* 1999, 10, 487-91.

99.2 Wavrant-DeVrièze, 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, JC., Carty, S., Cottel, D., Tunstall, M., Lovestone, S., Petersen, RP., Chartier-Harlin, M.-C., Goate, A., Owen, MJ., Williams, J. and Hardy, J. No association between the Alpha-2 macroglobulin I1000V polymorphism and Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.*, 1999, 262, 137-139.

* contributed equally to this work

99.3 Sato, N., Hori, O, Yamaguchi, A., **Lambert, J.-C.**, Chartier-Harlin, M.-C., Robinson , P.A., Delacourte, A., Schmidt, A.M., Furuyama, T, Imaizumi, K, Tohyama, M and Takagi, T. A novel presenilin-2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue. *J. Neurochem.*, 1999, 72, 2498-2505.

99.4 **Lambert, J.-C., Chartier-Harlin, M.-C., Cottel, D., Richard, F., Neuman, E., Guez, D., Legrain, S., Berr, C., Amouyel, P. and Helbecque, N. Is the LDL receptor-related protein involved in Alzheimer's disease? *Neurogenetics*, 2, 109-113.

99.5 Wavrant De vrièze, F., **Lambert, J.-C., Chartier-Harlin, M.-C., Stas, L., Crook, R., Cottel, D., Pasquier, F., Frigard, B., Lambrechts, M., Thiry, E., Amouyel, P., Van Leuven, F., Perez-Tur, J. and Hardy J. Association between genetic variability in the open reading frame of the LRP gene and the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Hum. Genet.*, 104, 432-434.

99.6 Rudrasingham, V.*, Wavrant-De vrièze, F.*, **Lambert, J.-C.*, Chakraverty, S.*, Kehoe, P., Crook, R., Amouyel, P., Wu, W., Rice, F., Perez-Tur, J., Frigard, B., Morris, J.C., Carty, S., Petersen, R., Cottel, D., Tunstall, N., Loverstone, S., Chartier-Harlin, M.-C., Goate, A., Hardy, J., Owen, MJ. and Williams, J. Alpha-2 macroglobulin and Alzheimer's disease: association or linkage ? *Nat. Genet.*, 22, 17-19.
* contributed equally to this work

****Lambert, J.-C.**, Brouseau, T., Defossé, V., Evans, A., Arvelier, D., Ruidavets, J.-B., Haas, B., Cambou, J-P., Luc, G., Ducimetière P., Cambien, F, Chartier-Harlin, M.-C. and Amouyel, P. Independent assocaition of an APOE gene promoter polymoprhism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations. The ECTIM study. soumis à *Hum. Mol. Genet.*

****Lambert' J.-C.**, Pérez-Tur, J., Hardy, J., Delacourte, A., Amouyel, P and Chartier-Harlin, M.-C. Semi-quantitative calculation of *APOE* allelic ratio in brain tissues. En préparation.

****Lambert, J.-C.**, Mann, D., Iwatsubo, T., Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M.-C. The Th1/E47cs polymoprhism of the APOE promoter favors Ab42(43) deposition. En préparation.

** publication présentée dans cette thèse.

Brevets

n°FR97/08283 "Méthode de semi-quantification des allèles"
n°FR97/08284 "Procédé de diagnostic de la maladie d'Alzheimer par biologie moléculaire"

Communications orales

97.1 **Lambert, J.-C.**, Pérez-Tur, J., Dupire, M-J., Galasko, D., Mann, D., Amouyel, P., Hardy, J., Delacourte, A. and Chartier-Harlin, M.-C. Expression différentielle de l'allèle ε4 de l'apolipoproteine E dans la maladie d'Alzheimer. IVème réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndrômes apparentés, 2-4 Octobre 1997, Montpellier (France).

98.1 Amouyel, P., Richard, F., **Lambert, J.-C.**, Chartier-Harlin, M.-C. and Helbecque, N.

Apolipoprotein E, vascular factors and Alzheimer's disease. 6th international conference on Alzheimer's disease and related disorders, 18-23 Juillet 1998, Amsterdam (Netherlands).

98.2 Chartier-Harlin, M.-C., **Lambert, J.-C.**, Wavrant-De Wrièze, F., Helbecque, N., Amouyel, P. Genetic susceptibility factors and Alzheimer's disease. 6th international conference on Alzheimer's disease and related disorders, 18-23 Juillet 1998, Amsterdam (Neetherlands).

99.1 Chartier-Harlin, M.-C., **Lambert, J.-C.** and Amouyel, P. Mutations du promoteur du gène de l'APOE et maladie d'Alzheimer. Vème réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndrômes apparentés, 30 septembre, 1-2 Octobre 1999, Caen (France).

99.2 Goumidi, L., **Lambert, J.-C.**, Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M.-C. TGF-b1, Déterminant génétique de la maladie d'Alzheimer ? Vème réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndrômes apparentés, 30 septembre, 1-2 Octobre 1999, Caen (France).

Prix

Prix Pierre Warot; VIth Lille Neurological workshop

1er prix de la communication orale . 3ème journée des jeunes chercheurs, Institut Pasteur de Lille.

TABLE DES MATIERES

GENERALITES..... 20

1. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer.....20

1.1. Introduction.....20
1.2. Prévalence et incidence de la maladie d'Alzheimer.....20
1.3. Maladie d'Alzheimer, pathologie environnementale ou génétique ?.....21
1.3.1. Antécédents familiaux de démence.....21
1.3.2. Etudes de populations de jumeaux atteints de la maladie d'Alzheimer.....22

2. Manifestations cliniques et diagnostic de la maladie d'Alzheimer. 23

2.1. Perturbations des fonctions cognitives.....23
2.2. Perturbations de la vie affective et comportementale.....24
2.3. Diagnostic.....24
2.3.1. Evaluation neuropsychologique.....25
2.3.2. Diagnostic différentiel.....26
2.3.3.1. Les états dépressifs.....26
2.3.3.2. Les démences métaboliques.....26
2.3.3.3. Les démences symptomatiques.....26
2.3.3.4. les démences dégénératives.....27
2.3.3. Diagnostic de certitude.....28
2.3.4. Autres profils neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.....28

3. Dégénérescence neurofibrillaire.....32

3.1. Caractéristiques de la dégénérescence neurofibrillaire.....32
3.1.1. Distribution topographique.....32
3.1.2. Evolution de la dégénérescence neurofibrillaire.....33
3.2. Le gène des protéines Tau.....33
3.2.1. Structure du gène et épissages alternatifs.....33
3.2.2. Caractéristiques structurales des protéines Tau.....34
3.2.3. Modifications post-traductionnelles.....34

3.2.4. Fonctions des protéines Tau..... 35
3.2.5. Protéines Tau et maladie d'Alzheimer..... 36
3.3. Vulnérabilité neuronale.....37

4. Dépôts de substance amyloïde..... 38

4.1 Caractéristiques des dépôts de substance amyloïde.....38
4.1.1. Structure et composition..... 38
4.1.2. Distribution topographique..... 38
4.1.3. Evolution des dépôts amyloïdes.....39
4.2. Le gène de l'APP.....40
4.2.1. Structure et épissage alternatif.....40
4.2.2. Expression des différents ARNm de l'APP.....41
4.2.3. Modifications post-traductionnelles.....42
4.3. Métabolisme de l'APP.....42
4.3.1. La voie non amyloïdogénique.....42
4.3.2. La voie amyloïdogénique.....43
4.3.3. Hétérogénéité N- et C-terminal du peptide Aβ.....44
4.3.4. Régulation du métabolisme de l'APP.....45
4.3.4.1. Action des neurotransmetteurs.....45
4.3.4.2. Régulation par les œstrogènes.....46
4.3.4.3. Régulations par les stérols.....46
4.3.4.4. Régulation en réponse à un stress..... 47
4.4. Fonctions biologiques de l'APP et de ces métabolites.....47
4.4.1. Les formes membranaires..... 48
4.4.2. Les formes APPs..... 48
4.4.3. Le peptide Aβ.....49
4.5. Neurotoxicité des métabolites de l'APP.....49
4.5.1. Neurotoxicité du peptide amyloïde..... 50
4.5.2. Le peptide APPs-β..... 51
4.5.3. Implication pour la maladie d'Alzheimer.....52
4.5.4. Validité de l'hypothèse amyloïde..... 54

5. Génétique des formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer..... 57

5.1. Introduction.....57

5.2. Mutations du gène de l'APP.....58
5.2.1. Description des mutations du gène de l'APP..... 58
5.2.2. Conséquences des mutations de l'APP sur le processus pathologique..... 59
5.3. Le gène de la préséniline 1..... 62
5.3.1. Structure et fonctions du gène PS1..... 63
5.3.1.1. La voie de signalisation Notch-dépendante..... 63
5.3.1.2. Interaction avec la famille des protéines Armadillo..... 64
5.3.2. Mutations du gène PS1.....65
5.3.3. Impacts des mutations sur le développement de la pathologie.....66
5.4. Le gène de la préséniline 2..... 67
5.4.1. Fonction de la protéine PS2..... 67
5.4.2. Mutations du gène PS2..... 68
5.4.3. Impact des mutations sur le développement de la pathologie.....69
5.5. Conclusion..... 70

6. Impact du gène de l'apolipoprotéine E sur la maladie d'Alzheimer.....71

6.1. L'approche gène candidat.....71
6.1.1. Principe..... 71
6.1.2. Biais et limites de cette approche.....72
6.2. Choix du gène de l'APOE..... 73
6.3. Le gène de l'APOE.....74
6.3.1. Structure et expression du gène..... 74
6.3.2. Structure protéique.....75
6.4. Fonction de l'APOE..... 76
6.4.1. Métabolisme du cholestérol..... 76
6.4.2. APOE et système nerveux central.....77
6.4.2.1. Maturation et maintenance du système nerveux central.....77
6.4.2.2. APOE et lésion du système nerveux central..... 78
6.5. Variants de l'APOE.....79
6.5.1. Polymorphismes et mutations connus.....79

6.5.2. Impact des allèles majeurs du gène de l'*APOE* sur le métabolisme du cholestérol..... 80
6.6. APOE et maladie d'Alzheimer..... 82
6.6.1. Impact des allèles de l'*APOE* sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer..... 82
6.6.2. Corrélations entre allèle ε4 et lésions neuropathologiques..... 84
6.6.3. Facteurs modulant l'impact du gène de l'*APOE*..... 85
6.6.3.1. Influence de l'âge sur le risque associé à l'allèle ε4..... 85
6.6.3.2. Influence du sexe sur le risque associé à l'allèle ε4..... 85
6.6.3.3. Influence de l'ethnie sur le risque associé à l'allèle ε4..... 86
6.6.3.4. Influence de quelques facteurs environnementaux..... 88
6.6.4. Spécificité de l'association de l'allèle ε4 avec la maladie d'Alzheimer ?..... 88
6.6.4.1. Trisomie 21..... 89
6.6.4.2. *APOE* et pathologies neurodégénératives..... 90
6.7. Hypothèses d'action de l'APOE sur le développement de la pathologie..... 92
6.7.1. Formation des dépôts amyloïdes..... 92
6.7.1.1. APOE, cofacteur de l'amyloïdogénèse ?..... 92
6.7.1.2. APOE, inhibiteur de l'amyloïdogénèse ?..... 93
6.7.1.3. Vers une troisième voie ?..... 94
6.7.2. Le métabolisme des lipides : le lien manquant ?..... 95
6.7.2.1. Données épidémiologiques..... 95
6.7.2.2. Modification du métabolisme de l'APP..... 97
6.7.2.3. Régénération déficiente et atteinte du système cholinergique..... 97
6.7.3. Réponse inflammatoire et stress oxidatif..... 98
6.7.4. Autres hypothèses d'action de l'APOE..... 100
6.7.4.1. Hyperphosphorylation des protéines Tau..... 101
6.7.4.2. Neurotoxicité propre de l'APOE..... 101
6.8. Conclusion..... 101

7. Autres déterminants génétiques de la maladie d'Alzheimer..... 103

7.1. Quelques gènes candidats..... 103
7.1.1. Le gène du complexe majeur d'histocompatibilité de type A..... 103
7.1.2. Le gène du récepteur des lipoprotéines de très faibles densités..... 104
7.1.3. Le gène de la dihydrolipoyl succinyltranférase..... 105
7.1.4. Le gène de l'α1-antichymotrypsine..... 106
7.1.5. Le gène de la butyrylcholinestérase..... 107
7.1.6. Le gène de la préséniline 1..... 107
7.1.7. Autres gènes..... 108
7.2. Chromosome 12 et maladie d'Alzheimer..... 109
7.2.1. Le gène du *LRP*..... 110
7.2.1.1. Structure et fonction du *LRP*..... 110
7.2.1.2. Variants du *LRP* et maladie d'Alzheimer..... 111
7.2.2. Le gène de l'α2-macroglobuline..... 111
7.2.2.1. Structure et fonction de l'*α2M*..... 111
7.2.2.2. Variants de l'*α2M* et maladie d'Alzheimer. 112

TRAVAUX PERSONNELS..... 114

Introduction..... 114

Etude du gène de l'APOE..... 115

Etude de l'expression des allèles de l'*APOE*..... 115

Méthode de calcul simple pour éliminer une interférence entre saturation du signal et PCR quantitative..... 120

Expression différente des allèles de l'*APOE* dans la maladie d'Alzheimer..... 133

Mise en évidence de polymorphismes dans le promoteur du gène de l'*APOE*. Impact de ces mutations sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer..... 137

Un nouveau polymorphisme dans le promoteur de l'APOE associé au risque de développer la maladie d'Alzheimer..... 142

Impact plus prononcé du polymorphisme Th1/E47cs par rapport au polymorphisme -491 AT, sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer et l'expression cérébrale de l'APOE..... 150

Le polymorphisme Th1/E47cs favorise la déposition du peptide $A\beta_{1-42(43)}$..... 156

Association indépendante d'un polymorphisme du promoteur de l'*APOE* avec une augmentation du risque de développer un infarctus du myocarde et une diminution de la concentration en APOE plasmatique..... 168

Discussion et Conclusion.....190

Autres déterminants génétiques..... 195

Impact du gène du *LRP* sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Synthèse des articles suivants :.....195

Preuve d'une association génétique du locus du *LRP* avec les formes sporadiques tardives de la maladie d'Alzheimer.....197

Le *LRP* est il impliqué dans la maladie d'Alzheimer ?.....199

Association d'une variabilité génétique dans la région codante du gène du *LRP* et le risque de développer la maladie d'Alzheimer..... 204

Impact du gène de l'α2-macroglobuline sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Synthèse des articles suivants : 207

Absence d'association du polymorphisme Ile1000Val avec la maladie d'Alzheimer. 209

Gène de l'α2-macroglobuline et maladie d'Alzheimer. 212

CONCLUSION GENERALE.....215

BIBLIOGRAPHIE..... 218

ANNEXES.....263

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a. : acide aminé.

ACT : α1-antichymotrypsine.

AGL : Acide Gras Libre.

APOCII : apolipoprotéine CII.

APOE apolipoprotéine E.

APP : Amyloid Precusor Protein (protéine précuseur de l'amyloïde).

APPs : APP soluble.

ARNm : Acide RiboNucléique messager.

ATP : Adénosine TriPhosphate.

Bche : Butyrylcholinestérase.

CA : Corne d'Ammond.

Da : Dalton.

DLST : dihydrolipoyl succinyl transférase.

DNF : Dégénérescence NeuroFibrillaire.

DSM-III-R : Diagnostic and statistical manual of mental disorders III Revised.

GSK3 : Glycogène Synthase protéine Kinase de type III.

HDL : High Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité).

HLA : complexe majeur d'histocompatibilité de type A.

HNE : 4-hydroxy-2-trans-nonenal.

HNF-5 : Hepatic Nuclear Factor 5 (facteur nucléaire hépatique 5).

IDL : intermediate density lipoprotein (lipoprotéine de densité intermédaire).

IL : InterLeukine.

IRE : Intronic Regulatory Element (élément de régulation intronique).

kb : kilobase.

KGDHC : α-kétoglutarate déshydrogénase.

KPI : Kunitz protease inhibitor (Inhibiteur de protéase de type Kunitz).

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien.

LDL : Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)

LRP : Low density lipoprotein Related Protein.

MAP : Microtubule Associated Protein (protéine associée aux microtubules).

M-CSF : Microglia-Colony Stimulating Factor (facteur de stimulation de colonies de la

microglie).

MMS : Mini Mental State examination.

NF-κB : Nuclear Factor κB (facteur nucléaire κB).

NMDA : N-Méthyl-D-aspartate.

NO : Oxyde Nitrique.

NOS : Nitric Oxide Synthase.

PHF : Paired Helical Filaments (filaments appariés en hélice).

PKC : Protéine Kinase de type C.

PS : Plaque Sénile.

PS : préséniline.

RAGE : receptor for advanced glycation end products (récepteur des produits de glycation mature).

ROS : reactive oxygen species (espèce d'oxygène réactif).

SIDA : Syndrôme d'Immuno Déficience Acquise.

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique.

TGF-β1 : Transforming Growth Factor β1 (facteur de croissance β1).

URE : Upstream Regulatory Element (élément de régulation situé en amont).

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine.

VLDL : Very Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de très faible densité).

Wg : wingless.

α2M : α2-macroglobuline.

GENERALITES

1. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer.

1.1. Introduction.

En 1906, Aloïs Alzheimer, neuropathologiste allemand, décrivit le tableau clinique et anatomopathologique d'une de ses patientes décédée à 56 ans. A l'autopsie, le cerveau de celle-ci était atrophié et l'examen microscopique montrait l'existence au sein du cortex cérébral, de lésions actuellement connues sous le terme de dégénérescence neurofibrillaire (DNF) et de dépôts amyloïdes. D'autres observations de ce type furent ensuite confirmées et en 1911, le nom de maladie d'Alzheimer fut donné à cette affection pour désigner cette démence précoce ou présénile (début de la maladie avant 65 ans). Depuis le début des années 60, le terme de maladie d'Alzheimer est couramment employé pour désigner aussi bien les démences préséniles que séniles (début de la maladie après 65 ans), caractérisées par les deux lésions cérébrales citées ci-dessus.

L'évolution démographique et le vieillissement croissant des populations occidentales devraient faire de la maladie d'Alzheimer un problème majeur de santé publique et de société des années à venir. En effet, aux Etats Unis, le nombre de sujets atteints par cette pathologie est estimé à 4 millions tandis qu'en France les chiffres seraient compris entre 300 et 600 000 cas prévalants, selon les estimations. Ces chiffres devraient doubler d'ici 2020.

1.2. Prévalence et incidence de la maladie d'Alzheimer.

L'étude de la prévalence met en évidence une augmentation importante de celle-ci en fonction de l'âge (Figure 1) (1). Cependant, bien que les résultats obtenus en Europe soient semblables (2), des variations importantes sont observées dans certaines études américaines.

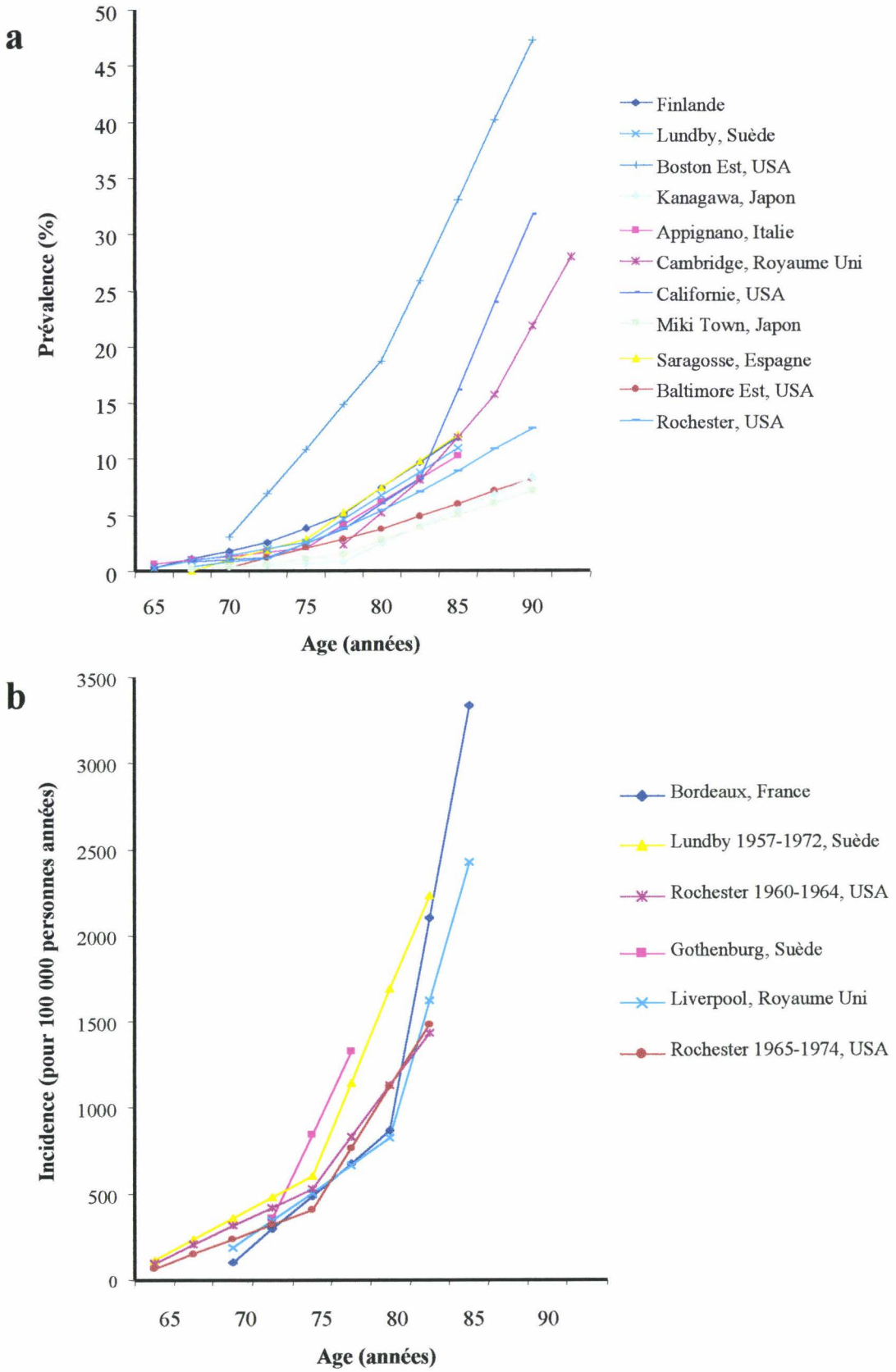


Figure 1 : (a) Prévalence et **(b)** incidence de la maladie d'Alzheimer dans différents pays selon l'âge.

En effet, alors que deux de ces études présentent des données similaires à celles qui peuvent être observées en Europe, deux autres montrent respectivement une prévalence très élevée (Boston-Est) et une prévalence très faible (Baltimore-Est). Enfin, les études japonaises décrivent des taux plus bas que ce qui peut être observé aussi bien en Europe qu'aux Etats Unis. En ce qui concerne l'incidence, les études sont plus homogènes (Figure 1) (3).

Ainsi comme le montrent les courbes de prévalence et d'incidence (Figure 1), l'âge est un facteur prépondérant du risque de développer la maladie d'Alzheimer. En effet, l'accroissement de l'âge est associé à une augmentation exponentielle de la fréquence de la maladie d'Alzheimer, certains travaux suggérant toutefois qu'un plateau puisse être atteint après 85 ans (4,5) .

1.3. Maladie d'Alzheimer, pathologie environnementale ou génétique ?

1.3.1. Antécédents familiaux de démence.

Avec l'âge, les antécédents familiaux sont un des facteurs de risque le plus constamment retrouvé dans les études. Ainsi, existe-t-il des formes familiales de la maladie d'Alzheimer, essentiellement précoces, pour lesquelles la pathologie se transmet selon un mode autosomique dominant, qui pourrait s'expliquer par un gène majeur. Cependant, ces cas ne représentent que 10% de l'ensemble des formes de maladie d'Alzheimer.

Concernant les 90 % restants, il peut exister aussi une agrégation familiale. Ainsi, l'existence d'antécédents familiaux pour ces formes correspondrait-elle à une augmentation de 2 à 5 fois du risque de développer la maladie (3). Cependant pour ces formes essentiellement à début tardif, cette agrégation familiale ne suit, la plupart du temps, aucun des modes de transmission mendélienne classique, suggérant l'intervention de plus d'un gène. Par ailleurs, la

grande majorité des formes tardives ne présentent pas d'antécédents familiaux connus, et on parlera alors de cas sporadiques.

1.3.2. Etudes de populations de jumeaux atteints de la maladie d'Alzheimer.

Plusieurs études ont été réalisées dans des populations de jumeaux d'origine américaine (6,7), suédoise (8), norvégienne (9) ou finlandaise (10). Globalement, toutes ces études montrent que la fréquence de la maladie d'Alzheimer est plus élevée chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes, suggérant donc un rôle de l'hérédité. Cependant, ces même études ont montré que l'âge de début de la maladie pouvait varier de façon importante entre jumeaux monozygotes. De plus, le fait que seul un jumeau d'une même paire monozygote, puisse développer la pathologie (11), suggère que des facteurs environnementaux interviennent aussi dans l'étiologie de la maladie.

Ainsi la maladie d'Alzheimer apparaît-elle comme une pathologie complexe et multifactorielle. La survenue et l'évolution de la maladie d'Alzheimer comme la plupart des maladies neurodégénératives, seront conditionnées par des facteurs de susceptibilité génétique, des facteurs de risque liés à l'environnement et par l'interaction de ces deux types de déterminants.

2. Maladie d'Alzheimer : description clinique et diagnostic.

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative, se manifestant par une détérioration progressive des fonctions cognitives et mnésiques supérieures. La symptomatologie clinique associe des troubles de la mémoire, du langage, du jugement, du comportement et de la personnalité ainsi que des difficultés à effectuer des tâches routinières.

2.1. Perturbation des fonctions cognitives.

Un certain nombre de fonctions cognitives peuvent être atteintes au cours du développement de la maladie d'Alzheimer. Cependant les principaux signes dominant la sémiologie, sont les troubles de la mémoire. En effet, ceux-ci sont constants, nécessaires aux diagnostic et constituent la plupart du temps, la première manifestation clinique de la maladie. Ces troubles sont caractérisés en premier lieu par une altération presque sélective de la mémoire épisodique, correspondant à la mémoire individuelle, biographique. Puis le déficit apparaît au niveau des mémoires sémantiques, soit la mémoire des acquis culturels, et procédurale regroupant les fonctions d'apprentissage et de communication.

Des troubles du langage sont aussi associés à ces troubles mémoriels. Au début de l'affection, il s'agit d'une aphasie amnésique, caractérisée par le manque du mot. Les phrases et périphrases se multiplient. Par ailleurs, il peut être fréquemment observé un rabâchage, un radotage ou encore une logorrhée. Finalement, le patient perd complètement ses capacités d'expression et s'exprime par un marmonnement inintelligible, aboutissant au mutisme. Parallèlement, l'écriture se déstructure laissant le patient agraphique. Ces difficultés d'écriture sont par ailleurs majorées par une apraxie, c'est à dire des troubles gestuels, décrivant une incapacité à adapter et effectuer des gestes volontaires.

Enfin, mis à part des cas exceptionnels de troubles auditifs, c'est essentiellement dans le domaine visuel que les principales perturbations sont observées. Ainsi, une agnosie visuelle, soit une difficulté à reconnaître des objets par leurs formes, peut-elle mener à la non reconnaissance de sa propre image dans le miroir. Par ailleurs, au cours du développement de la maladie, il est fréquent d'observer des perturbations visuo-spatiales : désorientation visuelle, rétrécissement du champ de l'attention, apraxie du regard (incapacité à porter son regard sur une cible visuelle).

2.2. Perturbations de la vie affective et comportementale.

En général, les aspects psychiatriques, affectifs et comportementaux sont discrets au début du processus pathologique. Ainsi, aux stades précoces, les patients sont souvent conscients de leurs troubles, entraînant dépression et anxiété profonde. Il peut apparaître des troubles psychotiques, correspondant à des complexes de persécution ou de préjudice. Enfin les troubles comportementaux sont essentiellement d'ordre moteur : trouble déambulatoire, bruits et mouvements buccaux. Il peut y avoir perturbation de l'alimentation, essentiellement dûe à une perte de l'appétit, une désinhibition sexuelle et une incontinence (urinaire et anale).

2.3. Diagnostic.

En raison de l'hétérogénéité des troubles cliniques de la maladie d'Alzheimer, il est difficile de poser un diagnostic de façon certaine, du vivant du patient. Les critères du DSM-III-R (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) sont habituellement considérés comme nécessaires et suffisants pour le diagnostic de syndrome démentiel (12)(voir annexe). Trois notions sont alors retenues pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer: (i) Une démence,

avec perte sévère des capacités intellectuelles, une altération de la mémoire accompagnée d'une perturbation des fonctions cognitives supérieures ou d'une altération de la personnalité. (ii) Un début insidieux avec aggravation progressive. (iii) L'exclusion de toutes autres causes de démence.

En fait, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est donc établi en fonction de critères de présomption, reposant sur des observations cliniques, paracliniques et l'exclusion d'autres étiologies. En fonction de ces différents critères, la maladie d'Alzheimer est définie alors comme possible ou probable. Seul un examen neuropathologique après décès du patient, permettra de porter un diagnostic de certitude. Ainsi, malgré ces éléments diagnostics pour établir un diagnostic fiable, 10% des démences de type Alzheimer probable seraient mal diagnostiqués.

2.3.1. Evaluation neuropsychologique.

Cette évaluation repose sur plusieurs tests psychométriques, standardisés tels que le MMSE (Mini Mental State Examination) (13), l'échelle de Blessed (14), le GDS (Global Deterioration Scale) (15) (voir annexe). Le plus utilisé reste le MMSE, permettant en peu de temps d'évaluer différents aspects des fonctions cognitives.

L'interprétation de ces tests doit tenir compte du niveau socio-culturel et de l'âge des patients. Par ailleurs, il est à remarquer que certaines affections comme la dépression, sont susceptibles de provoquer une diminution temporaire des fonctions cognitives.

2.3.2. Diagnostic différentiel de la maladie d'Alzheimer.

2.3.3.1. Les états dépressifs.

Chez le sujet âgé, les syndromes dépressifs et anxieux d'une intensité variable peuvent exister sous différentes formes (mélancolie, crise de confiance...). Ils sont difficilement différenciables des états dépressifs accompagnant souvent la maladie d'Alzheimer. Ainsi, seule la connaissance d'antécédents psychiatriques, d'un passé dépressif ou d'événements traumatisants, corrélée à l'efficacité d'un traitement anti-dépresseur, peut-elle permettre de distinguer un état dépressif, de la maladie d'Alzheimer.

2.3.3.2. Les démences métaboliques.

La plupart de ces démences peuvent être exclues par dosages biochimiques. C'est le cas entre autres de certaines avitaminoses pouvant présenter un syndrome démentiel, ou de l'hyperthyroïdie. Les démences iatrogènes dues à un traitement par anticholinergique ou neuroleptique sont rares. Cependant le diagnostic peut être rapidement fait après suspension du traitement incriminé. Enfin, la maladie de Wilson, résultant d'une perturbation du métabolisme du cuivre et induisant une modification de l'activité des ATPases, peut être facilement diagnostiquée en raison de sa survenue précoce et d'une atteinte hépatique caractéristique.

2.3.3.3. Les démences symptomatiques.

Celles-ci peuvent être de plusieurs types. Ainsi l'hydrocéphalie à pression normale

constitue-t-elle la plus fréquente des démences curables. Même si le tableau clinique démentiel peut présenter des similitudes avec la maladie d'Alzheimer, l'efficacité d'une ponction lombaire reste un bon argument diagnostique. Certaines tumeurs cérébrales du corps calleux, peuvent provoquer aussi des troubles de la mémoire; ce type de lésion est facilement dépisté au scanner. Les borrélioses (maladie de Lyme) et le SIDA peuvent présenter un syndrome démentiel au cours de leur évolution; les dépistages sérologiques et une ponction lombaire permettent de poser le diagnostic. Les autres affections inflammatoires susceptibles de donner lieu à un tableau démentiel telles que la sclérose en plaque, ne s'expriment pas par des troubles évoquant la maladie d'Alzheimer.

2.3.3.4. Les démences dégénératives.

Les démences fronto-temporales. Ce type de démence est caractérisé par une perte neuronale asymétrique au niveau des régions frontales et temporales antérieures. Il peut être discerné deux groupes : (i) la maladie de Pick et (ii) les dégénérescences fronto-temporales non spécifiques.

La maladie de Parkinson et SLA (Sclérose Latérale Amyotrophique). Ces pathologies peuvent s'accompagner de démence. Cependant elles posent moins de problèmes de diagnostic en raison d'éléments sémiologiques évocateurs.

La maladie de Creutzfeldt-Jacob. Au tout début du développement de la maladie, cette démence peut être confondue avec la maladie d'Alzheimer. Cependant son évolution très rapide la distingue par la suite aisément.

Les démences à corps de Lewy. Ces démences sont caractérisées par la coexistence de lésions de type Alzheimer et d'abondants corps de Lewy dans les neurones corticaux, inclusions cytoplasmiques caractéristiques de la maladie de Parkinson. Ces corps de Lewy peuvent d'ailleurs se retrouver en quantité moindre pour d'autres types de démence dont la maladie d'Alzheimer. La démence à corps de Lewy et la maladie d'Alzheimer, présentant de très nombreux points communs aussi bien au niveau clinique qu'histologique, sont parfois difficilement différenciables.

Les démences vasculaires. Ces démences regroupent des pathologies dont la présentation clinique et les mécanismes pathogènes diffèrent. Celles-ci peuvent en effet résulter de lésions du cerveau du type ischémique, hémorragique ou hypoxique dans les suites d'un arrêt cardiaque. En fait, les démences vasculaires sont étroitement liées aux maladies cérébrovasculaires. Certaines formes de démences vasculaires peuvent présenter des déficits neuropsychologiques évocateur d'une maladie d'Alzheimer. De même un certain nombre de patients atteints de maladie d'Alzheimer, présentent une pathologie cérébrovasculaire concomitante. Ainsi, en dépit de l'établissement de critères cliniques développés dans le but de différencier ces deux types de démence (score de Hachinski ou critères du NINDS-AIREN; voir annexe)(16), des études neuropathologiques ont montré que pour un score de Hachinski de l'ordre de 5 ou 6, seules 12% des démences mixtes sont correctement classées, 59% se retrouvant en démence vasculaire et 29% en maladie d'Alzheimer (17).

2.3.3. Diagnostic de certitude.

Ainsi, le diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer ne peut pas être posé du vivant du malade et seul un examen *post-mortem* va permettre de définir avec certitude la

pathologie. Il s'agit alors de mettre en évidence les deux principales lésions cérébrales associées à la maladie d'Alzheimer : la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) et les plaques séniles (PS). Cependant, les caractéristiques anatomiques de la maladie d'Alzheimer ne resposent pas exclusivement sur ces lésions dont la spécificité est en fait faible. Ainsi, même si la quantité de lésions présentes aidera au diagnostic, DNF et/ou PS se rencontrent également dans la trisomie 21 (18), le parkinsonisme post-encéphalitique (19), la démence à corps de Lewy mais aussi chez les sujets âgés (20).

2.3.4. Autres profils neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Atrophie corticale. Le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer présente une atrophie corticale diffuse, très prononcée au niveau des lobes temporaux et pariétaux. On observe alors un élargissement des sillons et un rétrécissement des circonvolutions. Cette observation marque en fait une mort neuronale importante, provoquant une atrophie du parenchyme nerveux. Une réduction de 22 à 26% du nombre des cellules peut être observée (21,22). Par ailleurs, une perte synaptique importante est détectée en immunohistochimie (23,24).

Réaction gliale. Une gliose astrocytaire est observée dans l'ensemble des régions cérébrales (25). Celle-ci est caractérisée par une hypertrophie des astrocytes. Cependant, ce processus est aussi mis en évidence durant le vieillissement normal (26).

Activation de la Microglie. Dans les régions cérébrales atteintes par des DNF et des PS, la microglie présente à la fois une hypertrophie et une hyperplasie, indiquant une corrélation

directe entre les lésions cérébrales de la pathologie et l'activation de la microglie (27). L'activation de la microglie est particulièrement élevée dans les régions corticales présentant de fortes accumulations de plaques séniles et est directement corrélée à la taille de ces plaques (28,29). De plus, L'hyperplasie (une prolifération cellulaire) est caractéristique de la maladie d'Alzheimer et est absente des régions du cerveau sans dépôt amyloïde ou chez les individus non atteints de maladie d'Alzheimer (27,30,31).

Altérations neurochimiques. Les atteintes cérébrales de la maladie d'Alzheimer ont des répercussions sur les concentrations des différents neuromédiateurs.

Le premier système de neurotransmission qui a été montré comme modifié, est le système cholinergique. La dégénérescence du noyau basal de Meynert conduit à la fois à une baisse des concentrations de l'acétylcholine, de la choline estérase (enzyme de synthèse de l'acétylcholine), mais aussi de l'acétylcholine estérase (enzyme de dégradation de l'acétylcholine). La diminution du taux d'acétylcholine a été observée fortement corrélée au degré de démence dans le liquide céphalorachidien (LCR). Ainsi plusieurs travaux supportent l'hypothèse d'un lien entre déficit cholinergique et atteinte cognitive dans la maladie d'Alzheimer (32,33), conduisant à la "théorie cholinergique" de la pathologie.

Le système noradrénergique semble lui aussi atteint, les concentrations en noradrénaline et en adrénaline diminuant dans plusieurs régions sous-corticales (34,35). De même la dopamine voit sa concentration diminuer dans tout le néocortex (36), même si des données plus anciennes n'indiquent aucune modification (37,38).

Quant au système sérotoninergique, celui-ci pourrait être modifié, les taux de sérotonine étant plus faibles que la moyenne, chez les individus atteints de la maladie d'Alzheimer (36,39).

Enfin, les travaux de Olney montre un rôle potentiel des acides aminés (a.a.) excitateurs

dans des pathologies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (40). Les concentrations des a.a. suivants pourrait être augmentées : alanine, méthionine, ornithine, aspartate. Par ailleurs, la quantité de glutamate a été décrite à la fois diminuée (41) ou augmentée selon les études (42,43). Une augmentation potentielle du glutamate supporterait l'hypothèse d'une toxicité éventuelle de ce peptide via son récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate).

3. Dégénérescence neurofibrillaire.

3.1. Caractéristiques de la dégénérescence neurofibrillaire.

3.1.1. Structure et composition.

La dégénérescence neurofibrillaire est une lésion caractérisée par la présence de fibrilles anormales au sein du neurone (Figure 2a). Ces fibrilles correspondent à la formation de paires de filaments appariés en hélice ou PHF (paired helical filaments) (44), présentant un diamètre de 20 nm pour un pas de 80 nm.

Des techniques immunohistochimiques ont permis de montrer que le composant majeur de ces PHF est des protéines du cytosquelette associées aux microtubules, les protéines Tau (45,46). D'autres composants ont été également mis en évidence dans les PHF tels que l'ubiquitine (47), MAP2 (Microtubule Associated Protein)(48), des neurofilaments (49) et l'apolipoprotéine E (50)...

3.1.2. Distribution topographique.

Les régions principalement touchées sont les régions hippocampiques et parahippocampiques, et plus précisément le cortex entorhinal et le subiculum. Les aires néocorticales du lobe temporal présentent également une quantité très importante de DNF tandis que les lobes frontaux et pariétaux sont moins touchés (51).

Au niveau laminaire, les neurones pyramidaux des couches II, III et IV du cortex entorhinal sont essentiellement atteints (Figure 2b)(51). Au niveau des aires associatives néocorticales, les grands neurones pyramidaux des couches (II-III) et (V-VI) sont également

atteints, les couches V-VI étant toutefois systématiquement plus touchées (52-54).

3.1.3. Evolution de la dégénérescence neurofibrillaire.

La DNF suit un schéma évolutif, se répartissant sur 6 stades (55). Durant les premiers stades (I et II), la DNF est localisée au niveau de la région transentorhinale, constituant ce que l'on appelle les "stades transentorhinaux". Puis la formation hippocampique est touchée (stade III et IV), définissant les "stades limbiques". Enfin, les aires associatives sont envahies par le processus neurodégénératif (stades V et VI), correspondant aux "stades isocorticaux".

Par ailleurs, on peut observer également durant le vieillissement non pathologique, la formation de DNF. Celle-ci se limite alors essentiellement aux régions entorhinals et hippocampiques (56).

3.2. Le gène des protéines Tau.

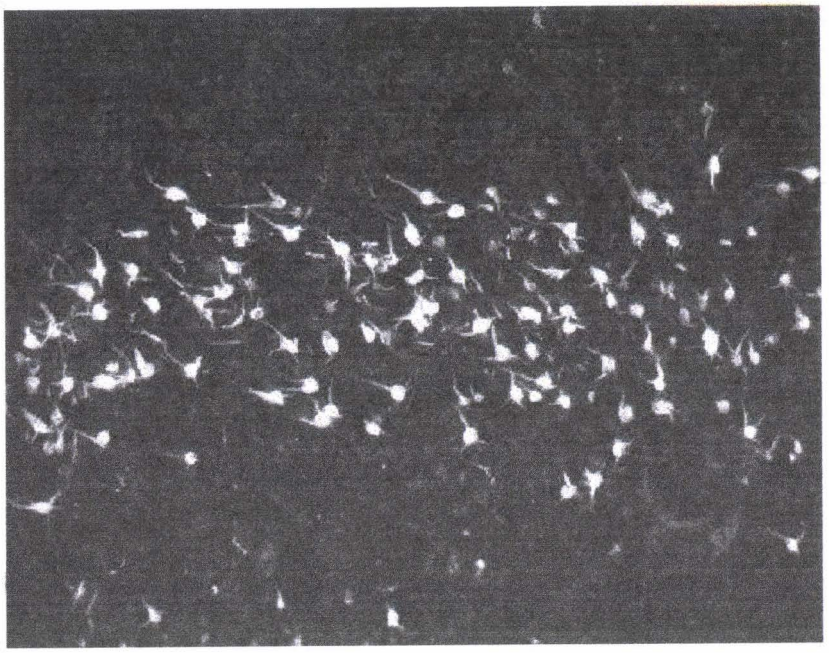
3.2.1. Structure du gène et épissages alternatifs.

Le gène des protéines Tau est situé sur le bras long du chromosome 17 en position q21 et s'étend sur plus de 100 kb (57). Le transcrit de ce gène contient 16 exons, trois d'entre eux n'étant pas présents dans le tissu cérébral humain (exon 4A, 6 et 8). Les exons 6 et 8 n'ont jamais été montrés comme étant traduits chez l'homme, l'exon 8 n'ayant été mis en évidence que chez les bovins. L'exon 4A quant à lui est retrouvé traduit au niveau du système nerveux périphérique donnant une isoforme de 110 KDa, appelée "big Tau" (58,59).

Les exons 2, 3 et 10 subissent un épissage alternatif, spécifique du cerveau adulte (60) aboutissant à l'existence de 6 isoformes possibles (Figure 3) (59,61).

Figure 3 : *Protéine Tau et maladie d'Alzheimer.* (a) Différents épissages alternatifs du gène des protéines Tau. (b) Sites et conséquence de l 'hyperphosphorylation des 6 isoformes des protéines Tau. (c) Profils électrophorétiques des protéines Tau en fonction de la pathologie étudiées. T21, trisomie 21. ALS, sclérose latérale amyotrophique. FLD, dégénérescence du lobe frontal. PSP, paralysie supranucléaire progressive.CBD, démence à corps de Lewy. DM, Dystrophie myotonique. Fron., frontal. Hipp., hippocampe. Temp., temporale.

a



b

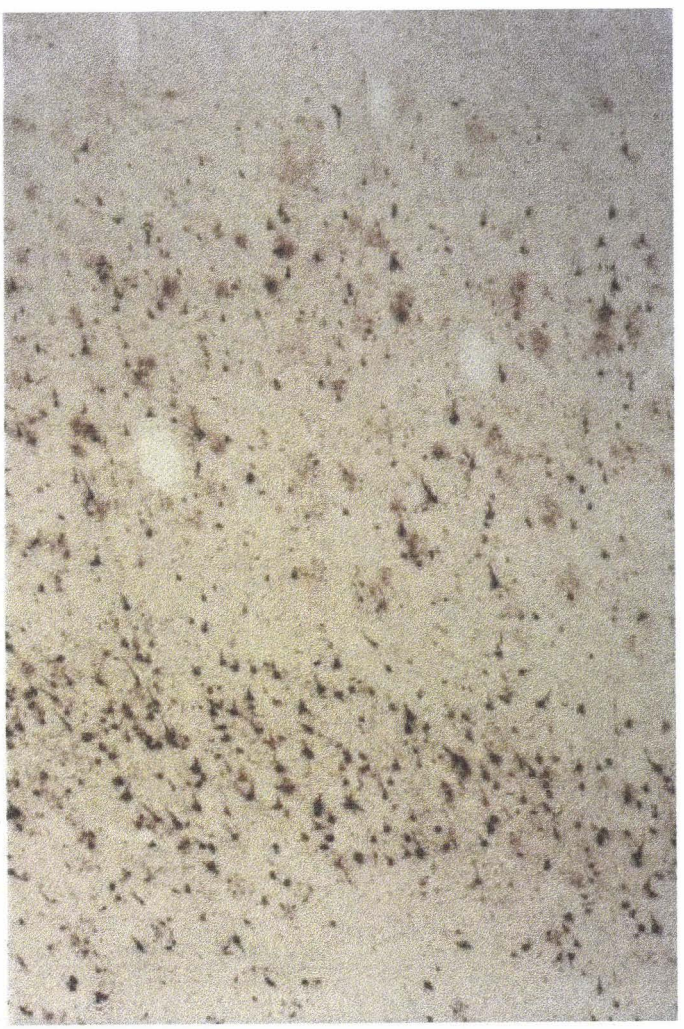
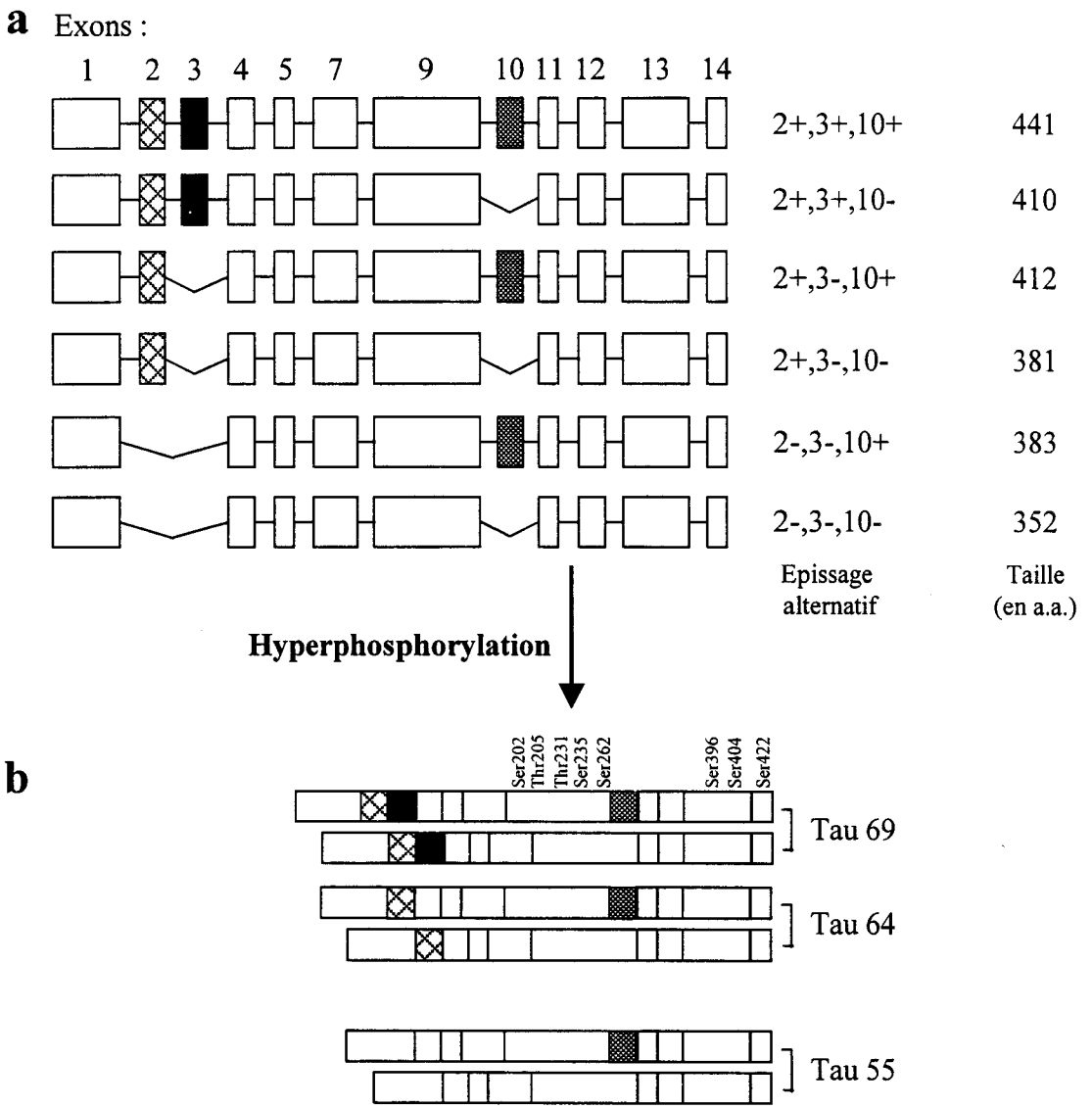


Figure 2 : La dégénérescence neurofibrillaire. **(a)** Mise en évidence de DNF et **(b)** Distribution laminaire de la DNF par immunoréactivité obtenue avec l'anticorps AD2 sur une coupe de cortex temporal (A20) d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.


a
Exons :
1 2 3 4 5 7 9 10 11 12 13 14
2+,3+,10+
441
2+,3+,10-
410
2+,3-,10+
412
2+,3-,10-
381
2-,3-,10+
383
2-,3-,10-
352
Epissage alternatif
Taille (en a.a.)
Hyperphosphorylation
b
Ser202
Thr205
Thr231
Ser235
Ser262
Ser396
Ser404
Ser422
Tau 69
Tau 64
Tau 55
c
AD
Vieillissement
biopsie
T21
ALS
FLD
PSP
CBD
Pick
DM
Fron.
Fron.
Hipp.
Fron.
Fron.
Fron.
Fron.
Fron.
Fron.
Temp.
Fron.

L'expression des protéines Tau est régulée au cours du développement, une isoforme unique étant présente durant la période périnatale. Il s'agit de l'isoforme ne possédant pas les exons 2, 3 et 10 et définie comme l'isoforme fœtale. Les autres isoformes apparaissent au cours du développement (61). Enfin, la distribution des ARNm avec ou sans exon 10 dépend de la population neuronale (59).

3.2.2. Caractéristiques structurales des protéines Tau.

La longueur des différentes isoformes varie de 352 à 441 a.a. pour une masse réelle de 37 à 46 KDa. Une digestion partielle par la chymotrypsine libère deux fragments : un domaine N-terminal (résidus 1 à 197) et un domaine C-terminal (résidus 198 à 441). Le fragment C-terminal correspond à un domaine d'assemblage capable de se lier aux microtubules (62), des séquences répétitives de type Pro-Gly-Gly-Gly. permettant ces liaisons (60,63). La région N-terminale correspond à un domaine interagissant avec les autres éléments du cytosquelette (64,65). La région C-terminale

3.2.3. Modifications post-traductionnelles.

La phosphorylation est la principale modification post-traductionnelle des protéines Tau. En fait, de nombreux sites sont phosphorylés sur les protéines Tau normales (66,67), au niveau des résidus de sérine ou de thréonine suivi généralement, mais pas systématiquement, d'une proline (motif Ser/Thr-Pro).

Par ailleurs, les protéines Tau peuvent présenter un certain nombre d'autres modifications post-traductionnelles telles que des O-glycosylations. Ainsi des sérines et des thréonines susceptibles de subir des phosphorylations, peuvent-elle être aussi O-glycosylées.

Cette observation a conduit à l'hypothèse qu'il pouvait exister une compétition entre ces deux modifications modulant les propriétés biochimiques des protéines Tau (68,69).

3.2.4. Fonctions des protéines Tau.

Les protéines Tau sont considérées comme des facteurs intervenant dans la polymérisation et la stabilisation des microtubules (70). Les protéines Tau font partie de la classe des MAPs, possédant en leur domaine C-terminal des régions intervenant dans la liaison à la tubuline. Les séquences répétées qui s'y trouvent sont alors capables d'induire la polymérisation des microtubules (71,72). La capacité de ces protéines Tau à faciliter cette polymérisation dépend du nombre de ces motifs. Ainsi, les formes possédant 4 domaines de répétitions, présenteraient-elles des capacités de liaison aux microtubules 40 fois supérieures aux formes ne présentant que 3 domaines de répétitions (73). Or il est intéressant de noter que les protéines Tau possédant 4 domaines, ne sont exprimées qu'à l'âge adulte. Ces données suggèrent donc que le cytosquelette neuronal est plus stable à l'état adulte qu'à l'état embryonnaire, corroborant la plasticité neuronale observée lors du développement.

La phosphorylation des protéines Tau serait un déterminant essentiel du contrôle de la stabilisation de la polymérisation des microtubules, cette phosphorylation induisant la dépolymérisation des microtubules (74). La capacité des protéines Tau à polymériser et à stabiliser les microtubules dépend donc de protéines kinases et de phosphatases. Ainsi, parmi elles trouve-t-on la protéine kinase C (75), les MAP kinases (Mitogen Activated Protein Kinase) (76,77), la glycogène synthase protéine kinase de type 3 (GSK3) (78) et la CaMkinase II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) (79). De même des phosphatases telles que les protéines phosphatases 1, 2A, 2B et 2C ont été décrites comme

susceptibles d'agir sur les protéines Tau (80,81).

3.2.5. Protéines Tau et maladie d'Alzheimer.

De nombreux groupes ont décrit qu'une phosphorylation anormale et excessive des protéines Tau était un marqueur caractéristique de la maladie d'Alzheimer (82,83). En effet, leur caractérisation a révélé, dans tous les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la présence d'un triplet de protéines Tau pathologiques, nommées selon leur masse moléculaire apparente Tau 55, 64 et 69 (Figure 3). L'existence d'une composante de 74KDa a par ailleurs été mise en évidence dans le cas de démences très sévères (84).

Cependant, le cortex cérébral biopsique rapidement manipulé, présente des protéines Tau natives phosphorylées de façon importante (66). En fait, la majorité des sites qui était alors considérée comme étant anormalement phosphorylée, sont retrouvés sur ces protéines Tau natives. Néanmoins, il semblerait qu'existent des différences significatives pour certains sites de phosphorylation entre Tau-PHF et protéines Tau natives (66,85,86).

Cette phosphorylation anormale aurait alors pour conséquence d'agencer les protéines Tau dans les PHF de façon à former un axe protéique résistant aux protéases et à tous autres modes de dégradations (87). La formation de ces PHF pourrait alors conduire à la mort neuronale.

Enfin, outre la phosphorylation, il a été décrit que la formation des PHFs *in vitro* dépend de la création d'un pont disulfure intermoléculaire impliquant le résidu Cys322 (88). Enfin la glycation des protéines Tau, modification observée chez les patients (89), pourrait être impliquée dans le mécanisme d'agrégation de ces protéines (90), en stabilisant celle-ci (91).

3.3. Vulnérabilité neuronale.

Les protéines Tau agrégées en PHF sont observées dans de très nombreuses pathologies. Cependant, le profil électrophorétique des protéines Tau-PHF ne semble pas identique dans toutes les pathologies (Figure 3c). Ainsi, par exemple, les individus souffrant d'une trisomie 21 ou d'une sclérose latérale amyotrophique présentent-ils le même triplet Tau 55, 64, 69. En revanche, les individus atteints du syndrome de Steele-Ridchardson-Olszewski ou de dégénérescence corticobasale, ne présentent qu'un doublet de la forme Tau 64, 69. Enfin, les personnes développant une maladie de Pick ou une dystrophie myotonique, sont caractérisées par un doublet de la forme Tau 55, 64 (Figure 3c). En fait, ces résultats sont dus à des différences d'épissages du gène *Tau* en fonction de la population neuronale touchée (92).

En conclusion, il n'est pas encore clairement défini, si la formation de la dégénérescence neurofibrillaire est une cause ou une conséquence de l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. A ce niveau, les données peuvent paraître contradictoires. Ainsi, a-t-il été proposé que la glycation des protéines Tau pouvait induire un stress oxydatif (89), suggérant un rôle initiateur des protéines Tau dans le développement de la pathologie.

A l'inverse, il a été proposé que les fibrilles de substances amyloïdes soient capables d'induire une hyperphosphorylation des protéines Tau et une déstabilisation des microtubules dans des neurones corticaux humains (93). Cette hyperphosphorylation pourrait être médiée par l'activation de la GSK3-β (94). Même si aucun lien direct n'a pu être encore montré entre les deux lésions caractéristiques (DNF et PS) de la maladie d'Alzheimer, il semblerait probable que la formation de fibrilles amyloïdes puissent induire une hyperphosphorylation des protéines Tau.

4. Dépôts de substance amyloïde.

4.1. Caractéristiques des dépôts de substance amyloïde.

4.1.1. Structure et composition.

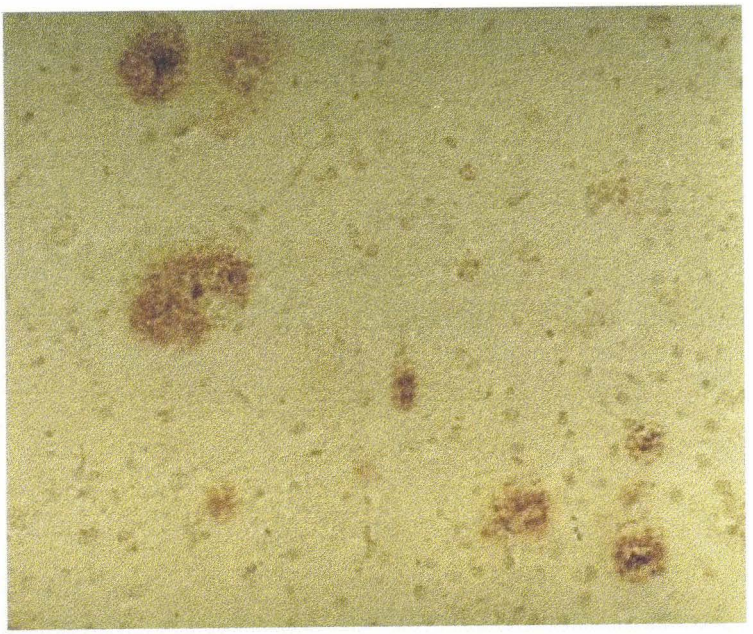
Les dépôts amyloïdes (Figure 4a) sont des structures filamenteuses, composées à plus de 70% d'un peptide de 39 à 43 a.a., nommé peptide amyloïde ou peptide Aβ (95,96). La structure de ces dépôts amyloïdes est caractérisée par des filaments de 4 à 8 nm. L'utilisation d'un peptide de synthèse $A\beta_{10-35}$, a récemment permis de montrer que l'agrégation de ces peptides se faisait en feuillet β parallèle, chaque résidu se retrouvant en face de son homologue (97).

De nombreux autres constituants ont été mis en évidence au sein des plaques séniles : l'apolipoprotéine E (APOE), l'apolipoprotéine B, les protéoglycanes, les protéines du compléments, des immunoglobulines, des protéines de la matrice extracellulaire, le composé P amyloïde, l'α1-antichymotrypsine... (98). Un certain nombre de ces constituants sont d'ailleurs considérés comme des co-facteurs, favorisant l'amyloïdogénèse tels que certains métaux (Fe^{2+}, Al^{3+}, Zn^{2+}) (99,100), l'APOE (101), la cytokine TGF-β1 (102) et l'α1-antichymotrypsine (103).

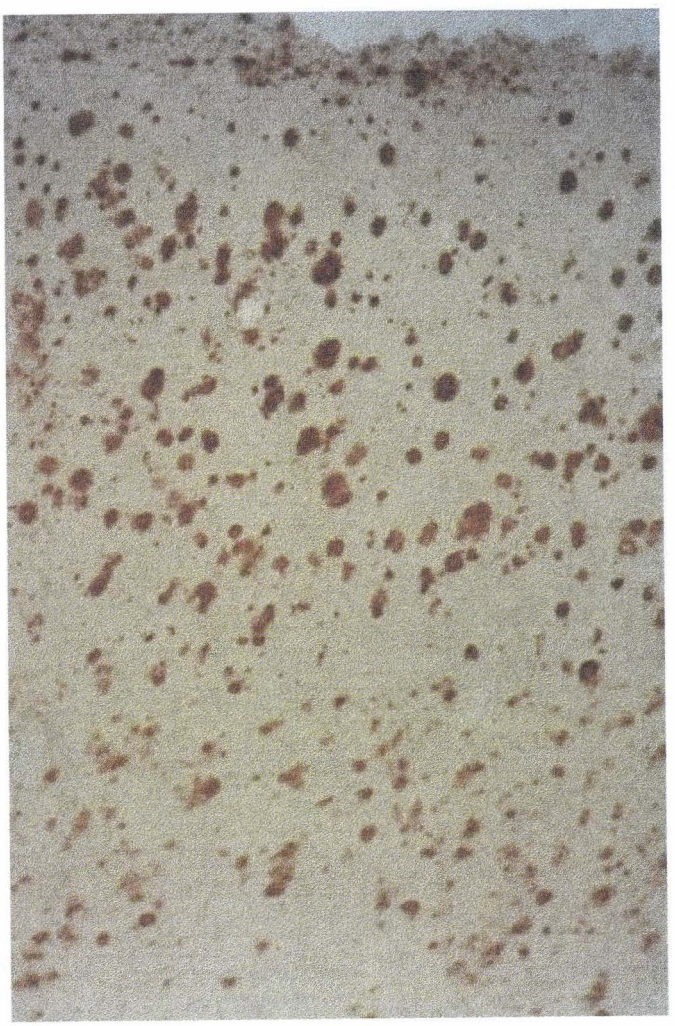
4.1.3. Distribution topographique.

Deux types principaux de dépôts amyloïdes peuvent être définis en fonction de leur localisation dans le cortex cérébral. Il s'agit des dépôts situés, soit dans la paroi des vaisseaux, on parlera alors d'angiopathie amyloïde, soit dans le parenchyme cérébral (Figure 4).

a



b



I

II

III

IV

V

VI

Figure 4 : Les dépôts amyloïdes. **(a)** Mise en évidence de PS et **(b)** Distribution laminaire des PS par immunoréactivité obtenue avec un anticorps polyclonal anti-Aβ sur une coupe de cortex temporal (A20) d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

Contrairement à la dégénérescence neurofibrillaire, les dépôts de substance amyloïde sont retrouvés préférentiellement au niveau des aires associatives du néocortex (lobes frontaux, temporaux, occipitaux et pariétaux), mais plus rarement au niveau des régions hippocampiques et parahippocampiques (55). De plus, ils semblerait que les lobes temporaux et occipitaux soient plus touchés que les régions frontales et pariétales (51).

Au niveau laminaire, même si la distribution des dépôts amyloïdes est généralisée à l'ensemble des couches du néocortex, celle-ci semble se situer préférentiellement aux niveaux des couches II et III (Figure 4b)(19,55).

4.1.3. Evolution des dépôts amyloïdes.

Au niveau de l'évolution topographique des dépôts amyloïdes dans le cerveau, d'importantes variations interindividuelles suggèrent que la progression des dépôts dans le cerveau ne suit pas un schéma évolutif précis. Cependant, trois stades peuvent être définis (55): (i) Au stade A, un nombre peu important de dépôts amyloïdes est retrouvé au niveau des aires isocorticales et plus particulièrement au niveau des parties basales des lobes frontaux, temporaux et occipitaux tandis que l'hippocampe ne présente pas de dépôts. (ii) Au stade B, les couches pyramidales du subiculum et du CA1 sont touchées. Des dépôts amyloïdes diffus sont retrouvés au niveau du cortex entorhinal. L'ensemble des aires isocorticales sont envahies. Seules les aires sensitives et motrices sont épargnées. (iii) Enfin au stade 3, la substance amyloïde est présente dans l'ensemble des aires isocorticales ainsi que les aires des motrices primaires. L'hippocampe n'est pas plus atteint qu'au stade B. Les noyaux gris sous-corticaux (striatum, thalamus et hypothalamus) peuvent être touchés. Enfin le cervelet peut présenter de nombreux dépôts diffus.

Il est généralement admis que l'étape d'initiation des plaques amyloïdes serait la

formation de dépôts diffus , les plaques séniles associées à la DNF et à une réaction gliale intense, correspondant à un stade ultérieur (104,105). L'hétérogénéité du peptide Aβ dans sa région C-terminale, serait un déterminant important de la formation de ces plaques. En effet, le peptide $A\beta_{1-42}$ serait le premier à se déposer, les dépôts diffus, considérés comme l'étape la plus précoce du développement des plaques, étant exclusivement composés de cette forme du peptide amyloïde. Le peptide $A\beta_{1-40}$ ne se déposerait que plus tard, surtout au niveau des plaques neuritiques (106,107).

4.2. Le gène de l'APP.

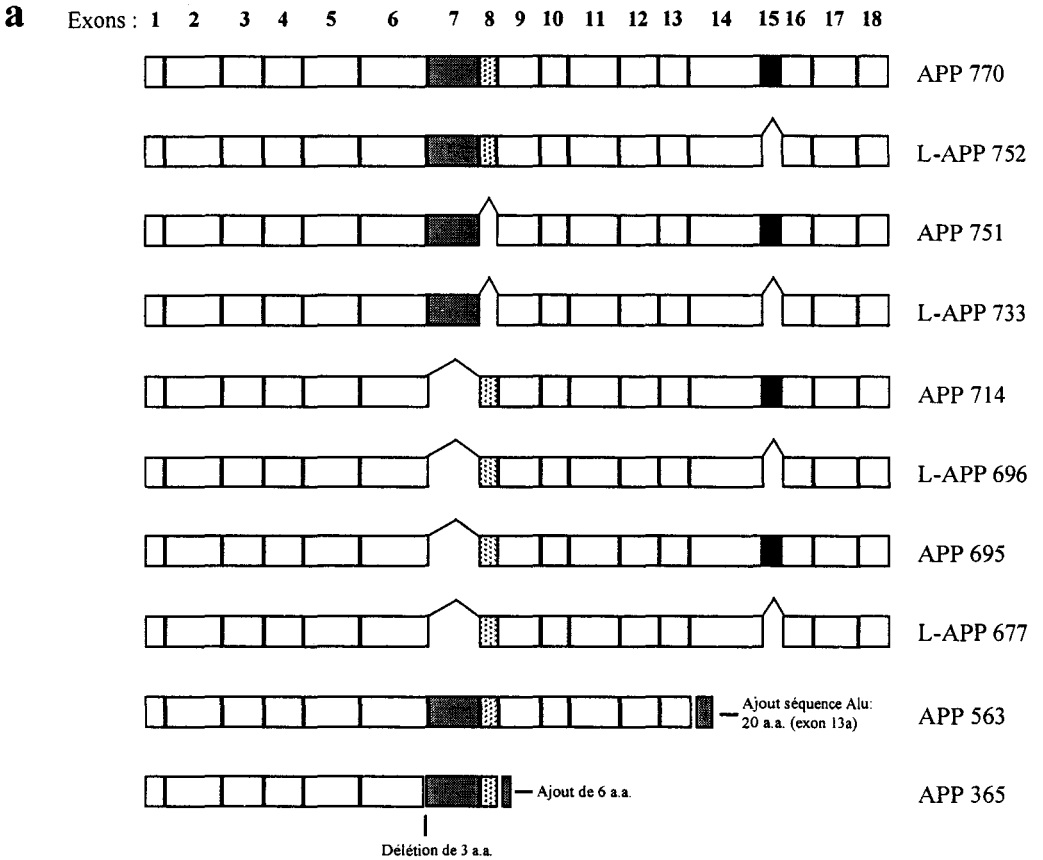
La découverte du composant principal des dépôts amyloïdes, le peptide Aβ, a naturellement placé celui-ci au centre du processus pathologique. De fait, la recherche du gène contenant ce fragment s'est avérée essentielle.

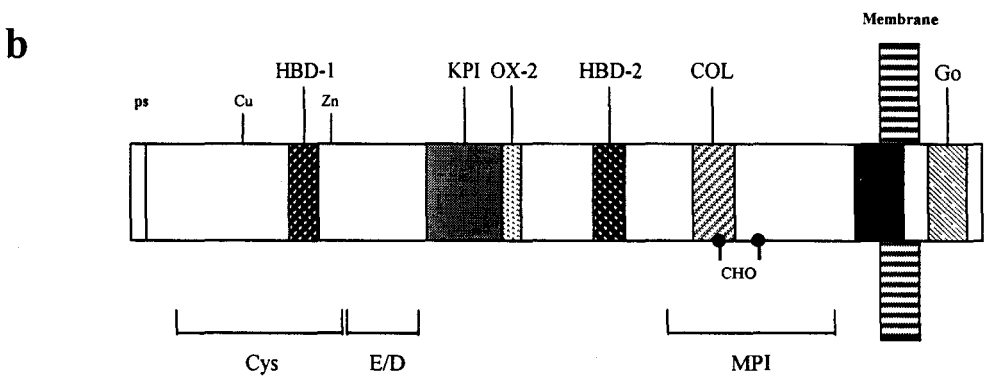
C'est après purification et séquençage du peptide Aβ (95) que celui-ci a pu être cloné et dénommé gène Précurseur du Peptide Amyloïde (APP), dont la structure primaire de l'APP prédit une protéine semblable à un récepteur membranaire ne possédant qu'un seul domaine transmembranaire (Figure 5b) (108).

4.2.1. Structure du gène et épissage alternatif.

Ce gène se situe sur le bras long du chromosome 21 en q21.3-q22.1. Il est composé de 18 exons et s'étend sur plus de 400 kb (109). Dix ARNms peuvent être produits en fonction des différents épissages alternatifs. Deux de ces ARNm codent pour des protéines mineures de 365 et 563 a.a., ne contenant pas le peptide amyloïde (110). Les quatre autres ARNm connus produisent des protéines de 695, 714, 751 et 770 a.a, résultant de l'épissage alternatif

Figure 5 : *Gène de l'APP et caractéristiques protéiques.* **(a)** ARNm de l'APP résultant des différents épissages alternatifs du gène. **(b)** Représentation des principaux domaines structuraux de l'APP.ps, peptide signal de 17 a.a.; A ce jour, un certain nombre de sites ont été mis en évidence, permettant d'appréhender la fonction de cette protéine. Un domaine de 56 a.a. codé par l'exon 7 (291-345), présente une très forte homologie de séquence avec les inhibiteurs de sérines protéases de type Kunitz (KPI). La séquence comprenant les 19 a.a. suivants (346-364) et codée par l'exon 8, est similaire à 50% avec l'antigène OX-2, trouvé à la surface des neurones et des thymocytes. Enfin, la région 439-671 pourrait être une région inhibitrice des métalloprotéases. Plusieurs sites sont susceptibles de pouvoir fixer de nombreux ligands. Il s'agit des sites de fixation à l'héparine, HBD-1 et HBD-2 respectivement aux positions 174-181 et 391-412, le site HBD-2 ayant de plus une activité trophique. Des sites de fixation au zinc (Zn^{2+}; 181-188) et au cuivre (Cu^{2+}; 135-155) ont été aussi mis en évidence. Enfin, un domaine d'interaction avec la protéine Go se situe dans le domaine cytoplasmique entre les a.a. 732 et 751. Il existe une région riche en résidus cystéine (Cys) ainsi qu'un domaine d'environ 100 a.a. fortement acide (E/D; 45% de résidus Asp et Glu). ( ) sites de N-glycosylation.


a
Exons : 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
APP 770
L-APP 752
APP 751
L-APP 733
APP 714
L-APP 696
APP 695
L-APP 677
Ajout séquence Alu: 20 a.a. (exon 13a)
APP 563
Ajout de 6 a.a.
APP 365
Délétion de 3 a.a.


b
Membrane
HBD-1
KPI
OX-2
HBD-2
COL
Go
ps
Cu
Zn
CHO
Cys
E/D
MPI

des exons 7 et 8. Ces formes contiennent toutes le peptide amyloïde, codé par les exons 16 et 17 (111,112). De plus, ces 4 ARNm peuvent subir l'épissage supplémentaire de l'exon 15, les formes obtenues étant alors appelées L-APP (Figure 5a).

Par ailleurs, deux gènes homologues à l'APP, dénommés APLP1 et APLP2, localisés respectivement, sur les chromosomes 19 et 11, ont été identifiés. Cependant, les deux protéines correspondantes se distinguent de l'APP par l'absence de séquences homologues au peptide Aβ (113,114).

4.2.2. Expression des différents ARNm de l'APP.

L'expression de l'APP est ubiquitaire. Cependant, il est important de noter qu'au niveau cérébral, le profil des isoformes synthétisées est hétérogène en fonction des types cellulaires étudiées. La synthèse de l'APP a lieu en grande partie dans les neurones, ceux-ci synthétisant principalement l'isoforme APP_{695} (115,116). L'isoforme APP_{751} est aussi synthétisée essentiellement par les neurones mais dans des proportions moindres. Quant aux autres isoformes, APP_{714} et APP_{770}, celles-ci sont retrouvées en faible quantité par rapport aux isoformes précédentes et sont principalement exprimées par les cellules gliales. Enfin, les isoformes de type L-APP n'ont été détectées que dans les leucocytes et les cellules gliales (112) et sont faiblement exprimées par rapport à ce qui peut être observé dans d'autres tissus (117).

Le profil des isoformes synthétisées pourrait dépendre du vieillissement cérébral. Ainsi une augmentation importante des transcrits contenant l'exon 7, est-elle observée en fonction de l'âge, une corrélation similaire ayant été aussi montrée pour les ARNm L-APP (117,118). Cependant, puisque ces isoformes sont principalement synthétisées par les cellules gliales, il est possible que cette augmentation soit avant tout un marqueur de l'abondance et de l'activité

de ces cellules, gliose directement corrélée au vieillissement cérébral (26).

4.2.3. Modifications post-traductionnelles

La structure de la protéine APP et donc ses propriétés biologiques, peut être modifiée par un nombre important de modifications post-traductionnelles au niveau de l'appareil de Golgi : sulfatation de résidus tyrosine (119), phosphorylation (120), sialylation (121) ainsi que N- et O-glycosylations (120,122). Les N-glycosylations semblent être particulièrement importantes pour le contrôle de l'adressage de l'APP (123).

4.3. Métabolisme de l'APP.

Après synthèse et translocation dans le réticulum endoplasmique par son peptide signal, l'APP suit un processus de maturation à travers la voie sécrétoire classique. En fait, seul un faible pourcentage des molécules APP initialement produites, atteindra la membrane plasmique. En effet, durant et après son adressage à travers la voie de sécrétion, une grande partie de ces molécules subit de nombreuses coupures enzymatiques aboutissant à la formation de nombreux produits de métabolisme (Figure 6).

Le métabolisme de l'APP se caractérise en fait par deux voies distinctes : une voie constitutive ou non amyloïdogénique, ne produisant pas de peptide Aβ et une voie alternative ou amyloïdogénique, produisant le peptide Aβ.

4.3.1. La voie non amyloïdogénique.

Cette voie constitutive, largement majoritaire, est caractérisée par l'action d'une enzyme

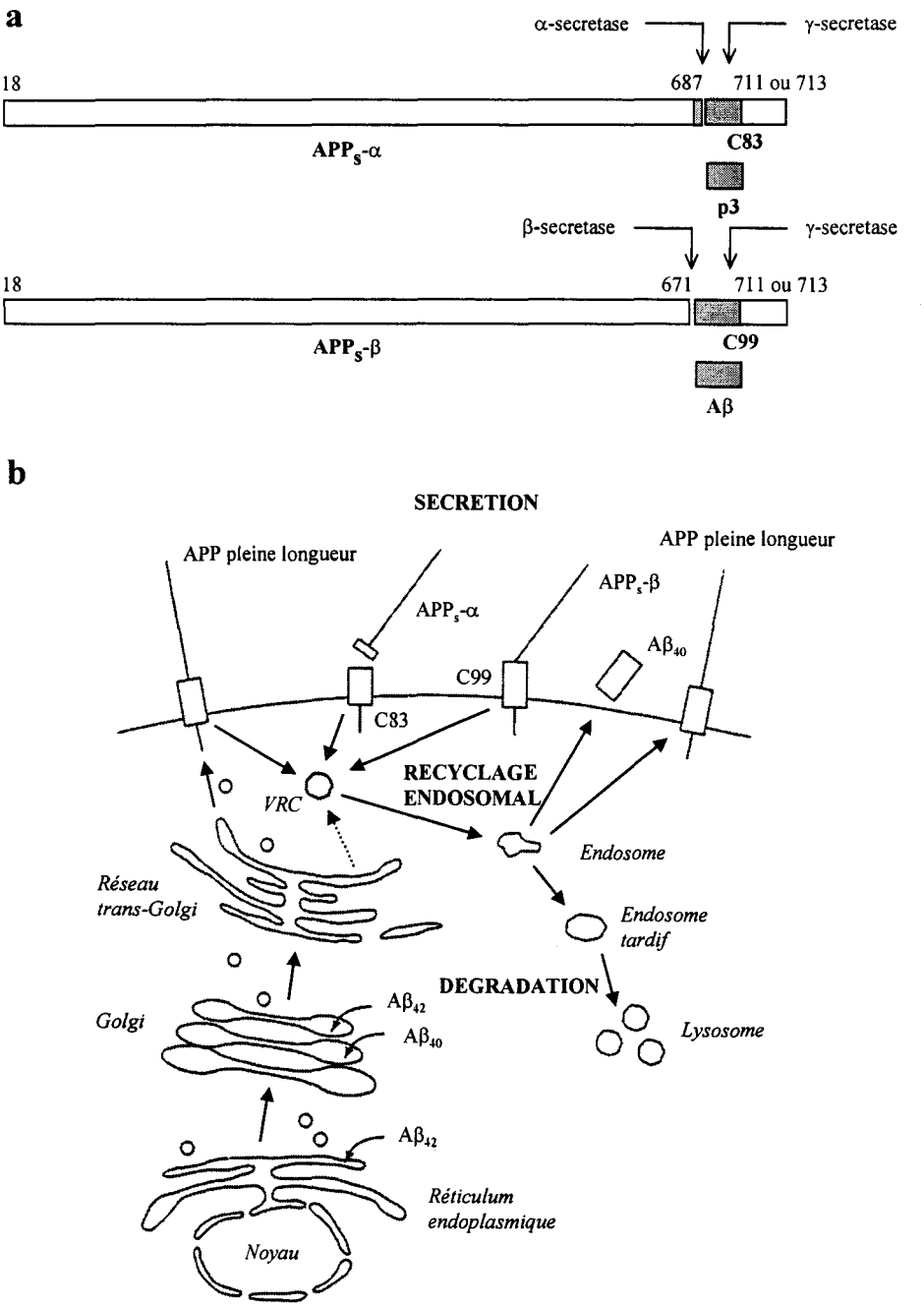


Figure 6 : *Métabolisme de l'APP.* **(a)** Action des différentes sécrétases impliquées dans le métabolisme de l'APP. **(b)** Voies sécrétoires des différents métabolites de l 'APP, VCR vésicule recouverte de chlatrine.

inconnue, l'α-sécrétase mise en évidence dans le réseau trans-golgien ainsi qu'au niveau de la membrane plasmique (124,125). Cette enzyme est probablement une protéase ancrée dans la membrane, capable de cliver diverses proteines possédant un seul domaine transmembranaire. Le site de coupure ne dépendrait pas d'une séquence protéique spécifique mais plutôt d'une distance fixe de la α-sécrétase à la membrane (126).

Cette enzyme coupe au résidu 687 de l'isoforme APP_{770} (126), conduisant ainsi à la sécrétion d'un fragment soluble, l'APP_s-α et à la rétention d'un fragment C-terminal de 83 a.a. (C83). Ce fragment peut être internalisé via les vésicules recouvertes de clathrine et clivé par une sécrétase elle aussi inconnue, la γ-sécrétase au résidu 711 ou 713, donnant le fragment p3 (127).

4.3.2. La voie amyloïdogénique

La voie alternative quant à elle, est caractérisée par la formation du peptide amyloïde via l'action de deux enzymes, les β- et γ-sécrétases. Le clivage par la β-sécrétase semblerait avoir lieu en premier (128,129), la γ-sécrétase pouvant toutefois agir sans qu'il y ait eu coupure antérieure par la β-sécrétase (130). Ces enzymes seraient localisées dans le compartiment endosomal (131-133), mais aussi, comme suggérés par de récentes études, dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (134,135). Cependant, comme la protéolyse de l'APP ne peut avoir lieu qu'après O-glycosylation de la protéine et que ces modifications post-traductionnelles ont lieu dans l'appareil de Golgi, la possibilité que le réticulum endoplasmique soit un lieu de synthèse du peptide Aβ, semblerait être infirmée (135).

L'action de la β-sécrétase aboutit à la sécrétion d'une molécule APPs-β, de 16 a.a. plus courte que l'APPs-α. Le fragment membranaire C-terminal restant, de 99 a.a. (C99) pourra alors être clivé par la γ-sécrétase pour libérer le peptide Aβ (132). Cependant, le fragment

C99 (mais aussi le C83) n'est pas exclusivement dégradé par l'action de la γ-sécrétase, d'autres voies protéolytiques alternatives pouvant probablement dégrader ces fragments dans les endosomes tardifs et les lysosomes (136).

4.3.3. Hétérogénéité N- et C-terminale du peptide Aβ.

Le peptide Aβ, qu'il soit présent dans un milieu de culture, dans le liquide céphalo-rachidien ou bien dans les plaques amyloïdes, est à la fois hétérogène en N- et C-terminal (131,137-140).

Au niveau N-terminal, des peptides commençant par chacun des onze premiers a.a. du peptide Aβ ont été identifiés (141). Par ailleurs, des fragments Aβ présentant un pyroglutamate à la place du résidu Glu3 ont également été mis en évidence (140). Ces différents peptides pourraient être obtenus par dégradation du peptide Aβ après clivage de la β-sécrétase, ou bien par l'action directe d'enzymes coupant aux résidus décrits précédemment.

Au niveau C-terminal, la longueur des fragments obtenus varie de 39 à 43 a.a., le site de clivage de la γ-sécrétase se situant au niveau des résidus [Val39-Ala42(Thr43)] du peptide Aβ. En fait, 90% des peptides Aβ sécrétés sont de la forme $A\beta_{1-40}$, tandis que la forme $A\beta_{1-42(43)}$ ne représente que 10 % (131,137). Ces deux peptides ne seraient pas synthétisés par les neurones dans les mêmes compartiments cellulaires. Ainsi la forme la plus longue, l'$A\beta_{1-42(43)}$, serait produite essentiellement dans le réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire (134), tandis que l'$A\beta_{1-40}$, serait produit dans le réseau trans-golgien et les endosomes tardifs (134). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la membrane du réticulum endoplasmique est pauvre en cholestérol, induisant une perte de spécificité de la γ-sécrétase (142). Une autre possibilité serait qu'il existe des γ-sécrétases distinctes, cette hypothèse étant soutenue par l'observation d'une sensibilité différente des clivages aux positions 40 ou 42 en

fonction des inhibiteurs de protéases utilisés (143-145). Même s'il existe des γ-sécrétases différentes, il semblerait que ces enzymes aient un site actif similaire voire identique, une modélisation moléculaire suggérant que ces γ-sécrétases reconnaissent avant tout une structure en hélice, caractéristique du domaine transmembranaire de l'APP (146).

Il a été aussi proposé que le site de coupure des fragments C99, pouvait être situé dans les endosomes et lysosomes après polymérisation de ces fragments et l'action non spécifique d'un ensemble de protéases (147).

4.3.4. Régulation du métabolisme de l'APP.

Il est généralement admis que la régulation de la production d'APPs-α et de peptide Aβ est mutuellement exclusive (148,149). Cependant, dans certaines circonstances, la balance (soit une régulation réciproque et opposée) entre ces deux voies métaboliques n'a pas toujours lieu (150,151).

Les quantités relatives d'APPs et de peptide Aβ produites, peuvent être influencées par un certain nombre de facteurs, favorisant ou non la sécrétion de ces métabolites.

4.3.4.1. Action des neurotransmetteurs.

La majorité des études concernant la régulation du métabolisme de l'APP par les neurotransmetteurs a principalement porté sur les systèmes glutama-ergiques et cholinergiques. Le glutamate augmente la sécrétion d'APPs dans les cellules exprimant le récepteur métabotropique, effet qui peut être supprimé par l'utilisation d'antagonistes de ce récepteur (152,153). De façon similaire, la régulation cholinergique de la sécrétion d'APPs a été montrée dans des lignées cellulaires exprimant les récepteurs muscariniques (154). Les

agonistes cholinergiques augmentent la sécrétion d'APPs et diminuent celle du peptide Aβ (151,155). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* où l'utilisation de l'agoniste du récepteur muscarinique, le béthanechol et d'inhibiteurs de la cholinesterase augmentent la sécrétion d'APPs dans des coupes corticales de rat (156). L'action de ces neurotransmetteurs passerait par la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G, régulant le métabolisme de l'APP par une cascade de signalisation impliquant les PKC (157,158). Néanmoins, la régulation du métabolisme de l'APP par les neurotransmetteurs pourrait aussi être observée dans des cellules ne possédant pas de PKC fonctionnelles (151,159).

4.3.4.2. Régulation par les œstrogènes.

Des concentrations physiologiques de 17β-oestradiol ont été montrées comme altérant le clivage de l'APP dans des lignées cellulaires ainsi que dans des cultures primaires de rat (160,161). Le 17β-oestradiol est associé à une augmentation de la sécrétion d'APPs-α, une diminution de la production du peptide Aβ, mais aussi d'un dérivé de ce peptide, l'$A\beta_{11-42}$. Cet effet serait maximum après 7 à 10 jours de traitement.

4.3.4.3. Régulation par les stérols

La composition en cholestérol de la membrane cellulaire pourrait être un déterminant important de la production des métabolites de l'APP. Une inhibition de la synthèse d'APPs en fonction d'une quantité croissante de cholestérol, a été montrée dans de nombreux travaux aussi bien en lignée cellulaire qu'en utilisant des souris transgéniques humanisées pour le gène de l'APP (162-164). Par ailleurs, une diminution de la quantité de cholestérol cellulaire de plus de 70% dans des cultures primaires de neurones provenant d'hippocampe de rat, inhibe la

production de peptide Aβ, sans modifier la sécrétion d'APPs (165). Toutefois, des résultats apparemment contradictoires, ont été obtenus chez des souris humanisées pour le gène de l'APP, soumises à un régime riche en cholestérol (164). Ces différences pourraient en partie s'expliquer suite à une modification de la fluidité membranaire par le cholestérol, entraînant alors une incapacité des sécrétases à atteindre leurs substrats.

4.4.3.4. Régulation en réponse à un stress.

Plusieurs études indiquent qu'une altération du catabolisme de l'APP pourrait résulter d'un stress cellulaire associé au stress oxydatif, à la mort cellulaire programmée ou bien à un dérèglement métabolique.

Par exemple, un stress oxydatif dans des neuroblastomes provoque une augmentation de la sécrétion de peptide Aβ, probablement corrélée à une augmentation d'expression du gène de l'APP (166). De façon similaire, une apoptose induite par un milieu sans sérum dans une culture primaire de neurones humains, aboutit à une augmentation de plus de trois fois de la sécrétion d'Aβ, et à une diminution plus modeste de la production d'APPs (167). Enfin, priver des cellules COS de glucose conduit là aussi à une diminution de sécrétion d'APPs, sans avoir d'effet sur l'expression de l'APP (168).

4.4. Fonctions biologiques de l'APP et de ses métabolites.

Comme décrit précédemment, les molécules issues du gène de l'APP sont multiples en raison des différents niveaux de modifications possibles, à partir du gène et de la protéine correspondante : (i) épissage alternatif complexe. (ii) nombreuses modifications post-traductionnelles et (iii) catabolisme caractérisé par deux voies distinctes, constitutives dans

plusieurs types cellulaires, et aboutissant à la formation de nombreux métabolites.

Toutes ces observations suggèrent donc de multiples fonctions physiologiques correspondant à ces différents produits. Cependant du fait même de cette diversité, il est très difficile d'étudier de façon indépendante l'effet de chacun des métabolites de l'APP.

La séquence de l'APP est hautement conservée durant l'évolution chez les mammifères et est très homologue à celle observée chez la drosophile et le nématode *Caenorhbaditis elegans*. Cependant, les souris knock-out pour le gène de l'APP, ne présentent qu'une gliose réactive dans l'hippocampe et le cortex (169) ainsi que des comportements anormaux (169,170). Puisque ces souris ne présentent pas de mort précoce ou de morbidité très marquée, il a été suggéré que l'APP n'était pas essentiel pour le développement. En fait, la mort rapide des souris double knock-out pour les gènes de l'APP et de l'APLP2 suggère plutôt que les produits du métabolisme des autres gènes de la famille de l'APP, sont capables de compenser l'absence de ce gène (171).

4.4.1. Les formes membranaires.

Les formes membranaires de l'APP ont été impliquées dans les processus d'adhésion cellulaire soit en interagissant directement avec les composés de la matrice extracellulaire, ou bien en jouant le rôle d'inhibiteur de métalloprotéase, modulant ainsi la protéolyse de la matrice extracellulaire (172). Elles ont été aussi impliquées dans les mécanismes de croissance neuritique et de synaptogénèse (173-175).

4.4.2. Les formes APPs.

Il semblerait que ce soit les dérivés APPs et plus particulièrement APPs-α, qui

confèrent la plupart des fonctions physiologiques de l'APP, jusqu'à présent observées *in vivo* et *in vitro*. Initialement, les formes solubles de l'APP contenant le domaine KPI (APP 751 et 770) furent décrites comme des éléments intervenant dans la cascade de coagulation (176). Au niveau cérébral, outre les fonctions déjà décrites au niveau des APP membranaires, les APPs sembleraient être impliquées dans les processus de survie cellulaire et de plasticité neuronale (177).

Supportant l'action des APPs, un certain nombre de voies de signalisation et de flux d'ions modifiant ces APP sont été décrits. Ainsi ces molécules apparaissent-elles comme des régulateurs de la concentration neuronale en Ca^{2+} et activeraient les canaux K^+ à haute conductance (178). L'APPs-α a été décrit comme induisant l'activation du facteur de transcription NF-κB, voie protégeant les neurones d'un stress oxydatif (179).

4.4.3. Le peptide Aβ.

Très peu d'études ont portés sur un rôle potentiel de ce peptide. Cependant, l'Aβ soluble aurait une action biologique à des concentrations physiologiques (de picomolaire à nanomolaire). Ainsi, le peptide Aβ pourrait-il avoir un rôle au niveau de l'agrégation des plaquettes et donc de la coagulation (180). Par ailleurs, pour des concentrations de l'ordre du picomolaire, le peptide aurait des propriétés neurotrophiques sur des cultures neuronales provenant d'hippocampe de rat. Cette activité serait portée plus exactement par les résidus 25 à 35 (181).

4.5. Neurotoxicité des métabolites de l'APP.

En parallèle, de nombreux travaux ont montré que des peptides synthétiques $A\beta_{1-40}$ et

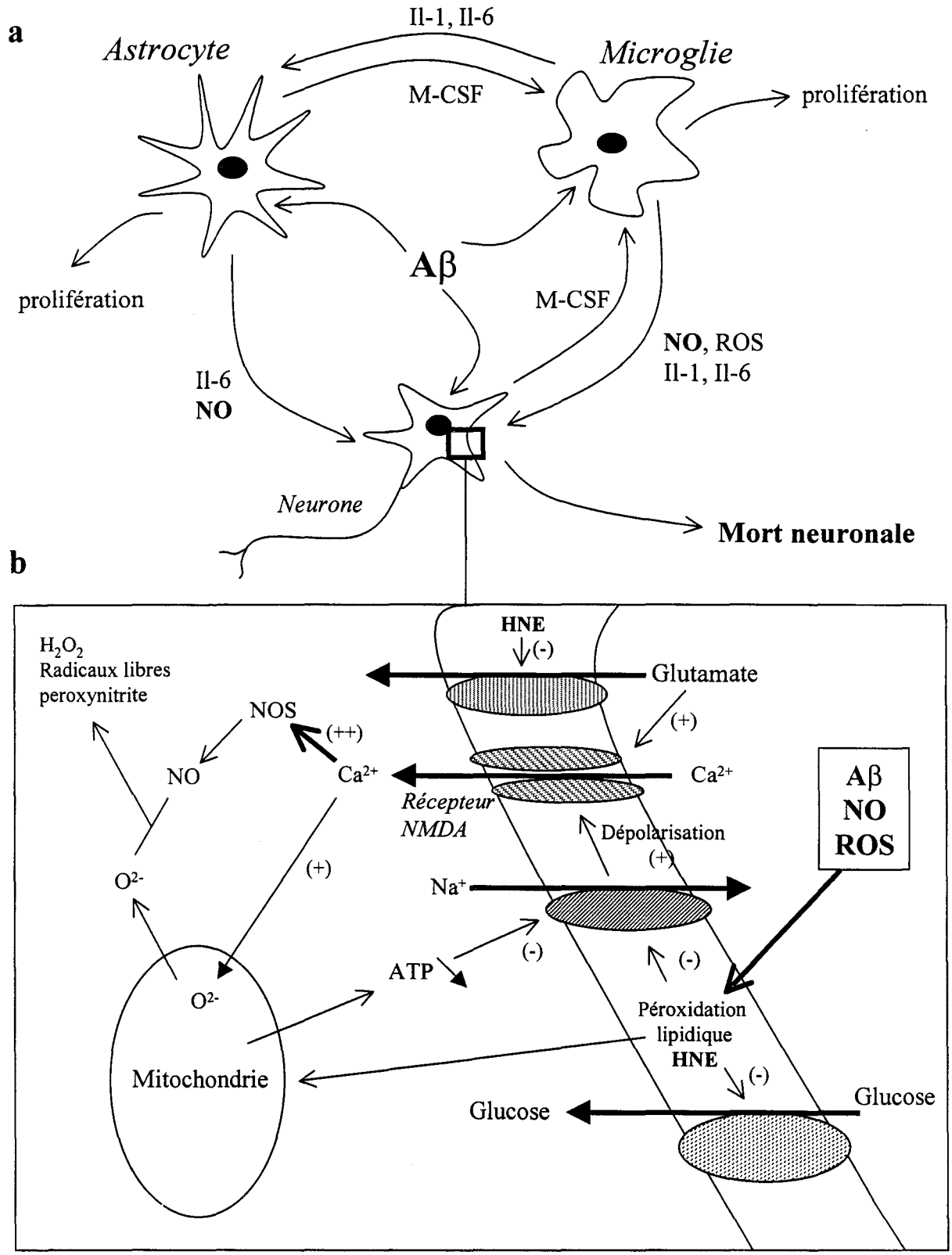
$A\beta_{1-42}$, pouvaient provoquer une mort cellulaire. La séquence d'a.a. 25-35 serait, là aussi, essentielle à cette neurotoxicité, la méthionine en position 35 jouant un rôle majeur (177,181,182).

4.5.1. Neurotoxicité du peptide amyloïde.

Plusieurs travaux suggèrent que la neurotoxicité du peptide Aβ résulterait de l'induction d'un stress oxydatif, observable entre autre par une péroxidation importante des lipides (183,184). De plus, un effet protecteur d'un certain nombre d'antioxydants, comme la vitamine E, a pu être montré (185-187). Cependant, aucun consensus ne s'est encore dégagé pour expliquer de quelle manière le peptide Aβ pourrait induire ce stress.

En fait, l'étude de cette neurotoxicité a abouti à émettre deux hypothèses, non exclusives l'une de l'autre, pour expliquer les mécanismes délétères possibles de ce peptide (188); Première hypothèse, le peptide Aβ pourrait être directement responsable de la mort neuronale. Cette action pourrait être médiée par des propriétés intrinsèques oxydantes (189,190). Ce peptide pourrait aussi former des pores membranaires, induisant une élévation du Ca^{2+} intracellulaire et en conséquence une accumulation de nombreux radicaux libres (191). Enfin, le peptide Aβ pourrait activer la cascade du complément en interagissant directement avec la protéine C1q, le résidu 7 du peptide amyloïde étant alors essentiel (192). Deuxième hypothèse, le peptide Aβ pourrait être en lui-même peu neurotoxique, mais serait capable d'activer la microglie et de provoquer de façon indirecte une réponse inflammatoire chronique (Figure 7a). Cette activation de la microglie par le peptide Aβ aboutirait-elle à un cercle vicieux conduisant à une réponse inflammatoire chronique et à la production de nombreux radicaux libres (193,194).

Figure 7 : *Inflammation et maladie d'Alzheimer.* **(a)** Processus pro-inflammatoire lié au peptide Aβ. Le peptide Aβ serait en effet capable de provoquer la sécrétion d'IL-1 par la microglie , cette étape étant probablement médiée par le récepteur RAGE. L'IL-1 induirait alors la production de M-CSF par les astrocytes, dont l'action provoquerait une augmentation de synthèse de IL-1 par la . Dans un même temps, les neurones seraient eux même capables de produire du M-CSF, par l'intermédiaire de nouveau, de l'activation du récepteur RAGE par le peptide Aβ. Finalement une autoactivation de la microglie aurait lieu par l'action autocrine et paracrine de l'IL-1. Un raisonnement similaire peut être suivi pour l'Il-6 dont les effets pro-inflammatoires pourraient contribuer au développement de la maladie d'Alzheimer . De plus, il est à remarquer que l'IL-1 peut aussi induire la transcription du gène de l'APP et de fait favoriser la production de peptide Aβ, entretenant de nouveau le cycle inflammatoire (pour revue voir ()). **(b)** Conséquence de la toxicité des radicaux libres sur le neurone, HNE 4-Hydroxy-2-*trans*-Nonenal. NO, oxyde nitrique. M-CSF, facteur de stimulation de colonie microgliale. IL, interleukine. NMDA, N-méthyl-D-aspartate.


a
Il-1, Il-6
Astrocyte
Microglie
M-CSF
prolifération
prolifération
Aβ
M-CSF
NO, ROS
Il-1, Il-6
Il-6
NO
Neurone
Mort neuronale
b
HNE
(-)
Glutamate
H2O2
Radicaux libres
peroxynitrite
NOS
(++)
(+)
NO
Ca2+
Ca2+
Récepteur
NMDA
Dépolarisation
(+)
Aβ
NO
ROS
O2-
(+)
Na+
ATP
(-)
(-)
O2-
Péroxidation
lipidique
HNE
(-)
Mitochondrie
Glucose
Glucose

Quelque soit le rôle réel du peptide Aβ dans le mécanisme inflammatoire, celui-ci aboutirait à un stress neuronal important conduisant à la mort cellulaire. En effet, l'intégrité du neurone serait modifiée à de multiples niveaux. La formation de radicaux libres entraînerait une péroxidation des lipides membranaires. Ceci aurait pour conséquence d'induire un dysfonctionnement des ATPases Na^+/K^+ et Ca^{2+}, et donc une dépolarisation de la membrane, augmentant la vulnérabilité neuronale (195-197). Cette oxydation membranaire conduirait aussi à une dérégulation de la prise en charge du glutamate par les astrocytes et les synaptosomes (198,199). Le glutamate induirait alors une neurotoxicité par la voie du récepteur NMDA, provoquant ainsi de nouveau, une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. Enfin, une des dernières conséquences de la péroxidation des lipides serait un dysfonctionnement de l'approvisionnement en glucose, provoquant une diminution de la synthèse d'ATP. Cette diminution d'ATP accentuerait le mauvais fonctionnement des ATPases chargées du maintien de l'homéostasie cellulaire (200). Les conséquences directes de l'augmentation en Ca^{2+} intracellulaire seraient alors de nouveau la production de NO et autres radicaux libres accentuant le dysfonctionnement cellulaire déjà existant et conduisant à une apoptose (Figure 7b).

4.5.2. Le peptide APPs-β.

La toxicité de l'APPs-β est difficilement dissociable d'une diminution de production de l'APPs-α. En effet comme décrit précédemment, le peptide APPs-α présente de très nombreuses propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices. Or il semblerait que ces propriétés neuroprotectices soient portées par une séquence incluant les 16 a.a présents au niveau de l'APPs-α mais pas de l'APPs-β (178,201). Puisque les APPs sont capables d'induire une réponse inflammatoire, il a été proposé que la toxicité de l'APPs-β résulterait de

l'activation de la microglie sans pour autant apporter une neuroprotection efficace (202).

4.5.3. Implication pour la maladie d'Alzheimer.

En raison de la neurotoxicité des métabolites produits par la voie amyloïdogénique, il a été proposé que le développement de la maladie d'Alzheimer puisse résulter d'une modification du métabolisme de l'APP en faveur de cette voie. Cela aurait donc pour conséquence une surproduction du peptide Aβ, d'APPs-β et/ou une diminution de sécrétion d'APPs-α.

Cette hypothèse semble être confirmée par l'étude des formes familiales de la maladie d'Alzheimer où l'on peut observer une augmentation de la concentration en peptide Aβ, et en particulier de la forme $A\beta_{1-42}$, dans le plasma des malades par rapport aux témoins (203). Cependant, cette corrélation ne semble pas pouvoir être obtenue pour les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer. En effet, que ce soit au niveau du plasma ou du liquide céphalorachidien (LCR), de nombreuses études ne rapportent le plus souvent, aucun changement ou au contraire une diminution de la concentration totale en peptide Aβ (204-209). Des mesures plus spécifiques sur la quantité de peptide $A\beta_{1-42}$ semblent donner des résultats similaires (210-212). Ces données sont donc contradictoires par rapport à ce qui est observé pour les formes familiales, réfutant donc l'implication possible du peptide Aβ dans le processus pathologique. Cependant, une étude récente semble pouvoir apporter une réponse à cette apparente contradiction. En effet, la quantité d'$A\beta_{1-42}$ dans le LCR, pourrait augmenter de façon importante dans les premières étapes de la maladie, puis diminuerait pour atteindre un niveau similaire à ce qui peut être observé chez les témoins. Ces données suggèrent donc que l'augmentation de peptide $A\beta_{1-42}$ est nécessaire à l'initiation de la pathologie, mécanisme commun entre les formes familiales et sporadiques de la Maladie d'Alzheimer. La diminution

de peptide $A\beta_{1-42}$ observée avec la progression de la maladie serait alors due à la formation des dépôts amyloïdes mais aussi à la diminution du nombre des cellules capables de produire la forme $A\beta_{1-42}$, soit majoritairement les neurones (213). Il est intéressant de noter qu'un certain nombre de résultats épidémiologiques pourraient confirmer cette hypothèse.

L'argument le plus fort est probablement le fait que des individus ayant subi un traumatisme cranien sévère, ont une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer (214-217).

D'autres études ne retrouvent pas cette augmentation de risque (218,219). Cependant, pour l'une d'entre elles, les auteurs décrivent une MA plus précoce chez les victimes d'un traumatisme (219). Le lien entre ce type de traumatisme et la MA pourrait résulter d'une modification du métabolisme de l'APP. En effet, après ce type d'accident, on peut observer soit une augmentation des dépôts de peptide $A\beta_{1-42}$ dans le parenchyme cérébral, soit une augmentation de la concentration de ce peptide dans le LCR (220,221).

Deux autres facteurs décrits par des études épidémiologiques comme susceptibles de moduler le risque de développer la MA, pourraient modifier le métabolisme de l'APP : le traitement substitutif aux œstrogènes et l'hypercholestérolémie. Cependant, les données obtenues semblent plus ambiguës que ce qui peut être observé pour le traumatisme crânien. (i) Il a été suggéré que les femmes suivant un traitement substitutif aux œstrogènes avaient moins de risque de développer la MA que les femmes ne suivant pas ce type de traitement (222). Même si ces résultats sont très hétérogènes en fonction des études, de nombreuses données *in vivo* et *in vitro* sembleraient appuyer cette observation. Toutefois, bien que les œstrogènes aient été décrits comme pouvant moduler le métabolisme de l'APP (comme décrit précédemment en 5.3.4.2.), l'effet protecteur de ces molécules pourrait être aussi lié, soit à des propriétés antioxydantes soit à un contrôle de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose induite par le peptide Aβ (223,224). (ii) Concernant le taux de cholestérol, les études

épidémiologiques décrivant qu'une hypercholestérolémie augmenterait le risque de développer la maladie d'Alzheimer, sont controversées (225-228). Cependant, un certain nombre de données suggèrent qu'un taux élevé de cholestérol pourrait entraîner une modification du métabolisme de l'APP (décrit en 5.3.4.2.).

Facteurs impliqués	Impact sur le risque de développer la MA	Effets sur le métabolisme de l'APP
Traumatisme crânien	délétère	dans le LCR $A\beta_{1-42}$↗; $A\beta_{1-40}$→, APP→
Traitement palliatif par les œstrogènes	protecteur	*in vitro* : APPs-α↗; Aβ↘
Hypercholestérolémie	délétère (?)	*in vivo* et *in vitro* : APPs-α↘; Aβ ↗ or ↘

Tableau 1: Facteurs modulant le risque de développer la MA et susceptibles de jouer sur le métabolisme de l'APP.

Ainsi, une hypothèse forte semblerait se dégager pour impliquer, dans le développement de la MA, une modification du métabolisme de l'APP entraînant une sécrétion plus importante du peptide Aβ et en particulier de la forme $A\beta_{1-42}$. Cependant cette hypothèse pourrait être réfutée par un certain nombre d'observations.

4.5.4. Validité de l'hypothèse amyloïde

Les principales remises en cause de l'hypothèse amyloïde sont dues à des observations neuropathologiques. En effet, celles-ci ne permettent pas d'établir une relation causale entre la génération du peptide amyloïde et la MA. Ainsi, aucune corrélation n'a pu être mise en

évidence entre la distribution, le nombre des plaques amyloïdes et la dégénérescence neuronale ou la perte de synapse (229,230). Par ailleurs, aucune corrélation significative n'a pu être montrée entre le nombre de plaques amyloïdes et le degré de dégénérescence, alors qu'une telle relation est décrite avec la DNF. Enfin, il n'est pas rare de trouver des quantités de dépôts de substance amyloïde proches, chez des individus non déments, de ce que l'on peut observer chez les malades (229).

Plusieurs études montrent un manque de concordance entre la distribution de la dégénérescence neuronale et la distribution des plaques amyloïdes, cette observation suggérant que ces deux marqueurs pathologiques pourraient se former indépendamment l'un de l'autre (230,231). Deux observations semblent soutenir cette hypothèse : (i) La DNF n'est pas forcément formée en réponse à la formation des dépôts amyloïdes, puisque celle-ci est observée dans des pathologies telles que les syndromes parkinsonien ou la démence pugilistique alors que ces pathologies ne présentent pas de plaques séniles. (ii) Plusieurs laboratoires ont montré que l'initiation de la MA aurait lieu au niveau du cortex entorhinal, dans lequel la DNF apparaît en premier, sans présence de dépôts amyloïdes(232).

Cependant, ces arguments, même s'ils sont importants, remettent avant tout en cause la toxicité induite par la formation des plaques, mais pas la toxicité éventuelle du peptide Aβ. A ce niveau, peu d'arguments semblent être apportés contre l'hypothèse amyloïde. Certains auteurs suggèrent toutefois que les troubles du comportement et la perte neuronale observés chez certaines souris transgéniques pour le gène humain de l'APP, n'est pas attribuable à une augmentation de la synthèse de peptide Aβ, mais plutôt à une surexpression du gène de l'APP (233). En effet, des résultats similaires au niveau du trouble du comportement ont pu être observés, en surexprimant d'autres protéines au niveau cérébral comme les neurofilaments, suggérant que ces observations ne sont pas spécifiques du gène de l'APP, mais de sa surexpression anormale (233).

En conclusion, le fait que la maladie d'Alzheimer soit une pathologie complexe, multifactorielle, explique la difficulté à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans son développement. Afin de mieux comprendre les aspects biologiques encore peu connus ou ambigus, une approche multidisciplinaire est nécessaire. La génétique est probablement un des outils qui permet de disséquer certains aspects du processus pathologique. La découverte des gènes impliqués dans les formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer, semble ainsi confirmer l'hypothèse amyloïde. Il en serait d'ailleurs de même pour la plupart des facteurs de susceptibilité, impliqués dans les formes sporadiques de la pathologie.

5. Génétique des formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer.

Dans de nombreuses familles atteintes de forme précoce de maladie d'Alzheimer, la pathologie se transmet selon un mode autosomique dominant, suggérant l'existence d'un gène majeur, responsable de la pathologie.

5.1. Introduction.

L'identification de ces gènes a pu être réalisée par l'étude de la coségrégation avec la pathologie, de marqueurs polymorphes dont on connaît la localisation chromosomique. Ces marqueurs peuvent être de plusieurs types : (i) les polymorphismes de restriction ou RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism), bi-allèliques et caractérisés par la présence ou non d'un site de coupure par une endonucléase (ii) les polymorphismes de répétition : les minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) correspondant à des séquences de plus de 10 nucléotides répétées en tandem, et les microsatellites résultant de la répétition en tandem de très courtes séquences de 1 à 4 nucléotides. L'informativité de ces polymorphismes dépendra du nombre d'allèles, mais aussi de la fréquence de ces allèles. Ainsi, plus un polymorphisme présentera de variations de séquence avec une répartition de fréquence homogène, plus celui-ci pourra être informatif (voir Annexe). De fait, les polymorphismes de répétition sont préférentiellement utilisés pour les études de liaison génétique, car plus informatifs que les polymorphismes de restriction.

On dit qu'une liaison génétique existe, lorsque dans plus de 50% des méioses, la maladie et un des allèles du marqueur étudié sont hérités ensemble. Ceci signifie en fait que le marqueur et le gène défectueux, sont situés sur le même chromosome et suffisamment proches l'un de l'autre pour ne pas être séparés par les événements de recombinaisons

génétiques au cours des générations. Ainsi, la proximité du marqueur et du gène augmente la probabilité de co-transmission aux générations ultérieures.

L'utilisation de marqueurs génétiques, espacés régulièrement sur le génome, permet en théorie, de situer sur un chromosome, puis sur une région spécifique de ce chromosome, un gène généralement inconnu qui ségrège avec la maladie. Cette méthode est appelée clonage positionnel.

Cette technique a permis de mettre en évidence, 3 gènes possédant des mutations responsables de formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer: le gène de l'APP sur le chromosome 21, les gènes des présénilines 1 et 2, respectivement sur les chromosome 14 et 1.

5.2. Mutations du gène de l'APP.

Le fait que les individus atteints de trisomie 21, présentent des similitudes neuropathologiques importantes avec les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, a conduit à rechercher des gènes défectueux sur ce chromosome. Dès 1987, une première étude rapportait une liaison génétique de la région D21q11.2-q22 avec l'affection (234). En 1991, une région de 21 cM a pu être clairement associée à la maladie. Cette région contenant le gène de l'APP (cloné en 1987), celui-ci a été préférentiellement séquencé, permettant de mettre en évidence la première mutation impliquée dans une forme autosomique dominante de la maladie d'Alzheimer (235).

5.2.1. Description des mutations du gène de l'APP.

A ce jour, 9 mutations pathogènes ont été découvertes sur le gène de l'APP (Figure 8). Trois de ces mutations, dans des familles anglaises, sont portées au codon 717 et

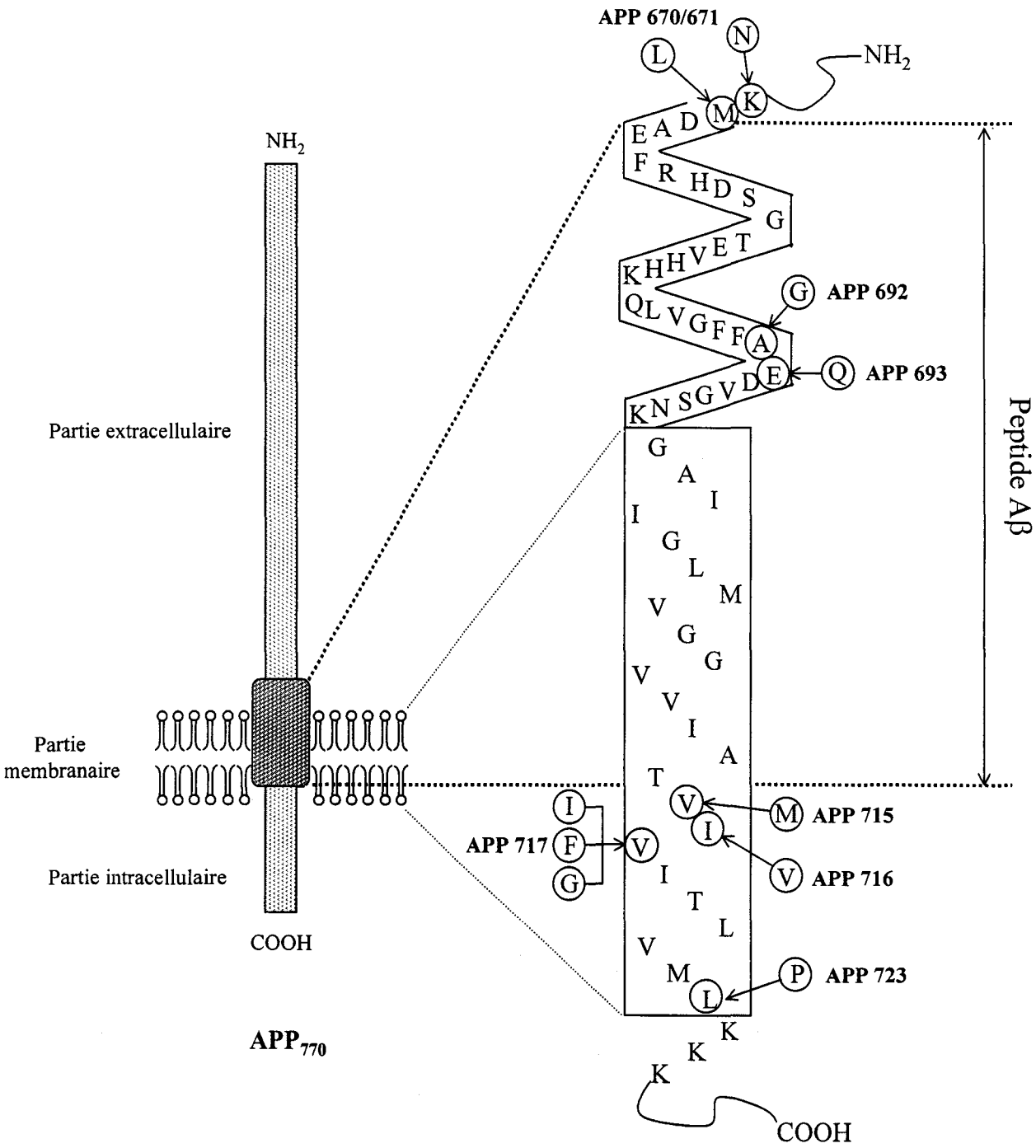


Figure 8 : *Mutations du gène de l'APP*, responsables de formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer. Les mutations aux codons 692 et 693 sont associées à la fois à une démence de type Alzheimer et/ou à des hémorragies cérébrales héréditaires avec amyloïdose.

correspondent respectivement à des changements de type Val→Ile, Val→Gly ou Val→Phe (235-237). Une double mutation aux codons 670 et 671, a été identifiée dans une famille suédoise correspondant à des modifications respectivement de type Met→Leu et Lys→Asn. Une autre mutation pathogène a pu être caractérisée dans une famille hollandaise, au codon 692 de type Ala→Gly. Cependant, cette mutation est associée à la fois à une démence de type Alzheimer mais aussi à des hémorragies cérébrales (238). Enfin récemment, deux nouvelles mutations ont été décrites aux codons 715 et 716, respectivement dans une famille française d'origine italienne et dans une famille nord-américaine. La mutation au codon 715 correspond à un changement en a.a. de type Val→Met, tandis que celle en positon 716 change une isoleucine en valine (239,240).

Un certain nombre d'autres mutations ont été décrits sur le gène de l'APP. Cependant celles-ci sont, soit non associées à la pathologie, soit présentent des ambiguïtés quant au mode de transmission, suggérant peut-être une pénétrance incomplète (Tableau 2).

Codon APP_{770}	Type	Pathologie	Références
153		non	Vaula et al, 1992
665	Asp→Glu	Alzheimer, pénétrance incomplète ?	Peacock et al, 1994
673	Thr→Ala	Ischémie cérébrale	Peacok et al, 1993
693	Asp→Gly	Alzheimer+hémorragie cérébrale	Kamino et al, 1992
708	C→T	non	Balbin et al, 1992
711	C→A	non	Adroer et al, 1993
713	Ala→Val	Schizophrénie ?	Jones et al, 1992

Tableau 2: Autres mutations et polymorphismes décrits sur le gène de l'APP.

5.2.2. Conséquence des mutations de l'APP sur le processus pathologique.

La découverte de ces mutations et leurs localisations préférentielles au niveau de la séquence du peptide Aβ et plus particulièrement de part et d'autre de celui-ci, a conduit à

déterminer si ces mutations pouvaient moduler le métabolisme de l'APP.

Souris transgéniques.

En fait, il semblerait bien que toutes les mutations du gène de l'APP puissent provoquer une modification du métabolisme de ce gène.

La première description d'une souris humanisée pour le gène de l'APP présentant la mutation V717F, a montré que cette souris présentait une perte synaptique et une gliose importante, ainsi que des plaques amyloïdes et de la DNF (241). Même si le développement de DNF chez les souris présentant cette mutation, n'a pu être systématiquement mis en évidence (242), ces données peuvent être corrélées à une augmentation de la concentration en peptide Aβ de 17 fois entre 4 et 8 mois, et au bout de 18 mois de plus de 500 fois par rapport à ce qui est observé à 4 mois. C'est le peptide $A\beta_{1-42}$ qui est alors préférentiellement sécrété (243). Cette augmentation de sécrétion de la forme $A\beta_{1-42}$ a été confirmée et étendue aux autres mutations du codon 717 (244,245). Cependant, les pertes synaptiques et neuronales observées chez ces souris, pourraient précéder la formation de plaques amyloïdes (246). Par ailleurs, la modification du métabolisme de l'APP pourrait dépendre d'une surexpression du gène de l'APP lui-même. En effet, des souris V717I surexprimant 1,3 fois plus l'APP que les souris témoins, présentent une augmentation de sécrétion des formes APPs-α. Ces souris ne montrent pas de gliose ou de déficit comportemental particulier par rapport aux souris témoins (247).

Des résultats similaires ont été obtenus pour des souris porteuses des mutations suédoises (codons 670/671). Ces souris surexprimant 7 fois plus le gène de l'APP que les souris témoins, présentent au bout de 6 mois, une gliose importante, la formation de plaques mais aussi des protéines Tau hyperphosphorylées. Ces modifications augmentent avec l'âge de

la souris (248)et pourraient être corrélées à une augmentation de la synthèse de peptide Aβ et une diminution de la sécrétion d'APPs-α (245).

Autres données physiologiques.

Les résultats obtenus *in vitro* semblent cohérents par rapport à ce qui a pu être observé chez les souris transgéniques. Ainsi dans la lignée humaine de neuroblastome M17, les mutations au codon 717, provoquent-elles une augmentation de la sécrétion de la forme $A\beta_{1-42}$ par rapport à la forme $A\beta_{1-40}$, de l'ordre de 1,5 à 1,9 fois (249). La même observation a été réalisée dans des cellules COS, cette augmentation de la sécrétion de $A\beta_{1-42}$ étant dans ce cas, accentuée par une diminution de la sécrétion de peptide $A\beta_{1-40}$ (250). Des corrélations similaires ont été observées, *in vivo*, dans le plasma de familles présentant la mutation V717I (251). Les mutations trouvées récemment en position 715 et 716, moduleraient, elles aussi, la production de peptide $A\beta_{1-42}$ par rapport au peptide $A\beta_{1-40}$, soit par une diminution de la production de peptide $A\beta_{1-40}$ ou par une augmentation de la sécrétion de peptide $A\beta_{1-42}$ (239,240).

Des résultats semblables ont pu être obtenus pour les mutations suédoises (codons 670/671). Les fibroblastes, obtenus par biopsie de peau d'individus porteurs de ces mutations, présentent une augmentation de l'ordre de 3 fois, de la sécrétion du peptide Aβ sans altération de la production des autres métabolites de l'APP ou de l'expression de ce gène (252,253). Par ailleurs, un certain nombre d'études suggère que cette double mutation provoquerait une augmentation intracellulaire du peptide Aβ ou du peptide C99 (254), ou pourrait modifier la balance entre les formes APPs-α et APPs-β, qui serait déréglée en faveur de la production d'APPs-β (255).

Ainsi, un consensus se dégagerait, suggérant une action des mutations du gène de l'APP sur le métabolisme de ce gène, en favorisant en particulier la formation du peptide $A\beta_{1-42}$, la forme la plus neurotoxique, par rapport au peptide $A\beta_{1-40}$. Ces données renforcent donc l'hypothèse de la cascade amyloïde, même des méthodologies différentes limitent la comparaison de ces différents travaux. De plus, ces études ne permettent pas de déterminer à quel niveau une modification du métabolisme de l'APP est neurotoxique. Une diminution de la sécrétion du peptide APPs-α est-elle nocive ? Le peptide Aβ est-il délétère au niveau intracellulaire, extracellulaire, sous forme soluble ou de plaques ?

5.3. Le gène de la préséniline 1.

Dés 1988, une étude portant sur des formes familiales précoces et tardives de la maladie d'Alzheimer, ne montrait pas de liaison génétique avec le chromosome 21, suggérant l'existence d'autres locus impliqués dans la pathologie (256). Cette hétérogénéité génétique au sein des formes familiales fut clairement mise en évidence par l'étude de 48 familles. Cette étude permit d'établir qu'un nombre restreint de familles était en fait lié au chromosome 21 (257).

En 1992, une liaison génétique du locus 14q24.3 avec certaines familles atteintes de formes précoces de la maladie d'Alzheimer a été rapportée (258). Par la suite, le locus susceptible de contenir le gène défectueux a été restreint entre les marqueurs D14S43 et D14S53, soit 8,3 cM (259). Après exclusion de deux gènes candidats : ceux de la protéine de choc thermique HspA2 et c-Fos (260), c'est en 1995 qu'a été décrite pour la première fois l'existence de mutations pathogènes sur un gène jusqu'alors inconnu, et dénommé préséniline 1 (261).

5.3.1. Structure et fonction du gène PS1.

Le gène PS1 est composé de 12 exons et est transcrit en un ARNm de 1536 bases. Ce gène est exprimé de façon constitutive dans le cerveau ainsi que dans de nombreux autres organes (261). Au niveau cérébral, son expression est particulièrement importante dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (262). De plus, la protéine est concentrée dans le corps cellulaire et les dendrites mais est peu présente au niveau des axones (263). En fait, cette protéine a pu être localisée précisément dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Au niveau structural, elle présente en fonction des modèles décrits, de 6 à 8 domaines transmembranaires (261,264) (265). La fonction de cette protéine n'a pas été encore clairement établie.

5.3.1.1. La voie de signalisation Notch-dépendante.

Une des clés de la fonction de cette protéine serait son analogie de séquence d'environ 50% avec Sel-12, une protéine identifiée chez *C. elegans*. Sel-12 a été décrite comme facilitant la signalisation cellulaire induite par Lin-12, chez *C. elegans* et la drosophile. Les homologues de Lin-12 chez les mammifères appartiennent à la famille des récepteurs Notch. Or les protéines Notch sont hautement exprimées durant le développement cérébral et joueraient un rôle essentiel dans la neurogénèse et la différentiation cellulaire (266,267). De nombreuses données suggèrent un lien important entre PS1 et Notch. Une interaction entre les deux protéines a pu être récemment montrée (268). Les deux gènes présentent un profil d'expression similaire au cours du développement cérébral (269). Les souris knock-out PS1 présentent des défauts du squelette et meurent d'hémorragie cérébrale en cours de gestation (270), ce phénotype étant similaire à ce qui peut être observé chez des souris mutées pour les

gènes Notch (271). La protéine PS1 humaine est capable de remplacer Sel-12, lorsque celle-ci est défective, suggérant des fonctions similaires. Enfin très récemment, il a été montré que PS1 serait nécessaire à l'activité de Notch en permettant le clivage de ce récepteur (272,273). Le clivage conduit alors à la formation du fragment NICD qui est transloqué dans le noyau, modifiant alors l'expression de gènes cibles (272,274)

Ainsi, la voie de signalisation Notch/PS1 pourrait par exemple, contrôler le compactage de la chromatine et la ségrégation des chromosomes durant la mitose (275). Renforçant l'implication de PS1 dans le développement neuronal, il a été proposé que le catabolisme subi par PS1, soit régulé au cours du développement. En effet, PS1 peut être clivée au niveau de l'exon 9 (au niveau de la grande boucle cytoplasmique) pour obtenir un fragment N-terminal de 25-35 kDa et un fragment C-terminal de 17-20 kDa (276,277). Cette endoprotéolyse est corrélée à la différentiation neuronale (278). Cependant les conséquences de ce clivage sur la neurogénèse sont encore inconnues (279).

Enfin, la voie de signalisation Notch/PS1 contrôlerait l'activation de la protéine kinase GSK3-β, enzyme impliquée dans la phosphorylation des protéines Tau (décrit en 3.2.4.)

5.3.1.2. Interaction avec la famille des protéines Armadillo.

Une des approches pour comprendre les fonctions de PS1 est de déterminer les protéines susceptibles d'interagir avec cette protéine. Ainsi, par système double hybride, deux protéines présentant 66% d'homologie entres elles, les δ- et β-caténines, ont pu être isolées (280). L'interaction entre PS1 et la β-caténine a par la suite été mieux caractérisée, les fragments C-, N-terminaux de PS1 et la β-caténine formant un complexe protéique intracellulaire de haut poids moléculaire (281).

Les caténines sont une famille de gènes, semblables aux gènes Armadillo de la

drosophile, chez laquelle ils ont un double rôle : participer aux jonctions intercellulaires et servir d'intermédiaire dans la voie de signalisation Wingless (Wg). Cette voie dont l'équivalent chez les mammifères est la voie de signalisation Wnt, est directement impliquée dans la maturation cérébrale (282). Or il semblerait que l'effet de sel-12 sur la voie de signalisation Notch pourrait avoir lieu via une interaction directe avec la voie Wg/Wnt. En effet, un des intermédiaires de la voie Wg/Wnt, Disheleved, semblerait être capable de bloquer la voie Notch (283). PS1 pourrait donc correspondre à un deuxième lien possible entre ces deux voies de signalisation, essentielles pour le développement cérébral.

La mise en évidence du complexe PS1/β-caténine a mis en exergue le rôle potentiel de PS1 au cours de l'apoptose (284). En effet, la β-caténine a été aussi décrite comme susceptible de moduler l'apoptose (285). Or une déstabilisation du complexe PS1/β-caténine semble favoriser l'apoptose neuronale (286). Cela est à mettre en relation avec l'observation d'une protéolyse de PS1, par l'action de caspases, dont l'activité est un marqueur de l'initiation de la mort cellulaire par apoptose (287). L'action de ces caspases aurait pour conséquence d'abroger l'interaction PS1/β-caténine (288), ce qui pourrait favoriser la voie apoptotique.

5.3.2. Mutations du gène PS1.

A ce jour, plus de 60 mutations pathogènes ont été décrites sur le gène PS1 (Figure 9). La grande majorité sont des mutations codantes et à pénétrance complète (289). La seule exception est une mutation dans le site accepteur en 5' de l'exon 10, aboutissant à la disparition de l'exon 9 (290). Plus de 30% des mutations se situent sur les exons 8 à 11 codant pour la grande boucle cytoplasmique. Le reste est réparti sans cluster apparent (Figure 9). Il est à remarquer qu'une famille finlandaise dont 17 individus ont développé une pathologie de type Alzheimer (associée à une paraparéris spastique), présente une délétion de l'exon 9, sans

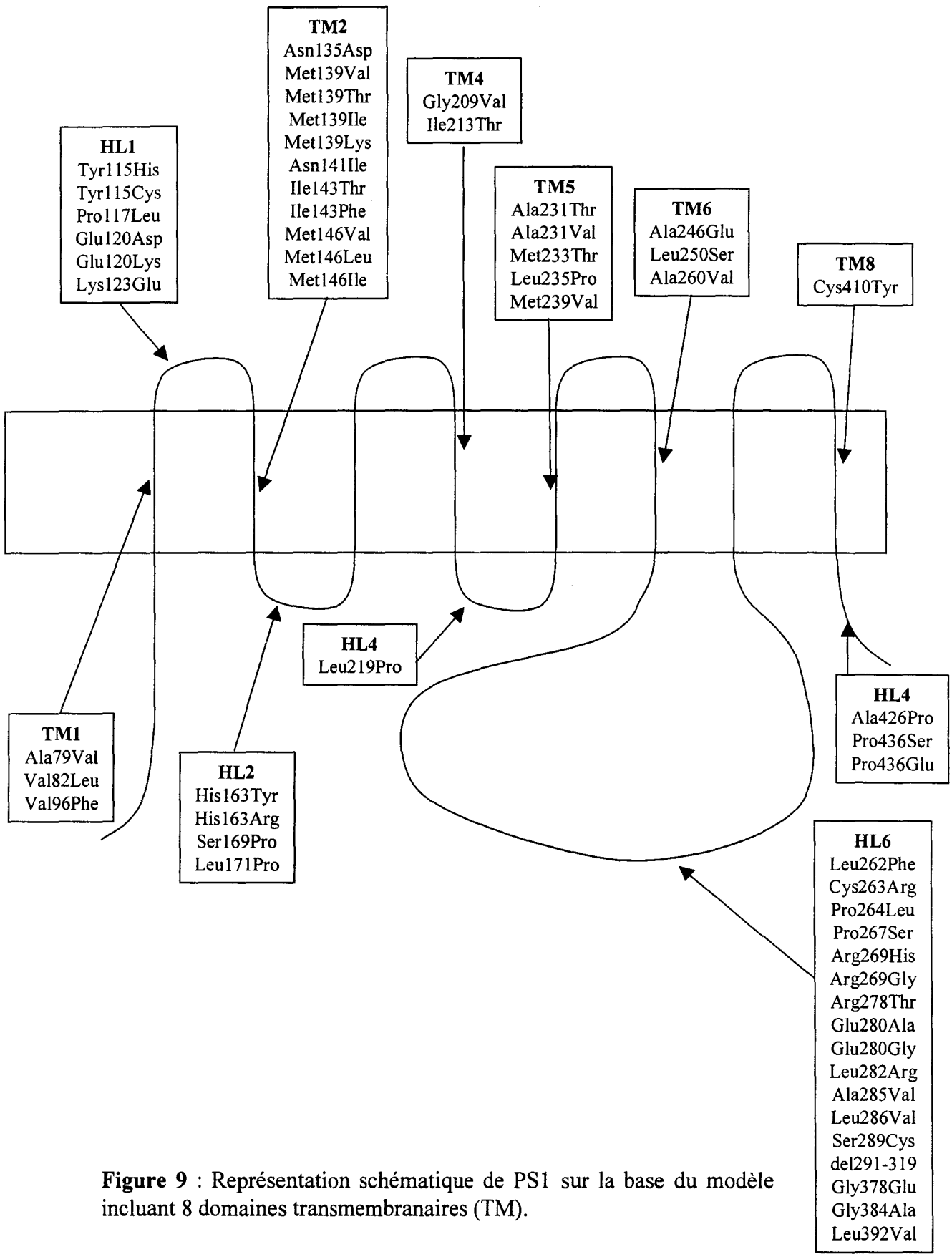


Figure 9 : Représentation schématique de PS1 sur la base du modèle incluant 8 domaines transmembranaires (TM).

pour autant porter de mutation dans les sites accepteurs ou donneurs du gène (291).

Enfin, toutes les mutations de PS1 ne sont pas délétères. En effet, la mutation Glu318Gly, initialement décrite comme étant responsable de la pathologie (292), est en fait retrouvée chez des individus sains mais aussi chez des patients présentant un syndrome parkinsonien (293).

5.3.3. Impact des mutations sur le développement de la pathologie.

Comme la protéine humaine PS1 ainsi que ses formes mutées, sont toutes capables de rétablir un phénotype normal chez des souris knock-out pour le gène murin PS1, cette observation a conduit à penser que les mutations de PS1 ne conféraient pas une perte de fonction mais au contraire un gain de fonction (294,295).

L'étude de souris transgéniques et de modèles cellulaires, a montré que les mutations de PS1 étaient capables d'induire spécifiquement une augmentation de sécrétion du peptide $A\beta_{1-42}$. Confirmant ces résultats, des patients porteurs de mutations sur PS1, présentent deux fois plus de dépôts amyloïdes sous forme $A\beta_{1-42}$ par rapport à ce qui peut être observé dans le cerveau de patients sans ce type de mutations (296).

Même s'il n'existe pas de preuve directe que l'expression de l'APP ou son clivage par les α- et β-sécrétases soient modifiés par les mutations PS1, un certain nombre de données semblent tout de même aller dans le sens d'une modification du métabolisme de l'APP. Les souris knock-out pour le gène PS1 présentent une diminution de production de l'ordre de 70% des deux formes $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$. A l'opposé, une augmentation de production des peptides C99 et C83 peut être observée (297). Toutes ces données suggèrent donc que PS1 jouerait un rôle essentiel dans l'activité de la γ-sécrétase, favorisant le clivage après le résidu 42. Deux hypothèses semblent envisageables pour comprendre cette action potentielle. (i) PS1 pourrait

faciliter l'action de la γ-sécrétase en interagissant directement avec l'APP ou les peptides C99 et C83. Supportant cette possibilité, l'APP et PS1 ont pu être coprécipités (298). Récemment, il a été même suggéré que PS1 pourrait être cette γ-sécrétase (299). (ii) La seconde hypothèse non exclusive de la première, propose que les présénilines réguleraient le trafic intracellulaire (300) soit de la γ-sécrétase et/ou de l'APP. Ce rôle potentiel des mutations dans le trafic intracellulaire des molécules a pu être montré pour l'APP mais aussi pour la β-caténine (301).

Cette action au niveau du trafic intracellulaire ainsi que la déstabilisation du complexe PS1/β-caténine par les mutations de PS1 pourraient favoriser une apoptose neuronale (286,302).

5.4. Le gène de la préséniline 2.

Parallèlement à la découverte du gène PS1, une étude de liaison génétique sur sept familles atteintes de formes monogéniques familiales de la maladie d'Alzheimer, d'origine germanique et habitant la région de la Volga, excluait l'implication des chromosomes 21 et 14. Cependant, une liaison significative était obtenue sur le chromosome 1 avec le marqueur D1S479, démontrant ainsi l'existence d'un locus impliqué dans la pathologie, en 1q31-42 (303). Après exclusion du gène de la cathepsine E, la mise en évidence d'une très forte homologie de séquence entre un ADNc issu de ce locus et le gène PS1 a conduit à la découverte d'un troisième gène appelé préséniline 2 (PS2) (304).

5.4.1. Fonction de la protéine PS2.

L'étude des fonctions de PS2 est beaucoup moins bien documentée que celles de PS1. Cependant, il semblerait que les protéines PS1 et PS2 aient des fonctions assez proches l'une

de l'autre, observation confortée par des structures protéiques très similaires. Par ailleurs, PS2 est localisée, elle aussi, dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (305) et partage bien évidemment de fortes analogies de séquence avec sel-12 (306). Enfin, PS2 a été décrite comme pouvant moduler le trafic intracellulaire. Cependant, le fait que PS2 soit sélectivement phosphorylée sur des résidus sérine, dans un domaine N-terminal acide n'existant pas chez PS1, suggère que PS1 et PS2 pourraient présenter des mécanismes de régulation différents et/ou des fonctions propres (307).

5.4.2. Mutations du gène PS2.

A ce jour, trois mutations ont été découvertes sur le gène PS2 : Arg62His, Asn141Ile et Met239Val. Deux d'entre elles, aux codons 141 et 239, sont présentes aussi sur le gène PS1. Cependant, contrairement aux formes familiales causées par les mutations sur PS1, celles trouvées sur PS2 sont associées à un âge de début de maladie très hétérogène, de 40 à 82 ans, et une pénétrance incomplète (308).

Des épissages alternatifs ont pu être observés aussi bien pour PS1 que pour PS2 dans des fibroblastes, des tissus cérébraux de patients ou d'individus sains (309,310). Cependant, un épissage inhabituel, aboutissant à la perte de l'exon 5 du gène PS2, aurait lieu préférentiellement chez des individus malades (70,0 %) par rapport à ce qui est observé chez les témoins (17,6 %). L'implication de cette observation n'est pas encore déterminée, cet épissage ne semblant pas par ailleurs dépendre de mutations au niveau des sites accepteurs et donneurs de l'exon 5 (311).

5.4.3. Impact des mutations sur le développement de la pathologie.

L'impact des mutations de PS2 est assez similaire à ce qui a été décrit pour celles de PS1. Ces mutations sont ainsi directement corrélées à une augmentation de la synthèse du peptide $A\beta_{1-42}$ (135,203), le rôle de PS2 sur le métabolisme de l'APP étant conforté par la mise en évidence d'une interaction de ces deux protéines dans le réticulum endoplasmique (312). Enfin, comme pour PS1, les mutations de PS2 semblent augmenter la mort neuronale par apoptose (313).

5.5. Conclusion.

A ce jour, trois gènes porteurs de mutations pathogènes ont ainsi pu être mis en évidence pour les formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer. La découverte de ces mutations a alors permis de comprendre certains aspects du dévelopement de la patholgie. Ainsi, leur impact semble pouvoir être médié par une modification du métabolisme de l'APP, en favorisant la sécrétion du peptide Aβ1-42 (Figure 10)

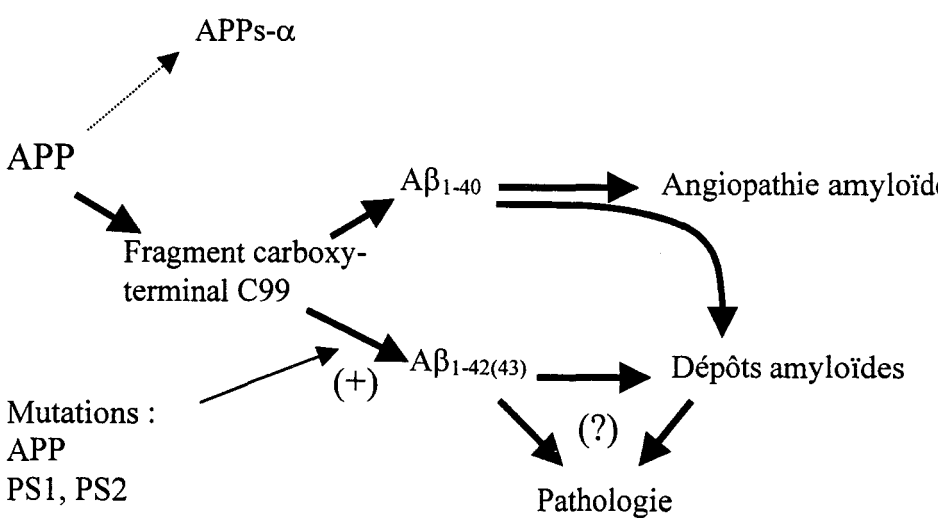


Figure 10: Mutations et cascade amyloïde (d'après (314)).

Les mutations du gène PS1 seraient responsables de 50 à 70 % des cas familiaux précoces et constitueraient donc la cause majeure de ces formes. Par contre, les mutations de PS-2 seraient rares (2%). Quant aux mutations sur l'APP, elles représenteraient environ 5% des formes familiales précoces. Il resterait donc au moins 20% de ces formes familiales, qui seraient inexpliquées, suggérant l'existence d'un ou plusieurs autres gènes mutés.

La très grande majorité des formes de la maladie d'Alzheimer est sporadique. La composante génétique de ces formes semble néanmoins importante. La découverte des gènes impliqués est donc un enjeu essentiel, que ce soit au niveau de la compréhension du développement de la maladie que dans un but d'aide au diagnostic et de prise en charge de l'affection.

6. Impact du gène de l'apolipoprotéine E sur la maladie d'Alzheimer.

L'existence d'antécédents familiaux comme facteur de risque majeur pour les formes de la maladie d'Alzheimer ne présentant pas un mode de transmission mendélien classique, a conduit à la recherche de facteurs de susceptibilité génétique, prédisposant au développement de cette pathologie. Du fait de la difficulté d'étudier la ségrégation de marqueurs polymorphes au cours des générations dans ces formes essentiellement tardives et en population, il a été alors développé une approche gène candidat pour rechercher ces facteurs de susceptibilité. A ce jour, la plus grande réussite de cette approche est la découverte d'un gène majeur, impliqué aussi bien dans les formes familiales que sporadiques de la maladie d'Alzheimer, le gène de l'apolipoprotéine E (*APOE*) localisé sur le chromosome 19.

6.1. L'approche gène candidat.

6.1.1. Principe.

Cette approche consiste à comparer les distributions génotypiques et alléliques d'un polymorphisme donné dans une population définie comme saine, et une population composée d'individus présentant une affection. Cette étude consistera à déterminer si un allèle de ce polymorphisme est préférentiellement associé ou non à la maladie. Si l'allèle est surreprésenté dans la population des malades, on parlera alors d'effet délétère de cet allèle. Inversement, si celui-ci est sous représenté, on parlera alors d'effet protecteur.

Le choix de l'étude d'un gène candidat et d'un de ses polymorphismes doit obéir à certains critères de sélection et n'est donc pas choisi au hasard : (i) Le gène testé doit correspondre à une hypothèse physiopathologique forte, permettant de comprendre le

développement de la maladie (ii) Le polymorphisme testé doit préférentiellement induire des modifications au niveau de l'activité biologique de la protéine. Le cas le plus simple est évidemment que ce polymorphisme induise un changement d'a.a. important pour la fonction de la protéine, mais celui-ci peut aussi conduire à une différence d'épissage ou à des variations d'expression du gène, modulant ainsi la quantité de protéines produites. Cependant, l'étude de polymorphismes sans impact connu sur la fonction ou l'expression du gène, peut aussi être réalisée. En effet, ceux-ci peuvent être en déséquilibre de liaison, préférentiellement associé sur un même chromosome avec un autre polymorphisme (voir annexe). L'association de ce type de polymorphisme avec une pathologie peut donc suggérer l'existence d'une autre mutation à proximité, potentiellement impliquée dans la maladie. (iii) Enfin, pour valider l'association d'un allèle d'un gène candidat avec la maladie, il est nécessaire d'établir des corrélations génotype/phénotype intermédiaires.

Si tous ces critères sont remplis, on pourra alors établir que le gène étudié est un facteur de susceptibilité génétique pour une pathologie donnée. Les résultats obtenus devront alors être confirmés par d'autres études indépendantes.

6.1.2. Biais et limites de cette approche.

Une association significative peut être due à un certain nombre de biais qu'il est nécessaire de prendre en compte. Ceux-ci peuvent être portés par la population elle même. Par exemple, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la difficulté à sélectionner une population malade, dépendra du diagnostic. En effet, on ne pourra sélectionner que des individus atteints de maladie d'Alzheimer "probable", induisant ainsi un certain pourcentage d'erreur sur le diagnostic. En fait, seul l'utilisation de banques composées de patients dont le diagnostic a été posé après examen neuropathologique, peut permettre de lever ce biais. Malheureusement ces

banques ne sont pas souvent représentatives de la population des malades. De même, il est nécessaire de s'interroger sur la représentativité de la population témoin qui est essentielle pour la détermination du risque de développer une pathologie. Par exemple, un recrutement de ce type de population en institution peut induire un biais de sélection, les démences y étant surreprésentées (315). L'étude des populations de taille suffisamment importante pour limiter le risque d'observer un effet significatif, exclusivement lié au hasard, est nécessaire. Ces grands échantillons permettent de tenir compte plus facilement des facteurs confondants majeurs que sont l'âge et le sexe. Enfin, il est nécessaire de s'assurer que la distribution génotypique observée du polymorphisme, est en équilibre de Hardy-Weinberg au moins chez les témoins (voir annexe). Si ceci n'est pas le cas, il est possible qu'une erreur de génotypage ait pu être faite ou qu'un biais de sélection non prévu existe dans la population témoin.

6.2. Choix du gène de l'*APOE*.

C'est en 1987 que le chromosome 19 a été décrit pour la première fois, impliqué dans la maladie d'Alzheimer. En effet, une association génétique d'un allèle du gène de l'apolipoprotéine CII (APOCII) avait été observé avec des formes familiales tardives de la maladie (316). Par la suite, l'existence d'un locus sur le chromosome 19 impliqué dans la pathologie, a été confirmé par la mise en évidence d'une liaison génétique en 19q13.2-13.3, ce locus contenant le gène de l'APOCII (317).

Parallèlement à ces études génétiques, l'APOE était mise en évidence dans les plaques séniles (50). L'APOE présentait une forte affinité pour le peptide Aβ et était susceptible de se comporter comme une protéine chaperonne pour ce peptide (318).

Or le gène de l'*APOE* étant localisé sur le chromosome 19 en q13.2-13.3 et plus exactement dans le même regroupement de gène que l'APOCI et l'APOCII, le recoupement de

toutes ces données a donc conduit à choisir l'*APOE* comme gène candidat.

6.3. Le gène de l'APOE

6.3.1. Structure et expression du gène.

Le gène de l'*APOE* s'étend sur 3597 bases et est composé de 4 exons. Son ARNm est de 1163 nucléotides et conduit à une protéine de 317 a.a.. Une fois le peptide signal de 18 a.a. excisé, la protéine mature obtenue est de 299 a.a., pour une masse apparente de 34 KDa.

L'APOE est produite dans de nombreux organes dont le foie, le cerveau, la rate, les poumons, les ovaires, les reins ainsi que les muscles (319,320). Cependant la majorité de la synthèse de cette protéine a lieu dans le foie, le cerveau étant le deuxième site de production à hauteur d'un tiers de ce qui est produit au niveau hépatique (Elshourgay et al, 1985). La production est très variable en fonction du type cellulaire. Ainsi, au niveau cérébral, les astrocytes et la microglie sont-elles les principales cellules produisant de l'APOE (321,322), tandis que les neurones semblent pouvoir eux aussi synthétiser cette molécule, mais en quantité nettement plus faible (323,324).

Les régions régulatrices du gène de l'*APOE* sont assez peu connues (Figure 11). Au niveau du promoteur, quatre séquences augmentant la transcription du gène, ont été décrites (325,326). Cependant, ces séquences ne semblent pas contrôler la spécificité de l'expression tissulaire de ce gène. Ainsi, la séquence URE1 n'est-elle pas sensible au type cellulaire. De façon similaire, même si l'augmentation de transcription liée aux séquences URE2 et IRE1 pourraient différer en fonction du type cellulaire, ces séquences sont fonctionnelles dans toutes les lignées testées (325).

En fait, les régions régulant la spécificité tissulaire de l'expression du gène de l'*APOE* se

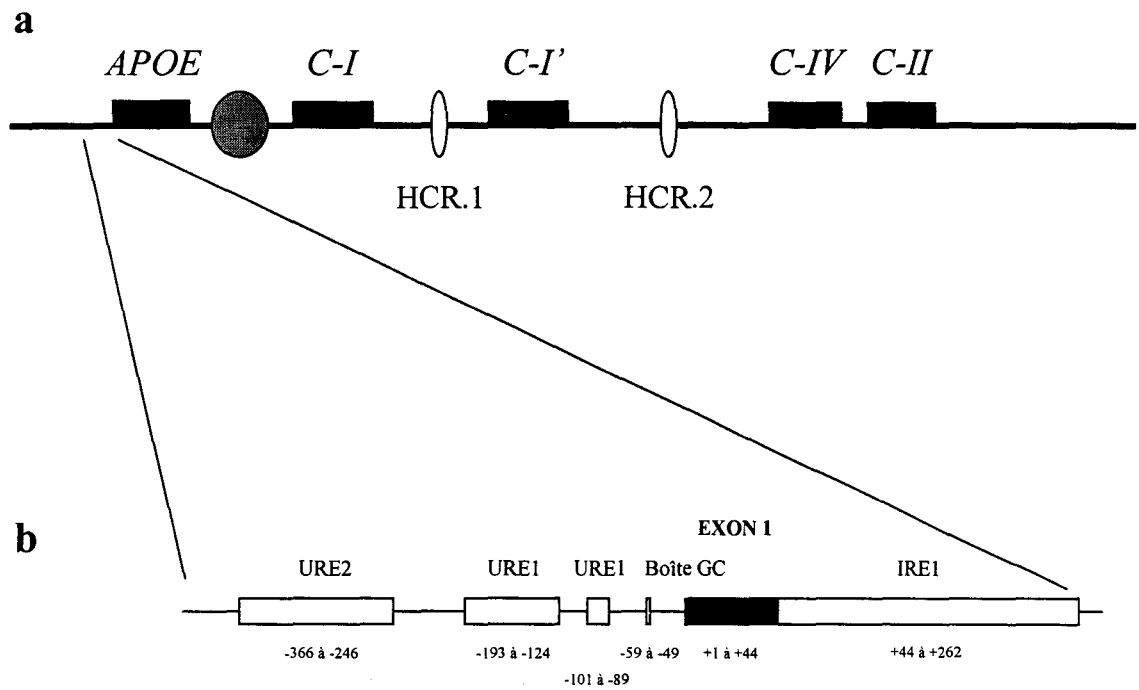


Figure 11 : *Séquences impliquées dans la régulation du gène de l'APOE.* **(a)** Régions régulatrices localisées dans le cluster de gène contenant l'APOE. Le cercle en gris resprésente une région importante pour l'expression cérébrale du gène de l'APOE. HCR, hepatic controlling region. **(b)** Promoteur du gène de l'APOE et cartographie des séquences importantes pour l'expression du gène. URE, upstream regulatory element. IRE, intronic regulatory element.

situent en aval de ce gène. Les éléments qui ont été les mieux caractérisés, sont des éléments contrôlant l'expression hépatique. Ces régions sont localisées à 15 kb (HCR.1) et 26 kb (HCR.2) en aval du gène de l'APOE (327). Même si ces deux éléments sont nécessaires et suffisants pour l'expression de l'APOE dans le foie, il semblerait que l'élément HCR.1 soit le plus important. En effet, cette région contient une séquence consensus permettant de fixer le facteur de transcription HNF-5, spécifique de l'expression hépatique (328). Au niveau cérébral, les séquences essentielles à l'expression de l'*APOE* dans cet organe sont peu connues. Il semblerait toutefois qu'une région à 1,7 kb en aval du gène de l'*APOE* soit nécessaire à son expression cérébrale (329).

6.3.2. Structure protéique.

L'APOE est organisée en trois domaines structuraux distincts ayant des propriétés biologiques différentes (Figure 12): (i) Un domaine N-terminal de structure globulaire hydrosoluble (résidus 1 à 164). Ce fragment a pu être cristallisé suite à l'action de la thrombine. Il présente quatre hélices α groupées dont trois sont particulièrement longues (de 28 à 36 résidus) (330). (ii) Un domaine C-terminal compris entre les résidus 201 et 299, riches en hélice α amphipatiques. (iii) Entre ces deux domaines, une région de structure aléatoire sensible au clivage protéasique (résidus 165 à 200). L'action de ces protéases en particulier plasmatiques, pourrait être inhibée par la glycosylation du résidu 194 (331).

Les domaines N- et C-terminaux sont définis comme les domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal correspond aux sites de liaisons aux différents récepteurs de l'APOE tandis que la région C-terminale correspond aux domaines d'interaction avec les lipides (332,333). En l'absence de ces lipides, ce domaine C-terminal permettrait la formation de tétramères d'APOE (334).

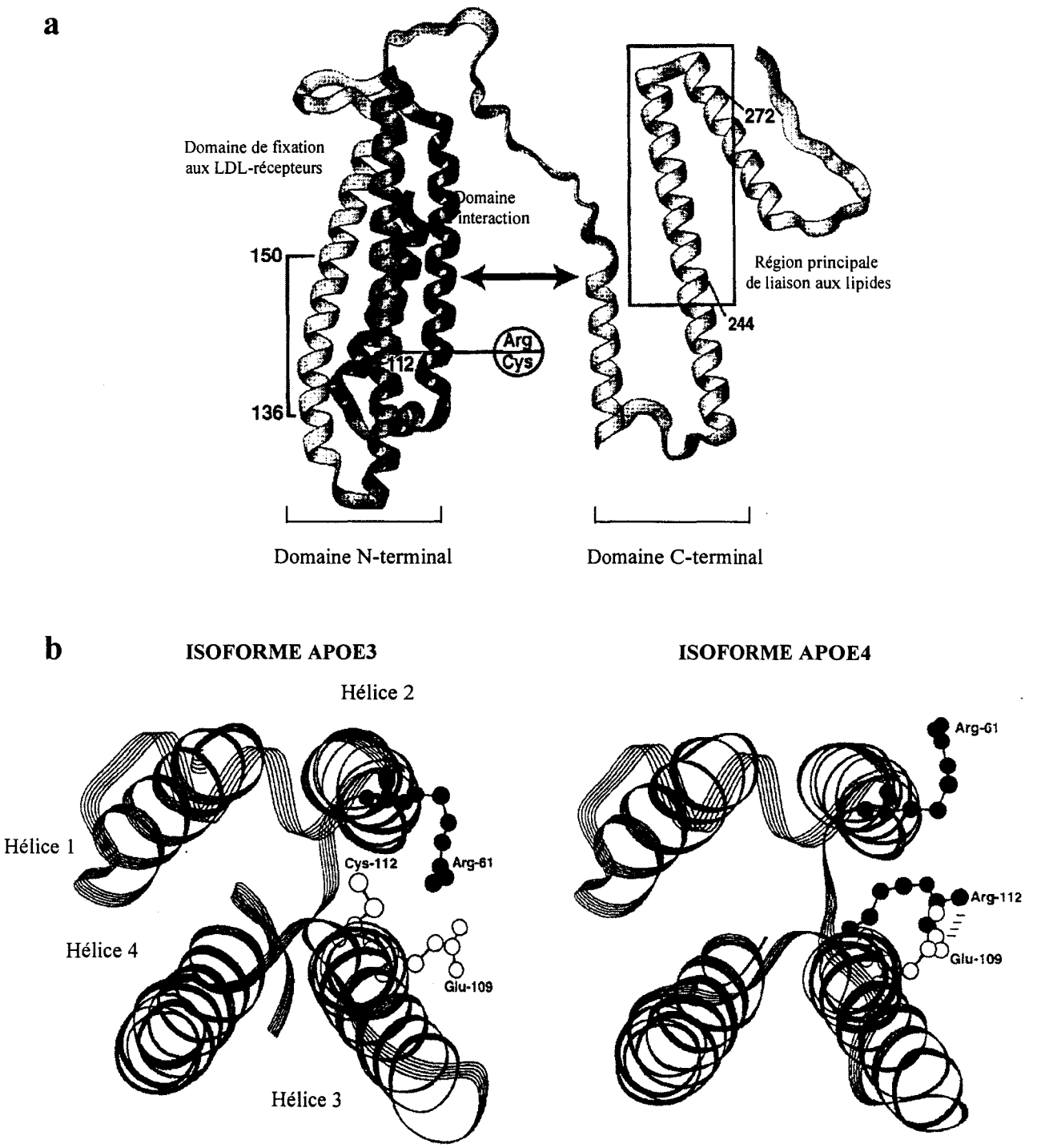


Figure 12 : *Représentation des structures tertiaires de l'APOE.* **(a)** Modélisation des principaux domaines structuraux de l'APOE. **(b)** Structure en 3 dimensions, déterminée par cristallographie d'un fragment de 22kDa des isoformes APOE3 et APOE4.

6.4. Fonction de l'APOE.

6.4.1. Métabolisme du cholestérol.

La fonction principale de l'APOE est la redistribution des lipides et en particulier du cholestérol, entre les différents organes ou cellules d'un même organe (335). En effet, l'APOE, associée aux chylomicrons, VLDL et HDL, permet la reconnaissance et la clairance de ces lipoprotéines via des récepteurs membranaires. Il peut s'agir du LDL-récepteur, présent à la surface de toutes les cellules et capable de reconnaître l'APOB et l'APOE, ou du récepteur des chylomicrons, présent uniquement sur les hépatocytes et strictement spécifique de l'APOE (336).

Au niveau des intestins, les chylomicrons riches en triglycérides exogènes sont sécrétés par les entérocytes dans la circulation. Ces triglycérides subissent alors l'action de la lipoprotéine lipase, permettant la libération d'acides gras libres récupérés entre autre par les adipocytes. Les chylomicrons remnants résultants de l'action de la lipoprotéine lipase, et contenant de l'APOB-48 et de l'APOE sont alors internalisés par les hépatocytes pour être dégradés via le récepteur des chylomicrons remnants (Figure 13).

Parallèlement, des lipoprotéines riches en triglycérides d'origine hépatique sont sécrétées par le foie. Leur contenu en triglycérides est hydrolysé par la lipoprotéine lipase, libérant des acides gras libres. Les particules résultant de cette hydrolyse peuvent alors suivre deux voies métaboliques : (i) Etre internalisées suite à la reconnaissance des APOB et/ou APOE par les LDL-récepteurs ou au niveau hépatique par les récepteurs des chylomicrons. (ii) Devenir progressivement des LDL, mécanisme probablement régulé par l'APOE. Les LDL ne contenant plus que l'APOB-100, sont alors capturés par les LDL-récepteurs (Figure 13).

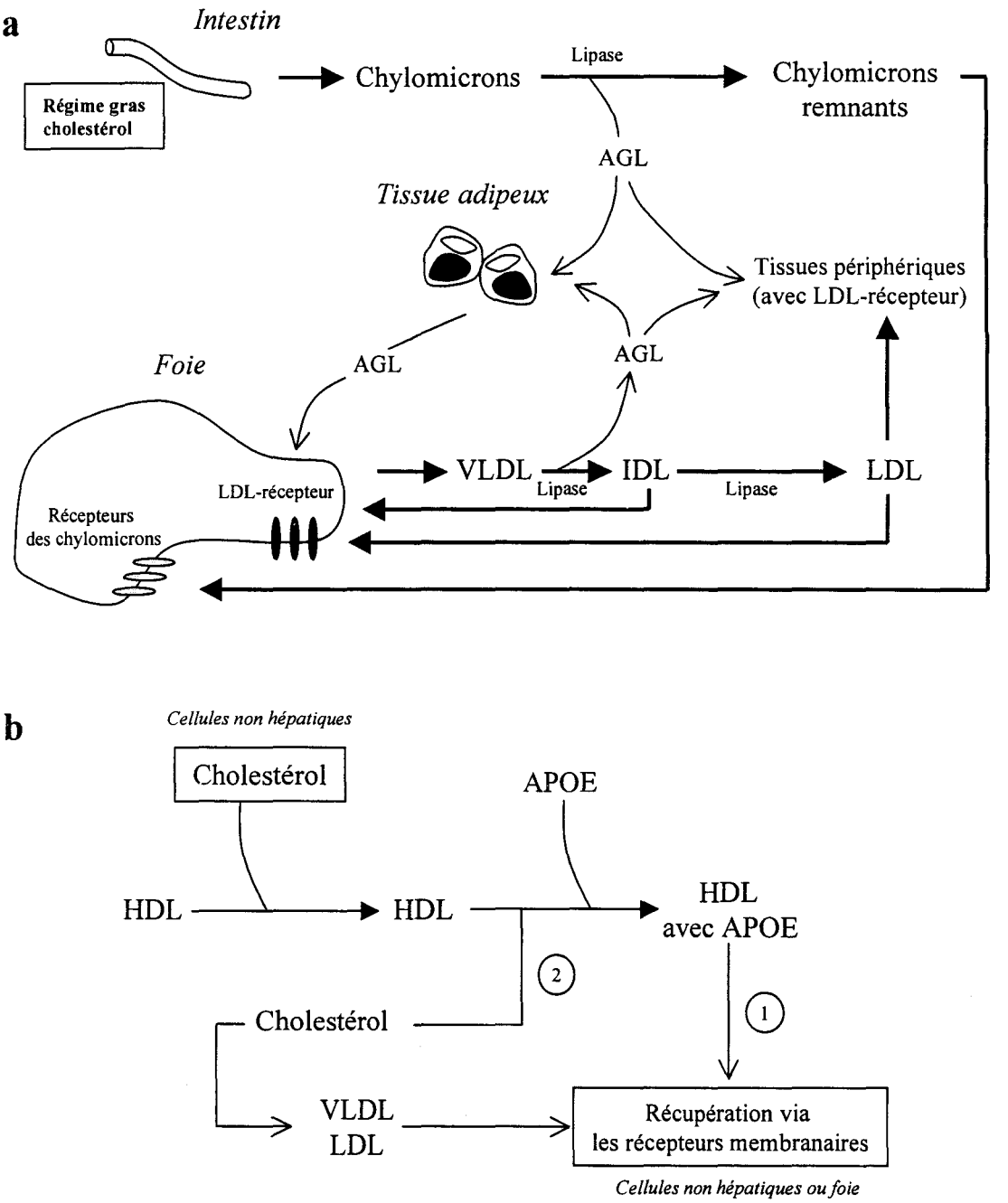


Figure 13 : *APOE et métabolisme lipidique.* **(a)** Schéma général résumant le métabolisme des Chylomicrons, VLDL, IDL et LDL. AGL, acide gras libre. **(b)** schéma décrivant le rôle des HDL dans l'acquisition du cholestrol des cellules contenant un excès de celui-ci et la redistribution du cholestérol vers les cellules en ayant besoin ou pour son élimination par le foie. (1) La présence d'APOE sur les HDL dirige ceux-ci vers les cellules présentant des récepteurs membranaires pour les lipoprotéines. (2) Alternativement, le cholestérol des HDL peut être transféré aux autres lipoprotéines, qui seront à leur tour captées par des récepteurs membranaires.

6.4.2. APOE et système nerveux central.

Le rôle de l'APOE au niveau du système nerveux central est peu connu. Cependant l'implication de cette molécule dans le transport et la distribution du cholestérol, a suggéré que l'APOEpouvait avoir un rôle important au niveau de la maturation, de la maintenance et de la régénération du système nerveux central.

6.4.2.1. Maturation et maintenance du système nerveux central.

L'observation d'une régulation de la croissance neuritique par l'APOE *in vitro*, suggère que cette molécule est impliquée dans la maturation cérébrale (337). Cependant, le fait que les fœtus de souris transgéniques $APOE^{-/-}$ ne présentent aucune altération significative du système nerveux central, contrairement à ce qui peut être observé chez les souris $APOE^{-/-}$ adultes et âgées, indique plutôt que l'APOE est essentielle à la maintenance du système nerveux central. Ces souris âgées déficientes en APOE présentent alors des déficits significatifs de l'apprentissage, mesurés par le test du labyrinthe d'eau de Morris (338,339). Ces déficits comportementaux résulteraient d'altérations synaptiques et dendritiques importantes aussi bien dans le néocortex que dans les structures limbiques, par rapport à ce qui peut être observé chez les souris normales (339). Ces modifications seraient accompagnées de phosphorylations anormales des protéines Tau (340) ainsi que de déficits cholinergiques (341). Cependant, cette dernière observation n'est pas systématiquement reproduite (342). Un autre argument appuyant le rôle majeur de l'APOE dans l'entretien du système nerveux central, résulte de l'observation d'une augmentation avec l'âge de la quantité d'APOE, chez des souris normales (343).

En fait, l'APOE pourrait aider à maintenir l'intégrité du complexe synaptodendritique

par plusieurs mécanismes : (i) Cette protéine joue un rôle important au niveau de la distribution du cholestérol, vers les neurones via un récepteur appelé LRP (Low density lipoprotein Related Protein), où il serait utilisé pour la synthèse de nouvelles terminaisons synaptiques (Poirier et al, 1991, 1993, 1994). (ii) L'APOE pourrait aussi aider à la stabilisation du squelette neuronal (344-347). (iii) Elle pourrait aussi réguler la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (348). (iv) Enfin, cette protéine pourrait moduler les interactions entre les neurones et la matrice extracellulaire (349).

6.4.2.2. APOE et lésion du système nerveux.

Après une lésion neuronale, du cholestérol non estérifié est libéré. Celui-ci est alors pris en charge par des lipoprotéines contenant de l'APOE. Il est finalement redistribué aux neurones pour permettre la réinnervation et la synthèse de nouvelles terminaisons synaptiques, via la voie du LDL-récepteur (350,351). En effet, ce récepteur est, entre autre, surexprimé durant le processus de régénération du système nerveux périphérique (352), soulignant le rôle central de l'APOE (353). Par la suite, ce mécanisme a été étendu au niveau du système nerveux central. En effet, il a été observé une surproduction d'APOE après une lésion du cortex entorhinal chez la souris. Le cholestérol non estérifié est libéré, estérifié puis redistribué aux neurones via l'APOE. Cette augmentation de production de l'APOE suite à une lésion, a par ailleurs été reproduite après un événement ischémique provoqué par arrêt cardiaque (354,355).

En fait, dans le système nerveux central, la surexpression de l'APOE semble être essentielle à ces mécanismes de régénération, contrairement à ce qui peut être observé au niveau du système nerveux périphérique. En effet, chez des souris knock-out APOE $^{-/-}$, la régénération du système nerveux périphérique a lieu (356), tandis que cette régénération ne

peut pas être obtenue au niveau du système nerveux central (339). Ces observations peuvent être expliquées par plusieurs mécanismes : (i) Au niveau périphérique, la déficience en APOE peut être compensée par une surproduction d'APOD, A-I et A-IV (352,356). (ii) Les neurones ont besoin d'APOE pour incorporer les lipides dans leurs membranes, n'étant pas capables de produire leur propre cholestérol (357).

Enfin, le rôle de l'APOE dans la maintenance et la régénération du système nerveux central pourrait ne pas être limité au transport du cholestérol. Cette protéine pourrait être aussi impliquée dans la régulation d'autres facteurs produits par les cellules gliales suite à une lésion. Ainsi, la cytokine TGF-β1 (Transforming Growth Factor) induit la synthèse d'APOE par les macrophages (358,359) de même que l'EGF (Epidermal Growth Factor). Par contre la combinaison de cytokines telles que l'IL-1, les interférons α et β et le FGF (Fibroblast Growth Factor), réduisent la sécrétion d'APOE (360). En fait, la régulation de la production d'APOE par ces cytokines semble complexe et encore très mal connue.

6.5. Variants du gène de l'APOE.

6.5.1. Polymorphismes et mutations connues.

Du fait du rôle physiologique essentiel joué par l'APOE, une recherche de polymorphismes et mutations a été réalisée de façon systématique sur ce gène. A ce jour, 22 mutations modifiant la structure protéique ont été déterminée (Tableau 4). La plupart de ces mutations sont exoniques. Par ailleurs, une substitution d'un A en G, localisée en position -2 de l'exon 3 provoque un épissage anormal de l'exon 3 (361).

La plupart de ces modifications de séquence ont été mises en évidence dans des formes familiales d'hypercholestérolémie et sont donc rares. Cependant, les polymorphismes aux

codons 112 et 158 sont fréquents et permettent de définir les trois allèles majeurs du gène de l'APOE. L'allèle ε3 est caractérisé par une arginine au codon 112 et une cystéine au codon 158, tandis que l'allèle ε4 diffère par une arginine au codon 158 et l'allèle ε2 par une cystéine au codon 112. Les isoformes correspondantes sont alors appelées APOE3, APOE4 et APOE2, respectivement. Même s'il semble que l'allèle ε4 soit l'allèle ancestral (362,363), c'est l'allèle ε3 qui est le plus fréquent dans les populations caucasiennes (de l'ordre de 80%). Les allèles ε2 et ε4 sont plus rares à hauteur respectivement, de 8% et 12%.

Codon	Nucléotide	Acide aminé	Référence
13	GAG→**A**AG	Glu→Lys	(364)
20	TGG→TG**A**	Trp→Stop	(365)
28	CTG→C**C**G	Leu-Pro	(366)
31	Délétion: CTG**g**GTC	60 Stop	(367)
112	TGC→**C**GC	Cys→Arg	(368)
127	GGC→G**A**C	Gly→Asp	(369)
136	CGC→C**A**C	Arg→His	(370)
	→**A**GC	→Ser	(371)
	→**T**GC	→Cys	(372)
142	CGC→C**T**C	Arg→Leu	(373)
	→**T**GC	→Cys	(374)
145	CGT→**T**GT	Arg→Cys	(371)
146	AAG→**C**AG	Lys→Gln	(368)
	→**G**AG	→Glu	(375)
158	CGC→**T**GC	Arg→Cys	(376)
187	CAG→**G**AG	Gln→Glu	(377)
209-212	Délétion : GG**cctggggcga**GC	260 Stop	(378)
210	TGG→T**A**G	Trp→Stop	(379)
228	CGC→**T**GC	Arg→Cys	(380)
244	GAG→**A**AG	Glu→Lys	(381)

Tableau 4: Liste des différentes mutations codantes connues situées sur le gène de l'*APOE*.

6.5.2. Impact des allèles majeurs du gène de l'*APOE* sur le métabolisme du cholestérol.

L'impact des polymorphismes aux codons 112 et 158 est assez bien connu en ce qui concerne les taux lipidiques dans le compartiment plasmatique. Ainsi dès 1979, Utermann *et*

al. ont observé que dans la population générale, les sujets homozygotes pour l'allèle ε2 (ε2/ε2) présentaient des concentrations de cholestérol total et de cholestérol associé aux LDL (LDL-cholestérol), plus faibles que les sujets ε3/ε3 (382). En revanche, les individus caucasiens porteurs d'au moins un allèle ε4, présentaient des concentrations plasmatiques en cholestérol total et LDL-cholestérol supérieurs au sujets ε3/ε3 (383).

Finalement suite aux très nombreuses études menées et malgré leurs grandes diversités, les associations relevées entre les concentrations plasmatiques du cholestérol et les génotypes de l'APOE se sont avérées être constantes, les génotypes s'ordonnant ainsi : ε2/ε2-ε3/ε2-ε3/ε3-ε4/ε2-ε4/ε3 et ε4/ε4, du taux le plus bas vers le taux le plus élevé en cholestérol (384).

Ces observations s'expliquent essentiellement par une affinité différente de ces isoformes pour leurs récepteurs. Ainsi l'APOE2 présente-t-elle une diminution importante de son affinité aux LDL récepteurs par rapport à l'isoforme APOE3 (estimée à 2% de cette affinité) (385). Cette déficience se traduit par un transfert ralenti des chylomicrons et VLDL remnants dans les hépatocytes et donc une accumulation de ces particules dans le plasma. Par ailleurs, l'APOE2 serait également associée à une altération de l'activité des lipases aboutissant à un défaut de conversion des VLDL en LDL et donc à une diminution de production des LDL, accentuant ainsi l'accumulation des VLDL (386). Toutes ces modifications liées à l'APOE ont pour conséquence d'entraîner une déplétion du contenu intracellulaire en cholestérol et une stimulation de la synthèse des LDL-récepteurs. Ceci aboutit donc à accentuer la diminution de la concentration de LDL-cholestérol dans le compartiment plasmatique.

Contrairement à l'APOE2, l'APOE4 présente une affinité aux LDL-récepteurs similaire à ce qui est observé pour l'APOE3 (385). Par ailleurs, la conversion des VLDL en LDL est très rapide. Ainsi, les chylomicrons et les VLDL sont catabolisés très efficacement (387),

tandis que les LDL sont également recaptés par les hépatocytes. Ceci a alors pour conséquence d'inhiber la synthèse des LDL-récepteurs en raison d'une concentration intracellulaire en cholestérol trop importante au niveau des hépatocytes. Finalement, on observe une augmentation de la concentration plasmatique du LDL-cholestérol. Il est intéressant de noter que l'impact de l'allèle ε4 sur le taux de LDL-cholestérol circulant a été suggéré comme explication de l'augmentation du risque de développer un infarctus du myocarde associé à cet allèle. En effet, le LDL-cholestérol est considéré comme athérogène, favorisant la formation des plaques d'athérosclérose au niveau des parois artérielles (335).

6.6. *APOE* et maladie d'Alzheimer.

6.6.1. Impact des allèles de l'*APOE* sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer.

C'est en 1993 qu'a été décrite pour la première fois, l'association de l'allèle ε4 avec la maladie d'Alzheimer (318). En effet, cette première étude montrait que la fréquence de l'allèle ε4 était augmentée jusqu'à 40% dans une population atteinte de formes familiales tardives de la pathologie. Cette association a été confirmée par de très nombreuses études (388) et étendue aux formes sporadiques tardives ainsi qu'à certaines formes précoces de la maladie (389-391) (392,393). Peu d'études ont rapporté une absence d'association (394). Enfin, à l'inverse de l'effet délétère de l'allèle ε4, l'allèle ε2 a été décrit présentant un effet protecteur (395-397).

En conclusion, il a été récemment estimé que le gène de l'*APOE* pourrait être impliqué dans 45 à 60% des cas de maladie d'Alzheimer(388).

	Etudes cliniques et autopsique	Etudes de populations
APOE	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
ε2/ε2	0,6 [0,2-2,0]	0,9 [0,3-2,8]
ε2/ε3	0,6 [0,5-0,8]	0,6 [0,5-0,9]
ε3/ε3	1 (référence)	1 (référence)
ε2/ε4	2,6 [1,6-4,0]	1,2 [0,8-2,0]
ε3/ε4	3,2 [2,8-3,8]	2,7 [2,2-3,2]
ε4/ε4	14,9 [10,8-20,6]	12,5 [8,8-17,7]

Tableau 5 : Impact des différents génotypes du gène de l'*APOE* sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer (D'après (388)). OR, Odds ratio; IC, intervalle de confiance.

D'autres données confortent l'impact de l'allèle ε4 sur la maladie d'Alzheimer. Ainsi, existe-t-il une relation dose-effet entre le risque de développer la maladie d'Alzheimer et le nombre de copies d'allèles ε4 présent chez un individu (398) (Tableau 5). De plus, l'âge d'apparition de la maladie diminue en fonction du nombre d'allèle ε4. Les individus homozygotes ε4/ε4 débutent la maladie plus précocement que les individus ne possédant pas d'allèle ε4, les individus hétérozygotes ayant un âge de début de maladie intermédiaire (398). Au niveau de l'évolution de la maladie, l'allèle ε2 serait associé à une mortalité plus importante chez des patients atteints de formes précoces par rapport aux patients génotypés ε3/ε3 (399). En revanche, les individus porteurs d'un allèle ε4 présenteraient une diminution de la mortalité (399-401). En fait, plusieurs travaux suggèrent que la durée de la maladie est plus longue chez les malades, porteurs d'un allèle ε4 (400-403). Ces différentes observations ont d'ailleurs conduit certains auteurs à émettre l'hypothèse que l'association de l'allèle ε4 avec la pathologie pouvait n'être due qu'à cette durée plus longue de la maladie, provoquant alors

une augmentation de la fréquence de cet allèle dans les études de type cas-témoins. Toutefois, récemment une étude longitudinale menée sur un suivi de 5 ans, a établi que l'allèle ε4 est bien un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer, mais semblerait être un faible déterminant de la survie des individus (404). Enfin, une étude a décrit que les individus porteurs d'au moins un allèle ε4, présentaient une altération plus lente des résultats de leurs tests cognitifs (405). Cependant cette relation entre le génotype de l'*APOE* et ces résultats aux tests psychométriques n'a pas été mise en évidence par la plupart des études (400,401,406-408).

6.6.2. Corrélations entre allèle ε4 et lésions neuropathologiques.

Enfin, un certain nombre de données neuropathologiques confortent l'impact de l'allèle ε4 sur le développement de la maladie d'Alzheimer. L'allèle ε4 serait corrélé à une augmentation du nombre de dépôts amyloïdes (409-412), même si ce résultat n'a pas été systématiquement retrouvé par toutes les études (413). Cependant, cette corrélation a été aussi mise en évidence au niveau de l'angiopathie amyloïde (414,415) et retrouvée chez des individus non dément (411,416). Concernant la DNF, les données sont beaucoup plus contradictoires. Ainsi certaines études montrent que le génotype de l'*APOE* pourrait moduler le nombre de DNF (412,417,418) tandis que d'autres ne retrouvent aucune corrélation (411,413,414,419).

6.6.3. Facteurs modulant l'impact du gène de l'*APOE*.

6.6.3.1. Influence de l'âge sur le risque associé à l'allèle ε4.

Certains facteurs modulent de façon importante le risque associé à l'allèle ε4. L'un des plus marqué est l'âge. Par une méta-analyse, Farrer *et al.* ont montré que l'impact de l'*APOE* ne semble être apparent qu'entre 40 et 90 ans, et en fait diminuerait après 70 ans (388). Une tendance similaire avait par ailleurs été observée dans une population française, l'allèle ε4 n'influençant la maladie qu'entre 60 et 79 ans (420). De plus, l'allèle ε4 n'aurait aucun impact sur le risque de développer l'affection si les individus survivent à des âges très avancés (421). Une relation similaire avait d'ailleurs déjà été décrite, le risque de développer la maladie d'Alzheimer étant indépendant du génotype de l'APOE dans une population centenaire finlandaise (422).

En fait, il a été proposé que le génotype de l'APOE puisse prédire "quand mais pas si" quelqu'un est prédisposé à développer la maladie d'Alzheimer. L'allèle ε4 contrôlerait l'âge d'apparition de la maladie en fonction d'autres facteurs génétiques prédisposant réellement à la pathologie et induisant une vulnérabilité ou une invulnérabilité (421). La notion de protection vis à vis de la maladie d'Alzheimer pour les populations très âgées a d'ailleurs été récemment soulignée par la mise en évidence de facteurs génétiques protecteurs ségrégeant dans certaines familles (423).

6.6.3.2. Influence du sexe sur le risque associé à l'allèle ε4.

Le sexe est lui aussi, un important déterminant du risque associé à l'allèle ε4. En effet, en assumant un modèle de transmission autosomique dominante pour cet allèle, Rao *et al.* ont

suggéré que les formes familiales tardives associées à cet allèle, sont complètement pénétrantes chez les femmes tandis que seulement 62 à 65% des hommes développeraient la pathologie (424). Cette différence entre homme et femme a été aussi confirmée au niveau des formes sporadiques puisque le risque est nettement supérieur pour les femmes que pour les hommes (388). Cependant il est important de noter qu'il peut exister un certain nombre de biais, susceptibles d'expliquer ces résultats : (i) Les femmes ont une espérance de vie presque supérieure de 10 ans aux hommes. (ii) Les hommes présentent une mortalité due à des pathologies vasculaires beaucoup plus importante que les femmes aux alentours de 50 ans. Or, l'allèle ε4 est un facteur de risque de ces pathologies (425).

6.6.3.3. Influence de l'ethnie sur le risque associé à l'allèle ε4.

Enfin, la fréquence de l'allèle ε4 n'est pas identique en fonction des populations étudiées. Ainsi, pour les populations européennes, un gradient décroissant du Nord au Sud (au alentours de 20% en Scandinavie et de l'ordre de 7% autour du bassin méditerranéen) existe pour la fréquence de l'allèle ε4 (426). De même, les africains présentent-ils une fréquence très élevée de l'allèle ε4, proche des 40 % dans la population générale. Ce pourcentage élevé se retrouve d'ailleurs au niveau des populations américaines d'origine africaine pour lesquelles le pourcentage d'allèle ε4 est de l'ordre de 20% (388,427,428). Enfin, la fréquence de l'allèle ε4 est très faible dans les populations japonaises, moins de 9 % (388). Ces observations ont donc conduit à penser que l'impact de l'allèle ε4 pouvait être différent entre les différentes populations étudiées.

En fait, l'impact des génotypes de l'*APOE* sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer paraît très hétérogène en fonction des groupes ethniques. Ainsi, cet impact est le plus élevé chez les japonais mais est beaucoup faible au niveau des autres ethnies (Tableau 6).

	Populations Afro-américaines	Populations Hispaniques	Populations Japonaises
APOE	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
ε2/ε2	2,4 [0,3-22,7]	2,6 [0,2-33,3]	1,1 [0,1-17,2]
ε2/ε3	0,6 [0,4-1,7]	0,6 [0,3-1,3]	0,9 [0,4-2,5]
ε3/ε3	1 (référence)	1 (référence)	1 (référence)
ε2/ε4	1,8 [0,4-8,1]	3,2 [0,9-11,6]	2,4 [0,4-15,4]
ε3/ε4	1,1 [0,7-1,8]	2,2 [1,3-3,4]	5,6 [3,9-8,0]
ε4/ε4	5,7 [2,3-14,1]	2,2 [0,7-6,7]	33,1 [13,6-80,5]

Tableau 6 : Impact des différents génotypes du gène de l'*APOE* en fonction de l'origine ethnique sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer (388).

Ces variations pourraient être expliquées par plusieurs observations : Des facteurs environnementaux peuvent être d'importants déterminants de la pathologie. Par exemple, un faible niveau d'éducation est un facteur de risque reconnu pour la maladie d'Alzheimer. Toutefois, Tang et al. observent que le risque de développer la maladie d'Alzheimer est 4 fois supérieur chez les populations afro-américaines et 2 fois supérieurs chez les populations hispaniques par rapport aux populations caucasiennes, malgré un ajustement sur le sexe et le niveau d'éducation (428). Ces données suggèrent donc qu'un patrimoine génétique différent pourrait exister entre ces différentes ethnies, favorisant ou au contraire masquant l'effet de l'allèle ε4.

Cependant que ce soit au niveau environnemental ou génétique, ces variations entre ethnies sont très mal documentées.

6.6.3.4. Influence de quelques facteurs environnementaux.

Un certain nombre de facteurs environnementaux peuvent augmenter le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Cependant, l'interaction entre ces facteurs et des déterminants génétiques tel que l'allèle ε4 de l'APOE sont encore peu étudiés.

Ainsi les individus fumeurs et ne possédant pas d'allèle ε4, ont un risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer que des individus fumeurs avec un allèle ε4 (429). Cet impact a plus spécifiquement été décrit pour des populations incluant des cas précoces de la maladie d'Alzheimer. Dans ce cas, l'allèle ε4 semble présenter un effet protecteur pour des individus fumeurs et présentant une histoire familiale forte (430). Cependant, cette relation n'a pu être systématiquement reproduite (431). Confortant ces résultats, une étude longitudinale récente montre que les individus fumeurs possédant un allèle ε4 présentent une détérioration moins importante de leurs fonctions cognitives par rapport aux individus fumeurs mais ne portant pas cet allèle (432).

Le génotype de l'APOE pourrait aussi influencer le développement d'une démence dans les suites d'un traumatisme crânien. En effet, les individus ayant subi ce type d'accident, ont un risque accru de développer une démence de type Alzheimer s'ils sont porteurs de l'allèle ε4 (217,433). Par ailleurs, les individus porteurs d'un allèle ε4 ont un plus faible pouvoir de récupération, comparés aux autres victimes d'un traumatisme crânien (434).

6.6.4. Spécificité de l'association de l'allèle ε4 avec la maladie d'Alzheimer ?

Très rapidement après la découverte de l'association de l'allèle ε4 avec la maladie d'Alzheimer, la question s'est posée de savoir si cette association était spécifique de cette pathologie ou pouvait être retrouvée dans d'autres maladies.

6.6.4.1. Trisomie 21.

Les individus souffrant de trisomie 21, présentent une copie surnuméraire du gène de l'APP et développent très rapidement des lésions de type Alzheimer au niveau cérébral puis pour certains une démence après leur quatrième décade. Les premières études ne différenciaient pas les individus présentant ou non une démence et il n'était donc pas surprenant de ne trouver aucun impact du gène de l'*APOE* sur la trisomie 21 (435,436). La différenciation des cas déments et non déments a alors permis de mettre en évidence un retard de l'apparition de la démence et une augmentation de la longévité des individus porteurs de l'allèle ε2 (437-439), résultat similaire à ce qui peut être observé dans une population de centenaires (328). De même, chez les individus non déments, l'allèle ε2 est associé à de meilleures fonctions cognitives (440), tandis que les individus non déments porteurs d'au moins un allèle ε4 présentent un déclin cognitif plus rapide (441), identique à ce qui est observé dans une population âgée saine.

Cependant, malgré ces observations, les premières études cas-témoins n'ont pu montrer de différences de distribution des allèles de l'*APOE* entre les populations démentes et non démentes (442,443). Cette absence d'association pourrait résulter de la faible puissance statistique de ces études mais aussi du fait que les individus homozygotes ε4ε4 semblent avoir une longévité réduite (444,445). Cependant, une méta-analyse a permis de mettre en évidence un rôle protecteur de l'allèle ε2 pour la démence chez les sujets atteints de trisomie 21 (439), résultat confirmé par la suite par deux études indépendantes (446,447). Toutes ces données suggèrent donc un impact de l'*APOE* et en particulier un effet protecteur de l'allèle ε2, sur le risque de développer une démence chez les individus trisomiques. L'effet de l'*APOE* sur l'âge d'apparition de la démence chez ces individus, est à mettre directement en rapport avec ce qui est observé dans les formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer. En effet, l'âge

d'apparition de la maladie n'est pas modifié par l'APOE chez les individus présentant des mutations sur les gènes PS1 et PS2 (443,448,449). Par contre, celui-ci semble être modulé comme observé pour les individus trisomiques déments, chez les malades présentant une mutation sur le gène de l'APP (437). Ces données suggèrent donc que l'impact de l'*APOE* pourrait être masqué par les formes très agressives de la maladie d'Alzheimer mais influencerait la pathologie liée au gène de l'APP, suggérant ainsi un rôle de l'APOE au niveau du métabolisme de l'APP et/ou de la formation des dépôts amyloïdes.

6.6.4.2. *APOE* et pathologies neurodégénératives.

En dehors de la trisomie 21, l'impact du gène de l'APOE a été testé sur de nombreuses maladies neurodégénératives dont les caractéristiques neuropathologiques peuvent être communes à la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, pour les démences à corps de Lewy, pathologies présentant peu ou pas de dégénérescence neurofibrillaire mais de nombreux dépôts amyloïdes, l'allèle ε4 est associé à une augmentation du risque de développer la maladie (450-453). De plus, cet allèle a été décrit comme influençant la formation des lésions neuropathologiques au cours de cette démence (454). De même pour la maladie de Creutzfeldt-Jacob, présentant des dépôts amyloïdes principalement constitués de la protéine prion, l'allèle ε4 a été aussi décrit comme facteur de risque (455), tandis que l'allèle ε2 semblerait retardé la mort des individus (455,456). Ces résultats n'ont pu être systématiquement reproduits, les populations étudiées étant par ailleurs de très petites tailles (457-459). Enfin, l'allèle ε4 est un facteur de risque de l'épilepsie, lorsque cette pathologie neurospychiatrique est associée à la présence de dépôts amyloïdes (161).

Par contre, à l'inverse des maladies présentant une amyloïdogénèse, les pathologies

essentiellement caractérisées par une dégénérescence neurofibrillaire ne présentent pas d'association avec l'allèle ε4. Ceci est le cas pour la paralysie supranucléaire progressive mais également pour les différentes formes de sclérose latérale amyotrophique (460-464). De même, l'âge de début de maladie n'est pas corrélé au génotype de l'APOE pour les individus présentant des mutation sur le gène Tau, responsables des démences fronto-temporales associées à un syndrome parkinsonien (465).

En ce qui concerne la maladie de Parkinson, les premières études n'ont rapporté aucune différence significative entre patients et témoins, pour les distributions alléliques et génotypiques du gène de l'APOE (466,467). Cependant en différenciant les individus présentant une démence de type Alzheimer de ceux non déments, les résultats obtenus semblent plus contradictoires. En effet, certaines études montrent que l'allèle ε4 est un facteur de risque pour les individus associant une maladie de Parkinson et une démence (468-471),tandis que d'autres ne retrouvent aucune relation de ce type (472,473). Néanmoins il semblerait que l'allèle ε4 puisse moduler l'âge d'apparition de la maladie de façon similaire à ce qui est observé pour la maladie d'Alzheimer (469,474,475), mais aussi influencer le développement des corps de lewy (470).

Ainsi, les études d'association du gène de l'APOE avec d'autres maladies neurodégénératives, ont conduit à suggérer que l'allèle ε4 n'était essentiellement associé qu'à des pathologies présentant une amyloïdogénèse. Ces résultats semblent donc cohérents avec les travaux décrivant l'impact de l'allèle ε4 sur les dépôts de substances amyloïdes et le manque de consensus obtenu pour la formation de la dégénérescence neurofibrillaire (section 6.6.2.).

6.7. Hypothèses d'action de l'APOE sur le développement de la pathologie.

A ce jour, de très nombreuses hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'action de l'isoforme APOE4 sur le développement de la maladie d'Alzheimer, aucune ne permettant réellement de dégager un consensus.

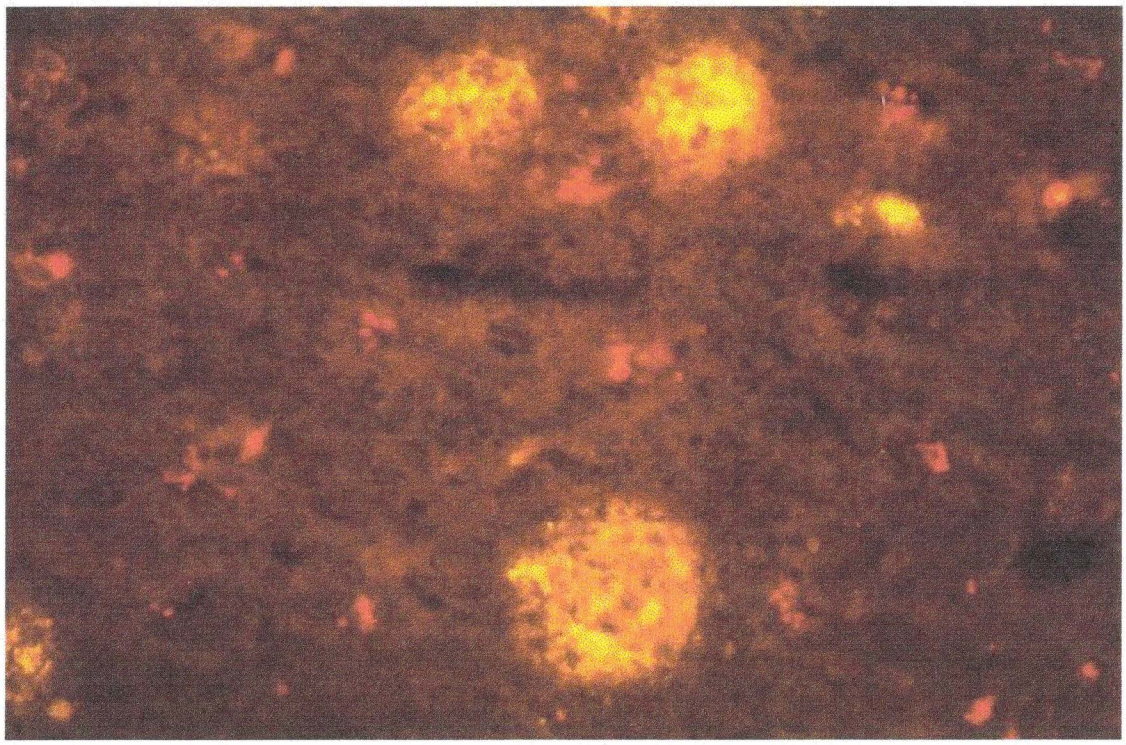
6.7.1. Formation des dépôts amyloïdes.

Comme décrit précédemment, l'allèle ε4 serait corrélé à la quantité de dépôts amyloïdes dans le cerveau aussi bien chez les patients que les témoins (paragraphe 6.6.2.). De même, les pathologies montrant une association avec l'allèle ε4, sont principalement des maladies caractérisées par une amyloïdogénèse (paragraphe 6.6.4.). De fait, il a été supposé que l'APOE pouvait participer à la formation de ces dépôts, hypothèse soutenue par la mise en évidence de cette protéine dans les plaques séniles (Figure 14) (50), mais aussi par le fait que les individus porteurs d'un allèle ε4 ayant subi un traumatisme crânien, présentent davantage de dépôts amyloïdes que les individus sans allèle ε4 (476). Cependant certains arguments conduisent à des hypothèses physiopathologiques opposées: l'APOE pourrait faciliter ou au contraire inhiber la formation des plaques amyloïdes.

6.7.1.1. APOE, cofacteur de l'amyloïdogénèse ?

De nombreux travaux *in vitro* montrent que l'APOE est capable de faciliter la conversion du peptide amyloïde soluble en fibrilles amyloïdes (103,477-479). La plupart de ces études décrivent des propriétés biochimiques différentes pour les isoformes de l'APOE, les isoformes APOE4 et APOE2 étant respectivement plus ou moins efficaces (318,477).

a



b

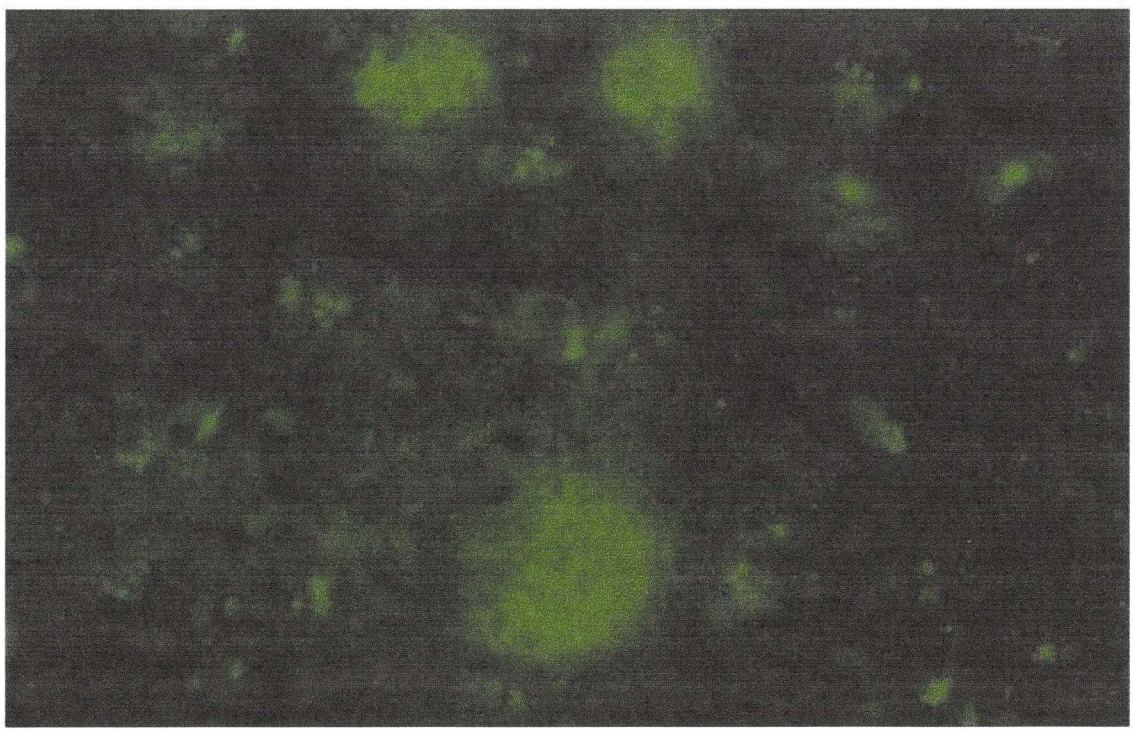


Figure 14 : Analyse immunohistochimique d'une coupe de cortex frontal d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer en double marquage avec **(a)** un anticorps polyclonal dirigé contre la région carboxy-terminale de l'APOE et **(b)** avec un anticorps monoclonal anti-$A\beta_{(8\text{-}17)}$. Cette technique permet de montrer que les mêmes dépôts amyloïdes sont immunomarqués par les deux anticorps. Echelle 25 μm.

Si l'APOE est un cofacteur de l'amyloïdogénèse, une augmentation de la quantité d'APOE pourrait favoriser la formation des dépôts. Soutenant cette possibilité, des souris transgéniques humanisées pour le gène APP^{V717F}, présentent une quantité de dépôts amyloïdes, positivement corrélée au nombre de copies du gène de l'APOE d'origine murine (480). Par ailleurs, la notion de surproduction d'APOE pouvant favoriser la formation des dépôts, est soutenue par la surexpression de ce gène dans le cerveau des malades par rapport aux témoins (481,482).

6.7.1.2. APOE, inhibiteur de l'amyloïdogénèse ?

Cependant, d'autres études ont rapporté un rôle inhibiteur de l'APOE sur la formation des fibrilles (483,484). Dans ce cas, l'isoforme APOE2 serait la plus efficace, tandis que l'isoforme APOE4 serait la moins efficace, l'isoforme APOE3 ayant un effet intermédiaire (483,485). Ces données ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle l'APOE pourrait servir à éliminer le peptide Aβ. En effet, il a été montré que dans des conditions physiologiques, une quantité significative de peptide Aβ soluble, aussi bien dans le plasma que dans le LCR, est associée aux lipoprotéines contenant de l'APOE (486,487). Il a été suggéré que lorsque le peptide Aβ est complexé à de telles particules, les récepteurs de l'APOE pourraient moduler la quantité de peptide Aβ soluble ou sous forme de fibrilles par un mécanisme d'élimination cellulaire (488). De plus, facilitant cette action, le peptide Aβ associé à l'APOE serait plus sensible à l'action de protéases que lorsqu'il n'est pas complexé à cette molécule (489).

Ces résultats suggèrent donc qu'une augmentation de la quantité d'APOE inhiberait la formation des dépôts amyloïdes. Cette hypothèse semble être soutenue par la mise en évidence d'une diminution des dépôts amyloïdes en fonction du nombre de copie du gène de

l'APOE dans le cerveau de souris transgéniques humanisées pour le gène de l'APP^{V717F} et de l'APOE (490).

6.7.1.3. Vers une troisième voie ?

Ainsi les résultats obtenus sont très contradictoires et en fait, semblent dépendre des méthodologies suivies. Ainsi, un facteur important serait-il l'utilisation d'APOE complexée ou non aux lipoprotéines, l'interaction de cette molécule avec le peptide Aβ dépendant alors de ce facteur (484,491). Concernant les souris transgéniques, le fait que l'APOE soit d'origine murine ou humaine, explique probablement en parti, les résultats contradictoires obtenus. En effet à ce jour, aucune étude n'a comparé les propriétés biochimiques des APOE murine et humaine. Il est possible que ces APOE n'aient pas les mêmes affinités pour leurs récepteurs ou pour le peptide Aβ. Ainsi, à certaines concentrations, l'APOE murine pourrait faciliter l'amyloïdogénèse tandis que l'APOE humaine l'inhiberait. Cependant malgré ces biais importants, l'APOE qu'elle soit murine ou humaine, semble modifier le dépôt précoce du peptide Aβ dans le tissu cérébral. De même, les études *in vitro* suggèrent un impact de l'APOE sur la formation des dépôts amyloïdes, même si les mécanismes qui en découlent, semblent être très différents en fonction des études.

Récemment, de nouveaux résultats permettent une nouvelle interprétation en tenant compte des deux hypothèses décrites précédemment (Figure 15). En effet, il a été observé que le complexe soluble APOE-Aβ ne présente pas la même stabilité si celui-ci est purifié à partir de tissu cérébral de malades ou de témoins. Le complexe le plus stable est alors retrouvé chez les témoins (489). De plus, la quantité de ce complexe soluble dans le cerveau est nettement plus importante chez les témoins que chez les malades (489). L'instabilité relative de la liaison de ces deux molécules, associée à une augmentation de la concentration en Aβ, pourrait alors

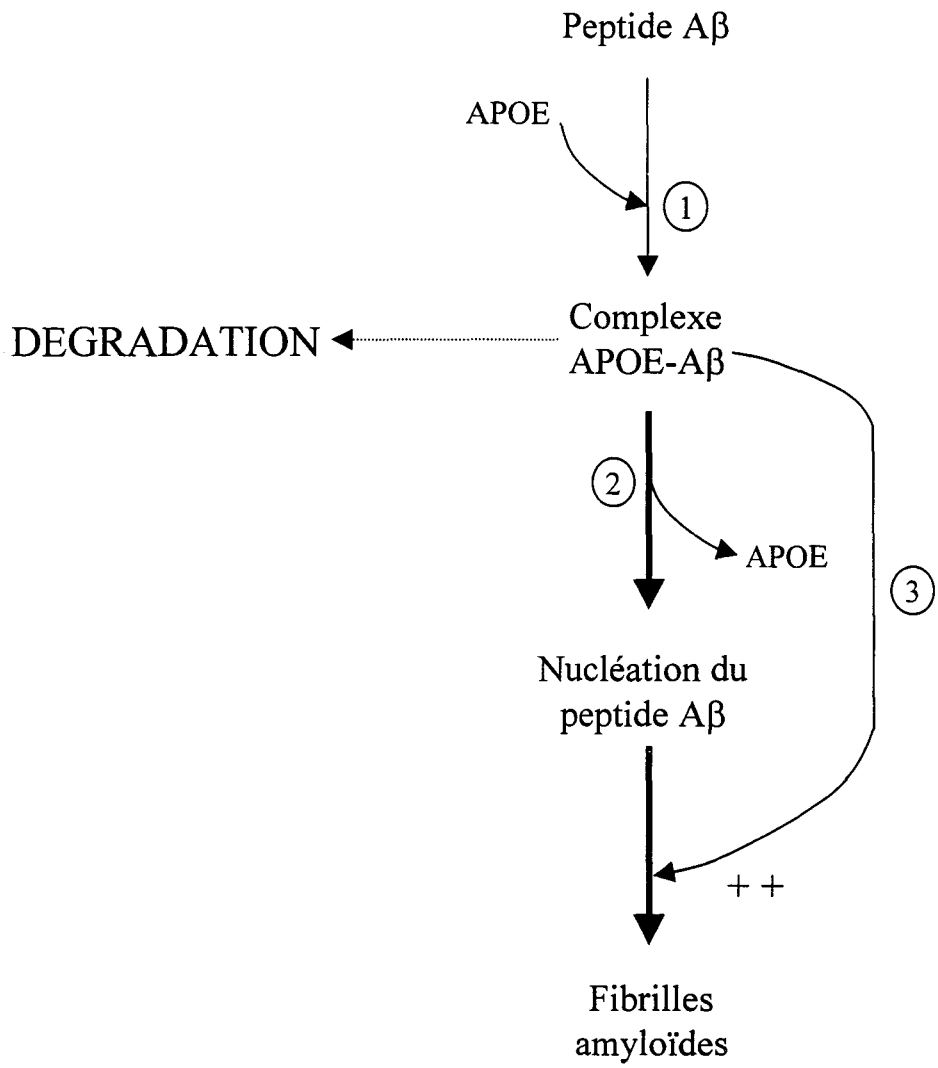


Figure 15 : *Implication possible de l 'APOE sur la formation des dépôts amyloïdes.* (1) La formation d'un complexe APOE-Aβ pourrait permettre la dégradation du peptide Aβ. (2) Cependant chez les patients, ce complexe serait plus instable que chez les individus sains. Ceci, couplé à une augmentation de la synthèse de peptide Aβ, faciliterait la nucléation de ce peptide. (3) Finalement, le complexe APOE-Aβ, pourrait lui-même, favoriser la formation des fibrilles amyloïdes.

conduire à une accumulation de ce peptide, suffisante pour atteindre le point critique de nucléation, étape initiale de la formation des dépôts . Une fois cette étape réalisée, l'Aβ polymérisé pourrait interagir avec le complexe APOE-Aβ et y être incorporé. La plupart de ces complexes participerait alors à la formation des fibrilles amyloïdes. Ainsi, dans un premier temps, il y aurait défection du système de dégradation du peptide Aβ permettant d'initier la formation des dépôts, puis facilitation de l'amyloïdogénèse par le complexe APOE-Aβ lui-même (489). Le fait que l'action inhibitrice de l'APOE semble avoir lieu à des concentrations physiologiques de l'ordre du nanomolaire en peptide Aβ (483), tandis que la facilitation de la formation des dépôts aurait lieu pour des concentrations plus élevées, de l'ordre du micromolaire (103), renforcerait cette hypothèse.

6.7.2. Le métabolisme des lipides : le lien manquant ?

En dehors du rôle potentiel de l'APOE sur la formation directe des plaques amyloïdes, de nombreuses études ont cherché à établir une interaction potentielle entre maladie d'Alzheimer, cholestérol et APOE puisque cette molécule est directement impliquée dans le métabolisme du cholestérol.

6.7.2.1. Données épidémiologiques.

A ce jour, un certain nombre de données épidémiologiques semblent soutenir que l'impact de l'allèle ε4 de l'APOE sur le développement de la maladie d'Alzheimer, puisse être médié par une modification du métabolisme lipidique dans le cerveau. En effet, une alimentation riche en cholestérol et acides gras saturés, augmenterait le risque de développer la maladie d'Alzheimer (492). Ainsi, il a été décrit qu'un taux élevé de cholestérol total

plasmatique a une valeur prédictive pour la prévalence de la maladie d'Alzheimer, si ce taux est supérieur ou égal à 6,5 $mmol.l^{-1}$ (228). De plus, une corrélation positive semble exister entre les niveaux de cholestérol total et de peptide $A\beta_{N-42}$ plasmatique (493). Néanmoins, il faut noter que plusieurs travaux n'ont pas pu mettre en évidence cette augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol chez les malades par rapport aux témoins (227,494,495). De plus, une diminution de la concentration en cholestérol total a été décrite dans le LCR des patients (496).

Puisque l'allèle ε4 de l'APOE est associé à une augmentation du taux de cholestérol circulant, il a donc été proposé que l'effet délétère de cet allèle soit médié par cette action. D'ailleurs, les individus déments génotypés ε4/ε4 présentent, comme attendu, le taux le plus élevé de cholestérol circulant (497). Ainsi, une interaction significative a pu être mise en évidence entre le fait de posséder un allèle ε4, un taux de cholestérol élevé et le risque de développer la pathologie. Cependant, cette interaction dépendrait du sexe, puisque exclusivement retrouvée chez les hommes (226). Enfin, l'effet protecteur observé pour les individus consommant une faible quantité d'alcool (498) et plus particulièrement porteurs d'un allèle ε4 (432), pourrait conforter l'hypothèse de l'implication du cholestérol. En effet, une faible consommation d'alcool pourrait modifier le profil lipidique des individus de façon positive.

Finalement, un dernier argument supportant une modification du métabolisme des lipides dans la maladie d'Alzheimer provient de l'étude de la composition des membranes cellulaires. En effet, il a été observé une composition différente des membranes cellulaires des malades par rapport aux témoins (499-501), cette différence étant potentiellement plus marquée pour les individus porteurs d'un allèle ε4 (502).

Cependant, même si un certain nombre de données épidémiologiques et physiologiques suggèrent l'implication du métabolisme lipidique dans le développement de la maladie

d'Alzheimer, le mécanisme par lequel cette action aurait lieu, porte à controverse.

6.7.2.2. Modification du métabolisme de l'APP.

Comme décrit précédemment (paragraphe 4.3.4.3.), une augmentation de cholestérol provoquerait aussi bien *in vivo* que *in vitro*, une diminution de la sécrétion des formes APPs. Ainsi, il a été proposé qu'un taux élevé de cholestérol pouvait entraîner une modification de l'activité des α-sécrétases liée à un changement de la fluidité membranaire. L'APOE semblerait nécessaire pour observer la modification du métabolisme de l'APP par le cholestérol, puisque des souris knock-out pour le gène de l'APOE et donc hypercholestérolémiques ne présentent pas de diminution de sécrétions des formes APPs.

6.7.2.3. Régénération déficiente et atteinte du système cholinergique.

Comme décrit dans les paragraphes 6.4.2.1. et 6.4.2.2., l'APOE joue un rôle essentiel dans l'entretien du système nerveux central. Cependant en fonction des isoformes de l'APOE, les capacités de croissance neuritique ne sont pas équivalentes. Ainsi, l'isoforme APOE3 permettrait-elle d'obtenir une arborescence et une croissance neuritique plus importante que l'isoforme APOE4, suggérant ainsi que les capacités de plasticité et de réparation neuronale sont moins bonnes pour les individus porteurs d'un allèle ε4 (337,503-505). Les effets différents des isoformes de l'APOE sur la croissance neuritique, pourraient être attribués au rôle majeur de l'APOE au niveau de la redistribution du cholestérol et des lipides. Puisqu'il a été montré que l'impact de l'APOE sur la croissance neuritique dépend du LRP, cette croissance pourrait être médiée par ce récepteur (505). Cependant, aucune différence d'affinité des β-VLDL (ligand naturel du LRP) enrichis soit en APOE3 ou APOE4, n'a pu être vraiment

mise en évidence avec le LRP (506), suggérant l'existence d'un mécanisme encore inconnu.

Il a été également proposé que la faible concentration en APOE dans le tissu cérébral, des individus possédant un allèle ε4 (Bertrand et al, 1994), puisse compromettre le transport du cholestérol et des phospholipides, induisant sélectivement des dommages au système cholinergique, très sensible à l'homéostasie lipidique (351). Un certain nombre de données appuient cette hypothèse. En effet, la corrélation entre allèle ε4 et déficit cholinergique semble très marquée, l'activité de l'acétylcholine transférase étant fortement diminuée dans l'hippocampe des individus porteurs d'un allèle ε4 (507)et correspondant à une perte des neurones cholinergiques (508,509).

6.7.3. Réponse inflammatoire et stress oxydatif.

Les cellules microgliales immunoréactives pour l'APOE se situent au centre des plaques séniles, les astrocytes quant à eux, se trouvant plutôt à l'extérieur de la plaque. Ces données suggèrent donc que les cellules microgliales joueraient un rôle plus important que les astrocytes dans la formation des plaques amyloïdes (30). Plusieurs observations soutiennent l'hypothèse d'une interaction entre l'APOE et une réaction inflammatoire via la microglie. Ainsi les individus porteurs d'un allèle ε4 et infectés par le virus VIH ou herpès de type 1, ont un risque plus important de développer une démence par rapport aux individus infectés, non porteurs de l'allèle ε4 (510,511). Ces données suggèrent donc que la réponse à une inflammation chronique au niveau cérébral, diffère en fonction du génotype de l'APOE. D'ailleurs, le niveau d'activation de la microglie semble être directement corrélé à ce génotype. Le nombre de cellules microgliales activées ainsi que la surface occupée par ces cellules augmentent avec le nombre de copie de l'allèle ε4 (512,513). De plus, le sérum provenant de patients génotypés ε3/ε4 et ε4/ε4 est capable d'induire une prolifération et une

BU LILLE I

activation de la microglie *in vitro*, plus importante que celle qui est observée avec des sérums provenant d'individus non porteurs de l'allèle ε4 (514).

A ce jour, l'APOE a été décrite comme pouvant agir aussi bien au niveau de la formation que de la prise en charge des radicaux libres neurotoxiques, produits durant la réponse inflammatoire. Ainsi, de nombreuses études ont montré que l'APOE était capable de moduler la production d'oxyde nitrique (NO). Ainsi, la production de NO serait-elle induite par l'APOE chez les macrophages humains dérivés de monocytes, initialement traités aux acides polyinosique et polycitidylique (515), tandis que l'APOE inhiberait la réponse inflammatoire suite à une stimulation de cette réponse par les lipopolysaccharides ou l'APPs-β (202,516). Cependant, l'efficacité d'inhibition après stimulation par l'APPs-β dépendrait de l'isoforme, l'APOE4 ne présentant aucune action inhibitrice contrairement à l'APOE3 (Barger et al, 1997). Cette action différente des isoformes au niveau de la réponse inflammatoire a d'ailleurs été décrite pour l'activation du complément par le peptide amyloïde, l'isoforme APOE4 augmentant alors cette activation contrairement à l'isoforme APOE3 (517).

Outre le contrôle de la production de radicaux libres, l'APOE pourrait être aussi impliquée dans la prise en charge de ces radicaux libres. En effet, des souris knock-out pour le gène de l'APOE présentent une augmentation de la péroxidation des lipides au niveau plasmatique (518). Au niveau cérébral ces souris présentent par rapport aux souris témoins, une augmentation de l'activité de la catalase, de la glutathione réductase et de la superoxyde dismutase Mn^{2+} dépendante, suggérant que des mécanismes antioxydants pourraient être impliqués dans la maintenance du système nerveux central (519). Ce pourrait être l'APOE elle-même, qui ait cette activité antioxydante, protégeant par exemple les neurones d'un stress oxydatif induit par le peptide Aβ. Cependant, l'efficacité antioxydante serait meilleure pour l'isoforme APOE2, intermédiaire pour l'isoforme APOE3 et déficiente pour l'isoforme APOE4 (520).

6.7.4. Autres hypothèses d'action de l'APOE.

En dehors des trois hypothèses majeures décrites ci-dessus, d'autres hypothèses d'actions ont été proposées. Cependant celles-ci semblent marginales et moins documentées.

6.7.4.1. Hyperphosphorylation des protéines Tau.

Comme décrits précédemment (paragraphe 6.6.2.), les résultats au niveau neuropathologique entre génotypes de l'APOE et dégénérescence neurofibrillaire, sont contradictoires. Cependant, il a été proposé que l'APOE puisse moduler la phosphorylation des protéines Tau. En effet, l'étude de souris transgéniques knock-out pour le gène de l'APOE, a montré une hyperphosphorylation des protéines Tau par rapport aux souris témoins (340,521), résultat qui n'a pu être systématiquement obtenu (522). Cette observation par contre, a pu être reproduite *in vitro*. Dans ce cas, la présence d'APOE est associée à une diminution de la phosphorylation des protéines Tau (523,524). Le mécanisme exact par lequel cette action pourrait être médiée, n'est pas déterminé. Certains auteurs proposent que cet effet serait lié à une interaction directe de l'APOE avec les protéines Tau. Même si un certain nombres d'études n'ont pu montrer un effet différentiel entre les isoformes de l'APOE sur la phosphorylation des protéines Tau (523-525), il a été proposé que cette interaction serait isoforme-spécifique. L'isoforme APOE3 présenterait ainsi une affinité plus importante que l'isoforme APOE4 (526,527). La fixation de l'APOE3 sur les protéines Tau limiterait la phosphorylation de celles-ci. D'ailleurs, la phosphorylation de sites sur les protéines Tau pourrait inhiber la liaison de l'isoforme APOE3 à ces protéines (527). Il a également été proposé que l'APOE puisse se lier à la protéine MAP2, protéine essentielle à la maintenance intracellulaire des microtubules, de façon isoforme-spécifique, l'APOE4 ne se fixant pas à

cette protéine (346). Ces résultats concernant l'interaction de l'APOE soit avec les protéines Tau ou soit avec la MAP2, suggèrent que l'APOE est présente au niveau cytoplasmique. Même si de l'APOE intraneuronale a pu être mise en évidence par immunohistochimie (345), il semblerait que cette APOE soit exclusivement localisée dans les voies d'endocytoses et non présente dans le cytosol, car dans ce cas neurotoxique (528). Cette observation suggère donc que l'action de l'APOE passerait plutôt par un mécanisme s'initiant au niveau de la surface cellulaire. En effet, l'APOE induirait alors des voies de signalisation associées à la concentration en Ca^{2+}, qui pourrait augmenter l'activité des phosphatases 2A et 2B (523).

6.7.4.2. Neurotoxicité propre de l'APOE.

La démonstration que des peptides synthétiques de l'APOE, montrent une cytotoxicité et causent une dégénérescence neuritique (529), a conduit à suggérer que l'APOE pouvait jouer un rôle direct sur le développement de la maladie d'Alzheimer en contribuant directement à la mort neuronale. Cette hypothèse est soutenue par la mise en évidence d'un fragment de 22 kDa de l'APOE, issu du clivage par la thrombine, neurotoxique, et similaire à un autre peptide présent dans le cerveau et le LCR (530). Ce peptide, par ailleurs, serait plus neurotoxique si celui-ci est dérivé de l'isoforme APOE4 que l'isoforme APOE3. Les mécanismes qui pourraient médier cette neurotoxicité sont mal connus, mais pourraient impliquer une interaction avec des protéoglycannes et/ou le LRP (531), induisant une modulation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (532).

6.8. Conclusion.

Il est maintenant clairement établi que l'allèle ε4 est un facteur de risque majeur de la

maladie d'Alzheimer. Cependant, les hypothèses sur les mécanismes impliquant l'APOE dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer, sont très nombreuses et complexes. Malgré les contradictions apparentes des multiples études, trois hypothèses majeures se dégagent, probablement non exclusives les unes des autres. En effet, la difficulté à déterminer un mécanisme d'action précis pourrait résulter d'actions multiples de l'APOE aussi bien au niveau du métabolisme de l'APP, de la formation des dépôts amyloïdes que de la réponse inflammatoire, conséquence possible de la neurotoxicité du peptide Aβ (paragraphe 4.5.1.).

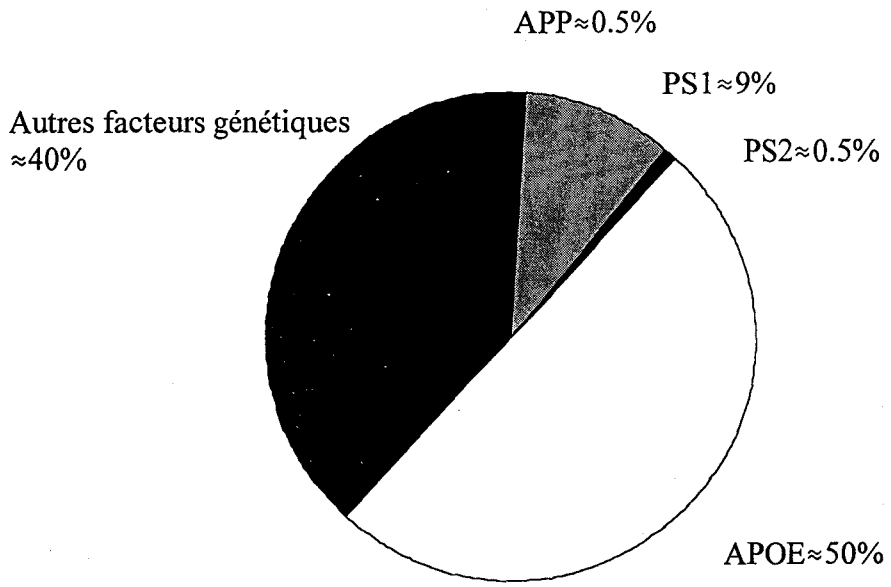


Figure 16: Proportion relative des différents gènes impliqués dans la maladie d'Alzheimer.

Cependant, les mutations des gènes de l'APP, de PS1 et de PS2 ne concernent que les formes familiales précoces, soit environ 10% des cas (Figure 16). De plus, quelle que soit les propriétés biochimiques des isoformes de l'APOE, celles-ci ne semblent pas suffisantes pour expliquer l'association de l'allèle ε4 avec la maladie d'Alzheimer. En effet, des individus porteurs d'un allèle ε4 ne développent pas systématiquement la pathologie. D'autres facteurs génétiques doivent donc être impliqués dans l'étiologie de la pathologie.

7. Autres déterminants génétiques de la maladie d'Alzheimer.

De nombreux autres gènes ont été décrits comme facteurs de susceptibilité pour la maladie d'Alzheimer, certains d'entre eux présentant des effets plus ou moins marqués en fonction du génotype de l'APOE. Cependant, l'implication de la plupart de ces gènes dans le développement de la maladie est fortement controversée.

7.1. Quelques gènes candidats.

7.1.1. le Gène du complexe majeur d'histocompatibilité de type A.

Comme décrit précédemment, une des hypothèses concernant l'étiologie de la maladie d'Alzheimer concerne la réponse inflammatoire. Il a été proposé entre autre que ce mécanisme implique le complexe majeur d'histocompatibilité (*HLA*) (533-535).

Dès 1986, la présence de l'allèle A2 de *HLA* a été associé aux formes précoces de la maladie d'Alzheimer, principalement chez les hommes (535), cette étude ne comportant cependant que 36 patients et 25 individus sains. Une étude prospective a permis de confirmer ces résultats, montrant de nouveau une augmentation du risque de développer une forme précoce de maladie d'Alzheimer chez les hommes porteurs de l'allèle A2 de *HLA* (536). Il semblerait que cette association soit spécifique des formes précoces, car elle n'a pu être montrée pour des individus atteints de formes tardives de la maladie d'Alzheimer (537,538). Par ailleurs, l'allèle A2 de *HLA* semble être corrélé à une diminution de l'âge d'apparition de la maladie, en interagissant potentiellement avec l'allèle ε4 (539-541). Cet effet est de nouveau le plus marqué pour les formes précoces de la maladie, mais a été aussi décrit pour les formes tardives (540).

Ainsi, ces données suggèrent-elles que le complexe HLA est impliqué dans le développement de la maladie en influençant principalement l'âge de début de la pathologie. Ces résultats soutiennent donc le rôle d'une réponse inflammatoire dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer.

7.1.2. Le gène du récepteur des lipoprotéines de très faible densité.

Le gène du récepteur des lipoprotéines de très faible densité (*VLDL-R*), localisé sur le chromosome 9, a été proposé comme facteur de risque de la maladie d'Alzheimer, en influençant le métabolisme de l'APOE dans le cerveau. Ce gène possède une région polymorphe dans la région 5' UTR caractérisée par une répétition en tandem de type $(CGG)_n$, présentant 6 allèles de 4 à 9 répétitions. Les individus homozygotes pour l'allèle de 5 répétitions auraient un risque plus important de développer la maladie d'Alzheimer s'ils sont aussi porteurs d'un allèle ε4 (391). Cependant cette observation a été réalisée dans une population d'origine japonaise, et cette relation pourrait ne pas être trouvée dans les populations caucasiennes (542-546). Toutefois, une étude portant sur une population caucasienne rapporte elle-aussi une augmentation du risque de développer des formes tardives de la maladie d'Alzheimer pour les individus porteurs de l'allèle de 5 répétitions, cet effet étant plus marqué chez les individus porteurs d'un allèle ε4 (547). Il est à noter qu'une étude portant sur une population du nord de l'Irlande a montré une augmentation du risque de développer la pathologie pour les individus homozygotes pour l'allèle à 9 répétitions (548).

En fait, tous ces résultats ne permettent pas de conclure sur l'implication réelle du gène du *VLDL-R*, d'autres études étant donc nécessaires. Cependant, il est important de noter que la distribution allélique est significativement différente entre les populations témoins d'origines américaines, japonaises et européennes (547), Ainsi, l'origine ethnique pourrait être un

important déterminant de l'impact de ce gène sur la maladie d'Alzheimer.

7.1.3. Le gène de la dihydrolipoyl succinyltransférase.

Le dysfonctionnement du métabolisme énergétique étant une caractéristique majeure de la maladie d'Alzheimer, des gènes susceptibles d'être impliqués dans ce dysfonctionnement ont donc été proposés comme gène candidat. Ainsi, un certain nombre de mutations ont été décrites sur des gènes localisés sur l'ADN mitochondrial, susceptibles d'augmenter le risque de développer la maladie d'Alzheimer (549-552). Cependant ces mutations sont rares et les résultats semblent difficilement reproductibles (553,554). Par ailleurs, il semblerait que certaines de ces études aient été biaisées par l'amplification des pseudogènes présents sur l'ADN génomique (555,556). Ainsi, s'il existe un déterminant génétique responsable du dysfonctionnement du métabolisme énergétique dans la maladie d'Alzheimer, les données actuelles ne sont pas en faveur d'une localisation de ce gène sur l'ADN mitochondrial.

Récemment, le gène codant pour la dihydrolipoyl succinyltransférase (*DLST*), localisé en 14q24.3, a été proposé comme déterminant génétique de la maladie d'Alzheimer. En effet, le produit de ce gène est impliqué dans le fonctionnement mitochondrial puisque la protéine DLST est le core enzymatique du complexe de l'α-kétoglutarate déshydrogénase (KGDHC), ce complexe catalysant une étape obligatoire du cycle de Krebs. Or l'activité du complexe KGDHC est particulièrement réduite chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (557-559). Les études d'épidémiologie génétique portant sur ce gène sont encore une fois contradictoires. Deux polymorphismes ont été étudiés, l'un localisé dans l'intron 13, correspondant à un changement d'une adénine en guanine, et l'autre silencieux localisé dans l'exon 14 et correspondant à un changement d'une thymine en cytosine. Le premier travail réalisé sur ce gène a établi que le génotype AC/AC était un facteur de risque de la maladie

d'Alzheimer pour des individus d'origine japonaise, indépendamment du génotype de l'*APOE* (560). Par ailleurs, l'étude de ces polymorphismes au sein d'une population caucasienne très âgée, a montré que l'allèle ε4 était un facteur de risque dans cette population seulement si les individus considérés étaient homozygotes GC/GC pour le gène *DLST* (561). Finalement, dans une population américaine d'origine caucasienne, le génotype homozygote AT/AT a été associé à une diminution du risque de développer la maladie, cet effet étant le plus marqué chez les individus non porteurs de l'allèle ε4 (562).

Ainsi, il apparaît que ces quelques données, même si elles décrivent un impact du gène *DLST* sur la maladie d'Alzheimer, sont peu cohérentes les unes avec les autres, d'autant plus qu'une autre étude ne décrit aucune association (563). Afin de conclure sur l'implication réelle de ce gène, de nombreuses autres études indépendantes semblent donc nécessaires.

7.1.4. Le gène de l'α1-antichymotrypsine.

Les observations (i) de la présence d'α1-antichymotrypsine (ACT) dans le cœur des plaques séniles, (ii) d'une expression élevée de ce gène dans le cerveau des individus atteints de la maladie d'Alzheimer (564,565) et (iii) de la capacité de l'ACT à promouvoir l'agrégation du peptide Aβ (Ma et al, 1994), ont suggéré que la variabilité du gène de l'*ACT*, localisé sur le chromosome 14 en q32.1, puisse être un facteur de susceptibilité pour la maladie d'Alzheimer.

Un polymorphisme biallélique fréquent, localisé dans le peptide signal de l'ACT et modifiant une alanine (allèle A) en thréonine (allèle T), a été décrit comme étant associé à la maladie d'Alzheimer. L'allèle A serait un facteur de risque, mais exclusivement pour les individus porteurs d'un allèle ε4 (566-568). De même, une étude a reporté l'association de l'allèle A10 d'un tétranucléotide localisé dans la région 5' flanquant le gène de l'*ACT* avec la pathologie (569). Cependant, un très grand nombre d'étude n'a pu mettre en évidence une telle

relation (570-575), suggérant que l'allèle A de l'*ACT* n'est pas impliqué dans le développement de la pathologie. Cette conclusion est d'ailleurs soutenue par l'absence de corrélation entre cet allèle et la quantité des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer observée dans le cerveau des patients (576).

7.1.5. Le Gène de la butyrylcholinestérase.

En 1997, un variant du gène de la butyrylcholinestérase (*BChe*) appelé variant K, correspondant au changement d'une alanine en thréonine au codon 539 et réduisant d'un tiers l'activité de cette enzyme (577), a été associé à une augmentation du risque de développer des formes tardives de la maladie d'Alzheimer. L'effet est alors le plus important pour les individus de plus de 75 ans et porteurs d'un allèle ε4 (578). L'implication de ce gène est supportée par un certain nombre d'observations : (i) une augmentation de l'activité de la BChe avec l'âge, exacerbée chez les individus souffrant de la maladie d'Alzheimer (579), (ii) la présence de cette protéine à la fois dans les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (580,581).

Cependant l'association observée n'a pu être reproduite (582-586) et récemment une méta-analyse semble exclure définitivement l'implication du variant K de la *BChe* dans la maladie d'Alzheimer (587).

7.1.6. Le gène de *PS1*.

En dehors des mutations pathogènes responsables de la majorité des formes précoces familiales de la maladie d'Alzheimer, le gène *PS1* a été proposé comme facteur de susceptibilité des formes sporadiques de la pathologie, puisque les individus homozygotes

pour l'allèle 1 d'un polymorphisme de l'intron 8, présenteraient une augmentation de l'ordre de deux fois du risque de développer la maladie (588). Cependant même si quelques études ont pu reproduire ce résultat (589,590), la plupart d'entre elles n'ont pu mettre en évidence cette association (591-596). Enfin, ce polymorphisme ne semble pas être corrélé à la quantité de peptide amyloïde déposé dans le cerveau des patients (597).

7.1.7. Autres gènes.

En dehors des quelques gènes décrits ci-dessus et regroupant jusqu'à présent la majorité des études, plusieurs autres gènes ont été proposé comme gène candidat pour la maladie d'Alzheimer (Tableau 7). Cependant le nombre d'études portant sur ceux-ci est encore très limité.

Tableau 7: Liste des autres gènes décrits comme modifiant le risque de développer la maladie d'Alzheimer.

Gène	Localisation	Polymorphisme	Impact	Interaction avec APOE	référence
Interleukine-6	7p21	répétition en tandem	protecteur	indépendant	(598)
Lipoprotéine lipase	8p22	Ser447Ter Asn291Ser	protecteur délétère	?	(599)
Cathepsine D	11p15.5	Ala224Val	délétère	$\varepsilon 4^+$	(600)
Fe65	11p15	Insertion/délétion intron 13	protecteur	indépendant	(601)
APOA-IV	11q23-qter	Glu360His	délétère	$\varepsilon 4^-$	(602)
Bleomycine hydrolase	17q11.2	Ilε443Val	délétère	$\varepsilon 4^-$	(603)
ACE	17q23	Insertion/délétion intron 16	délétère	indépendant	(604)

En conclusion, aucun gène de susceptibilité majeur n'a été découvert depuis celui de l'*APOE* en 1993, les associations portant sur les autres gènes étant pour l'instant controversées.

Parallèlement à ces études d'association, la recherche de nouveaux gènes impliqués dans des formes familiales tardives s'est développée. Récemment, utilisant une population de paires de germains, l'étude de marqueurs anonymes, réalisée sur la totalité du génome, a permis de mettre en évidence un certain nombre de locus impliqués dans la pathologie, situés sur les chromosomes 1, 10, 12, 21 et X pour les individus non porteurs de l'allèle ε4 et sur les chromosomes 2, 6, 13 et 14 pour les individus porteurs d'un l'allèle ε4 (605). Une étude antérieure quant à elle, a mis en évidence une liaison génétique sur 4 locus au niveau des chromosomes 4, 6, 12 et 20, la liaison la plus importante étant obtenue sur le chromosome 12 (606).

7.2. Chromosome 12 et maladie d'Alzheimer.

Le locus situé sur le chromosome 12 est à ce jour le plus étudié. En effet, trois équipes ont montré qu'une région comprise entre les marqueurs D12S358 et D12S96 était susceptible de contenir un gène impliqué dans les formes familiales tardives de la maladie d'Alzheimer (606-608).

Toutefois, ces trois travaux différent quant à localisation potentielle de ce gène, puisqu'une équipe semble plutôt situer ce gène près du marqueur D12S358 en p12 (607), tandis qu'une autre obtient une localisation près du marqueur D12S96 en q13, à 67 cM du marqueur D12S358 (608). Cependant il est à remarquer que cette dernière étude observe aussi un pic aux alentours du marqueur D12S358 et ne peut donc exclure cette région. Enfin, Pericak-Vance *et al.* ont eux aussi mis en évidence une liaison génétique sur le chromosome

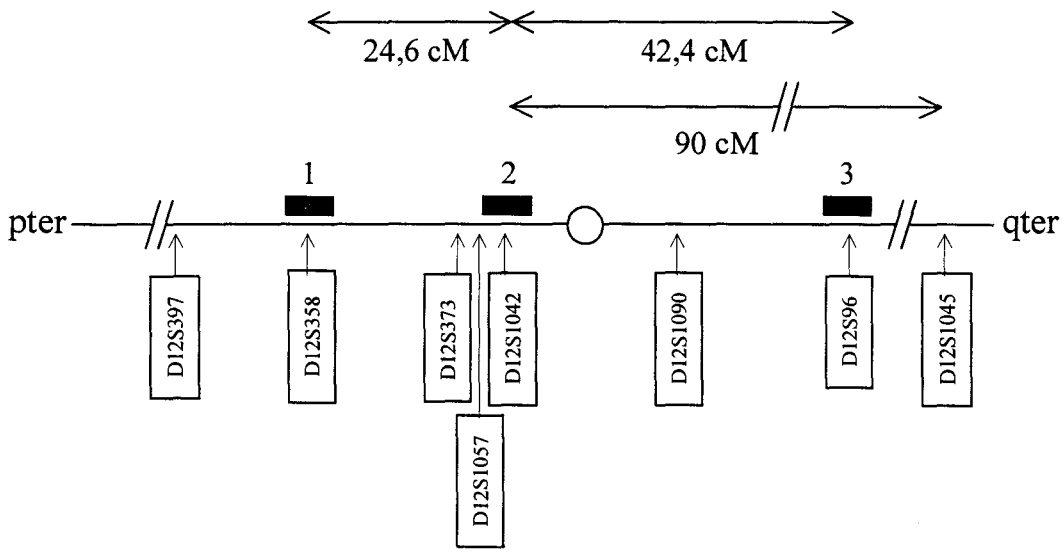


Figure 17 : Carte génétique du chromosome 12 regroupant les principaux marqueurs utilisés pour les études de liaisions génétiques. Le cercle correspond au centromère. Les rectangles noirs représentent les pics maximum observés par les différentes études : (1) Wu et al, 1998. (2) Pericak-Vance et al, 1997. (3) Rogaeva et al, 1998. Les distances en cM sont reprise de cette dernière référence.

12 entre les marqueurs D12S373 et D12S390, avec un pic maximal en D12S1042. Ce marqueur est situé respectivement à 42,4 cM et 24,6 cM des marqueurs D12S96 et D12S358 (Figure 17) (606).

Une association génétique est décrite entre le marqueur D12S1045 et une population de cas autopsiés, l'allèle 91 de ce polymorphisme augmentant le risque de développer la pathologie (609). La présence de cet allèle est corrélée à une augmentation de la DNF mais aussi à une atteinte plus importante du système cholinergique chez les malades (610). Ce marqueur se situe en qter et est donc très éloigné des pics maximum décrits précédemment.

En conclusion, trois études indépendantes ont montré qu'il existait un gène de susceptibilité pour les formes familiales tardives de la maladie d'Alzheimer, le locus impliqué s'étendant sur plus de 67 cM. Or, ce locus contient deux gènes candidats majeurs : l'*α2M* proche du marqueur D12S358 et le *LRP* proche du marqueur D12S96.

7.2.1. Le gène du *LRP*.

7.2.1.1. Structure et fonctions du LRP.

Le gène du *LRP* est composé de 89 exons et s'étend sur plus de 90 Kb. La protéine correspondante a une masse apparente de 600 kDa. La fonction initiale du LRP a été décrite comme étant le récepteur de l'α2M (611). Le LRP est un récepteur impliqué dans l'endocytose de très nombreux ligands, au moins 25 connus. Trois de ces ligands sont particulièrement intéressants pour la maladie d'Alzheimer. Il s'agit (i) de l'α2M, qui contrôle la dégradation du peptide Aβ via le récepteur LRP (612), (ii) de l'APP, certaines isoformes de l'APP étant endocytées via le LRP (613,614), et enfin (iii) de l'APOE dont l'internalisation au niveau neuronal est réalisé par le LRP (615). Ce récepteur est alors un intermédiaire potentiel de

l'action physiologique de l'APOE dans le système nerveux central (503,504,616,617).

7.2.1.2. Variants du LRP et maladie d'Alzheimer.

C'est en 1997 que pour la première fois, le locus contenant le gène du *LRP* a été décrit comme associé avec la maladie d'Alzheimer. En effet ce gène présente un polymorphisme de répétition de type $(TTTC)_n$ situé en 5' du gène, caractérisé par 3 allèles majeurs de 83, 87 et 91 pb (618). L'allèle 87 pb a alors été associé à une augmentation du risque de développer la pathologie (545). Par ailleurs, un deuxième polymorphisme silencieux en position +766 du site d'initiation du transcrit et correspondant au changement d'une cytosine en thymine, a été décrit associé à la maladie, les individus homozygotes pour l'allèle C présentant une augmentation du risque de développer la pathologie (619). De plus, le nombre de plaques séniles est augmenté chez les malades présentant ce génotype (619).

7.2.2. Le gène de l'*α2M*.

7.2.2.1. Structure et fonctions de l'α2M.

Le gène de l'*α2M* comprend 36 exons, s'étendant sur approximativement 48 Kb (620). La protéine correspondante a pour masse apparente 185 KDa et se présente sous la forme d'un tétramère. L'α2M est un inhibiteur de protéases, capable d'inactiver des enzymes de toutes classes. Cette protéine est considérée comme participant à un mécanisme de défense contre des protéases aussi bien de nature endogène qu'exogène. L'activité de cette protéine est portée par deux sites essentiels (i) un domaine leurre composé d'une série de séquences de coupure, reconnues par des protéases (ii) et un pont thiolester incluant les résidus glutamate 975 et

cystéine 972. La coupure du domaine leurre conduit à un changement conformationnel, induisant l'hydrolyse du pont thiolester et la formation d'une liaison covalente entre la protéinase et le résidu réactif 975 (621).

Concernant l'impact de l'*α2M* dans la maladie d'Alzheimer, plusieurs données sembleraient appuyer un rôle de cette protéine dans l'étiologie de la pathologie : (i) L'α2M est présente dans les plaques séniles (622,623) et se lie avec une haute affinité au peptide Aβ (624). (ii) L'α2M activée par la trypsine ou sous forme d'un complexe α2M-protéase à sérine, est capable de dégrader le peptide Aβ, mais aussi de prévenir la formation de fibrilles de peptides amyloïdes (625,626).

7.2.2.2. Variants de l'*α2M* et maladie d'Alzheimer.

Le gène de l'*α2M* présente deux polymorphismes majeurs, le premier correspondant à une délétion de 5 pb, situé à proximité du site accepteur de l'épissage de l'exon 18 et le deuxième étant un polymorphisme biallélique provoquant le changement d'une valine (allèle G) en isoleucine (allèle A) au codon 1000 (627,628).

La délétion de 5 pb a été associée à une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer dans une population de paires de germains (629), cette association étant indépendante de l'allèle ε4. Afin de comprendre l'impact physiologique de ce polymorphisme, il a été proposé que celui-ci puisse modifier l'épissage des exons 17 et 18. Cela entraînerait alors une modification de l'activité de cette protéine car le domaine leurre est codé par ces deux exons.

De même, la mutation Val1000Ile a été décrite comme susceptible de moduler le risque de développer la pathologie, les individus homozygotes pour l'allèle G présentant un risque plus élevé de développer la maladie, indépendamment de l'allèle ε4. De plus, les malades

porteurs d'un allèle G présentent une augmentation des dépôts amyloïdes et de la DNF (630). Ce polymorphisme se situe à 25 codons en aval du résidu glutamate 975 et serait susceptible de modifier l'activité de l'α2M en raison de cette proximité. Ainsi, ces deux études semblent soutenir l'implication du gène de l'α2M dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer.

En conclusion, bien que la génétique des formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer commence à être assez bien connue, il n'en est pas de même pour les formes sporadiques de cette affection. Ainsi, de nombreux gènes ont été proposés comme susceptibles de moduler le développement de cette maladie. Et à ce jour, seul le gène de l'APOE est reconnu impliqué dans ces formes sporadiques. Cependant, la façon dont ce gène peut s'intégrer dans les hypothèses physiopathologie, n'est pas encore clairement déterminée. Ainsi, la découverte de nouveaux facteurs génétiques susceptibles de moduler l'impact de l'APOE, pourrait permettre de mieux situer son rôle par rapport aux gènes de l'APP et des présénilines.

TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION.

Un certain nombre d'ambiguïtés subsiste concernant l'implication de l'allèle e4 dans la maladie d'Alzheimer. Ainsi, la pénétrance de l'allèle ε4 n'est-elle pas complète puisque des individus génotypés ε4/ε4 ne développent pas systématiquement la pathologie. De plus, l'impact de cet allèle diffère de façon importante entre les différentes ethnies étudiées. Ces observations suggèrent donc que d'autres facteurs environnementaux ou génétiques peuvent moduler l'impact de cet allèle, expliquant ainsi cette hétérogénéité.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement attachés à comprendre quels étaient les déterminants génétiques, susceptibles de moduler le risque associé à l'allèle ε4. Deux hypothèses de travail nous sont alors parues possibles :

- En plus des propriétés biochimiques des isoformes de l'APOE, une variation de l'expression de ce gène pourrait exister.
- D'autres gènes, impliqués dans le métabolisme de l'APOE ou intervenant dans l'action délétère de cette molécule, pourrait moduler l'impact des différentes isoformes.

En conséquence, notre travail s'est divisé en deux parties complémentaires : (i) rechercher si une variabilité d'expression du gène de l'APOE pouvait être un déterminant de l'étiologie de la maladie d'Alzheimer, (ii) mais aussi rechercher des interactions potentielles entre l'APOE et deux gènes impliqués dans le métabolisme de cette molécule, l'α2-macroglobuline et le LRP.

ETUDE DU GENE DE L'APOE

Etude de l'expression des allèles de l'APOE.

Présentation du travail.

En 1994, une étude réalisée dans notre laboratoire montrait que la combinaison des polymorphismes aux codons 112 et 158 de l'APOE, et d'autres polymorphismes localisés sur le locus de ce gène, permettait de mieux définir des sous populations à risque (395).

	Odds ratio	*P*
Cas tardifs		
avec au moins un allèle court du marqueur D12S178	14,23	<0,002
avec au moins un allèle long du polymorphisme APOCII	∞	<0,0002
Cas précoces		
avec au moins un allèle court du marqueur D12S178	8,68	<0,0006
avec au moins un allèle long du polymorphisme APOCII	4,41	<0,06
Tous les cas ensemble		
avec au moins un allèle court du marqueur D12S178	12,46	<0,0001
avec au moins un allèle long du polymorphisme APOCII	9,72	<0,00001

Tableau 8: Estimation des Odds ratio pour les individus porteurs d'au moins un allèle ε4 associé à la présence d'un allèle court du marqueur anonyme D19S178 ou de l'allèle long du polymorphisme APOCII.

Ces résultats associés aux études de déséquilibre de liaison, suggéraient donc l'existence d'une autre région dans le locus de l'APOE, pouvant contribuer au risque de développer la maladie d'Alzheimer, et plus exactement moduler le risque associé à l'allèle ε4. Deux explications étaient possibles : (i) il existe un autre gène à proximité du gène de l'APOE impliqué dans la pathologie, (ii) il existe une variabilité génétique dans le contrôle de

l'expression du gène de l'APOE.

Plusieurs observations nous ont conduit à privilégier l'hypothèse d'une modification de l'expression du gène de l'APOE. En effet, l'APOE est surexprimée dans le cerveau des malades par rapport aux témoins (481), mais aussi suite à une lésion cérébrale (335,631). La quantité d'APOE cérébrale est inversement corrélée au nombre d'allèles ε4 (632).

Nous avons alors supposé que les individus exprimant à un niveau plus élevé l'allèle ε4, auraient un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer par rapport aux individus exprimant cet allèle à un niveau plus faible. Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi de mesurer le taux d'expression de l'allèle ε4 par rapport à l'allèle ε3 chez des malades et chez des témoins.

Présentation des résultats.

Méthodologie.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi d'amplifier par RT-PCR, les ARNm du gène de l'APOE. Les produits d'amplification des différents allèles peuvent alors être facilement différenciés par le profil électrophorétique obtenu. Après coloration au nitrate d'argent et digitalisation du gel, les bandes de digestion, caractéristiques de chaque allèle, sont quantifiées et comparées les unes aux autres.

Cependant, ces techniques de coloration sont souvent limitées par des problèmes de saturation du signal mesuré, directement corrélés à la quantité de produits de PCR. Ces problèmes sont particulièrement accentués lorsqu'une technique sensible telle que la coloration au nitrate d'argent, est utilisée. Afin de contrôler ce biais, nous avons développé une méthode de quantification, nous permettant de prendre en compte cette saturation du

signal. Le pourcentage d'allèle ε4 a alors été calculé de la façon suivante suivante :

$$\frac{N_{\varepsilon 4\ allele}}{N_{\varepsilon 4\ allele} + N_{\varepsilon 3\ allele}} = \frac{L_{\varepsilon 4\ allele/\varepsilon 3\ allele} A_{\varepsilon 4\ allele}}{L_{\varepsilon 4\ allele/\varepsilon 3\ allele} A_{\varepsilon 4\ allele} + A_{\varepsilon 3\ allele}}.$$

avec $L_{\varepsilon 4\ allele/\varepsilon 3\ allele}$ un coefficient de correction permettant de prendre en compte la différence de taille entre les bandes de digestion caractéristiques de chacun des allèles, et A une constante permettant de normaliser la saturation du signal due à la coloration au nitrate d'argent.

Afin de vérifier la validité de cette méthode, nous avons, à partir de différents pourcentages connus d'allèle ε4 par rapport à l'allèle ε3 (de 10 à 70 %), mesuré si ce pourcentage était conservé après amplification par PCR et coloration au nitrate d'argent. Ainsi, avons-nous pu vérifier que le pourcentage final mesuré correspondait au pourcentage initial et ceci, quelque soit le pourcentage étudié, mais aussi la quantité initiale d'ADN amplifié (de 20 à 100 ng).

Mesure du pourcentage d'expression de l'allèle ε4.

Nous avons appliqué cette méthode de calcul à l'étude de l'expression des allèles de l'APOE chez 14 patients (âge: 74,1±11,8 ans) et 12 témoins (âge: 83,0±10,6 ans), tous hétérozygotes pour le génotype de l'APOE. L'extraction des ARN totaux a été réalisée sur du tissu cérébral provenant de cortex frontal.

Nous avons alors mis en évidence une surexpression relative de l'allèle ε4 chez les patients de génotype ε3/ε4 par rapport aux témoins de même génotype (respectivement, 34,4±2,6% et 22,6±1,8%; $p<0,001$ avec un test non paramétrique de Mann et Whitney). Pour les autres génotypes, la faible taille des populations testées ne nous a pas permis de conclure. Cependant, une surexpression potentielle de l'allèle ε4 chez les patients de génotype ε2/ε4 par

rapport au seul témoin présentant ce génotype (42,6±3,7% contre 28,9±1,2%) peut être observé tandis qu'aucune tendance ne semble apparaître au niveau des individus de génotype ε2/ε3.

Discussion.

Nous avons donc développé une nouvelle technique permettant de prendre en compte la saturation du signal mesuré lors d'une coloration au nitrate d'argent, cette technique étant probablement applicable à d'autres méthodes de détection utilisant soit la fluorescence, la luminescence ou la radioactivité, qui sont sujettes à ces problèmes de saturation du signal.

Par ailleurs, la mesure d'un pourcentage d'expression d'un allèle par rapport à un autre chez des individus hétérozygotes, est probablement une méthode plus adaptée que la détermination d'un niveau d'expression absolu dans le tissu cérébral. En effet, ce niveau absolu risquerait d'être fortement modifié en fonction du délai post-mortem, des types et densités cellulaires des tissus étudiés. Or, cela n'est pas le cas pour la technique que nous avons développé, puisque l'amplification par RT-PCR d'un allèle est utilisée comme contrôle d'amplification de l'autre allèle, limitant ainsi ces biais techniques.

Nous avons pu montrer que l'expression des allèles de l'APOE n'est pas similaire chez les patients et les témoins, les malades de génotype ε3/ε4 présentant une augmentation relative de l'expression de l'allèle ε4 par rapport à l'allèle ε3, de l'ordre de 1,5 fois supérieure à ce qui est observé chez les témoins de même génotype.

Ce résultat a donc deux implications majeures : (i) Outres les modifications qualitatives dues à la présence d'une cystéine ou d'une arginine aux codons 112 et 158, une variation de l'expression des allèles de l'APOE et en particulier une surexpression préférentielle de l'allèle

ε4, pourrait être un déterminant de la maladie d'Alzheimer. (ii) L'explication la plus probable pour comprendre cette différence d'expression de l'allèle ε4, serait alors l'existence d'une variabilité génétique dans le contrôle de l'expression du gène de l'APOE.

Cependant, récemment, une équipe américaine semble ne pas confirmer nos résultats, décrivant un niveau équivalent d'expression de l'allèle ε4 entre patients et témoins de l'ordre de 50%. Cette équipe suggère que notre observation serait une conséquence de la technique de PCR (633). Néanmoins, les vérifications que nous avons réalisées afin de valider la technique utilisée, infirment cette possibilité.

Semi-quantitative calculation of *APOE* allelic ratio.

Jean-Charles Lambert[1,*], Jordi Pérez-Tur[2], John Hardy[2], André Delacourte[3], Philippe Amouyel[1], Marie-Christine Chartier-Harlin[1]

[1] *INSERM 508, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 1 rue de Calmette, 59019 Lille Cedex, France*
[2] *Birdsall Building, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, Florida, FL32224 USA*
Unité INSERM 422, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.

[*] *correspondence should be addressed to Lambert Jean-Charles*
INSERM CJF95-05, Institut Pasteur de Lille,
BP 245, 1 rue du Prof. Calmette,
59019 Lille Cedex, France
Phone : 33 (0) 20 87 77 10
Fax : 33 (0) 20 87 78 94
e-mail : Jean-Charles.Lambert@pasteur-lille.fr

Key words : PCR, saturation, quantitation

1. Introduction

The ε4 allele of the *APOE* gene is the main risk factor, known in sporadic Alzheimer's disease (Farrer et al., 1997). However, individuals bearing at least one ε4 allele do not systematically develop the disease. Several studies suggested that other determinants in the *APOE* locus could modulate its impact (Chartier-harlin et al., 1994; Lambert et al, 1997). We hypothesised that a likely explanation of this was that genetic variability in neural expression at the APOE locus and that ε3/ε4 heterozygote individuals who were high ε4 expressor and/or low level ε3 expressors were more likely to develop AD than individuals with high ε3 expressors and/or low ε4 expressors. We demonstrated that relative ε4 mRNA expression is increased in AD compared with controls and that this relative overexpression may be in part associated to mutations of the *APOE* promoter (Lambert et al., 1997,1998).

In this paper, we detailed the method, we used to determine allelic *APOE* ratio, that is the percentage of mRNA synthesised from the ε4 allele compared with the percentage of mRNA synthesised from the ε3 allele..

Different methods are available to semi-quantify PCR or RT-PCR products (Becker et al., 1989; Wang et al, 1989; Gilliland et al., 1990; Jensen et al, 1996; Vari et al., 1996). However, these techniques are often limited by a saturation of the signal detection, correlated to the amount of nucleic acid products, but also by the inescapable experiment to experiment variations. These troubles are particularly increased when the signal is generated by a sensitive staining technique such as silver detection. Since we used a semi-quantitative assay to measure allelic expression of *APOE* mRNA by silver staining, we developed a method allowing to overcome signal saturation and standardise the semi-quantitation.

2. Method

The arbitrary units was optical density (OD) and was theoretically proportional to the amount of DNA, according to the equation:

$$OD = a\,N \qquad 1$$

where a was the coefficient of proportionality (in mol^{-1}) and N, the number of molecules loaded on a gel (in mol).

However, because of the signal saturation, a was not constant and equation 1 was no more verified. Thus to estimate the value of a, we assumed that the chemical process of the silver staining (that is the complex formation on the gel of the silver particles with the DNA molecules, and the reduction of silver ions (Vari et al., 1996)) was comparable to the one of a receptor-ligand interaction, and may thus be modelled as a modified Langmuir equation (Lehninger, 1972):

$$OD = \frac{OD_{max}\,N}{K_{st} + N},$$

where OD_{max} was the maximum value that OD can reach.

Since $C = \frac{N}{V}$ (where C, the concentration of the PCR products in mol/µl), we obtained :

$$OD = \frac{OD_{max}\,V}{K_{st}' + V}, \qquad 2$$

where V was the volume of PCR products loaded on the gel (in µl), K_{st} and K_{st}' the constants for the staining process (respectively, in mol and in µl with $K_{st}' = \frac{K_{st}}{C}$).

With $a'=Ca$ (in μl^{-1}), equation 2 can be derived as follow:

$$a' = f'(V) = \frac{OD_{max}\,K_{st}}{(K_{st} + V)^2}. \qquad 3$$

When V tends toward zero,

$$a' = \lim_{V \to 0} f'(V) = \frac{OD_{max}}{K_{st}} = A. \qquad 4$$

Under these conditions, a' (equal to A) was constant. We obtain from equation 1:

$$OD = AV = \frac{OD_{max} V}{K_{st}}. \qquad 5$$

From the equations 2 and 5, we estimated A by :

$$\frac{1}{OD} = \frac{1}{AV} + \frac{1}{OD_{max}}. \qquad 6$$

Determination of the A value allowed to reach without ambiguities, the linear range (when V tends towards zero) in which quantitation process can be realised. So, the calculation of the A coefficient can be easily performed for each *APOE* allele amplification.

3. Results and discussion

We applied this method to the determination of the relative amount of one apolipoprotein E allele compared to another one, using genomic DNA as template, for different parameters such as initial concentration of DNA template or initial percentage of an allele compared to another.

Defined concentrations of genomic DNA from homozygous ε3 and ε4 individuals were mixed to obtain a given initial percentage of the ε4 allele (ranging from 10 to 70%) in the mix. The amplification reaction was performed on 20, 50 and 100 ng of genomic DNA during 30 cycles as previously described (Hixon and Vernier, 1991). After digestion by addition of 12 units of the *Cfo* I endonuclease to the PCR products, DNA fragments were resolved on a 8% polyacrylamide gel, during 4 hours at 12 V/cm. The ε3 allele is characterised by a 91 bp, while the ε4 allele is characterised by a 72 bp.

A range from 0.2 to 4 µl of the digested samples was loaded. After electrophoresis, the gel was fixed during 90 min in 10% (V/V) ethanol, 0.5% (V/V) acetic acid. After two washings with deionised water, the gel was placed in a silver nitrate solution (1mg/ml) during 25 min. The gel was then washed twice with deionised water. The DNA fragments were stained for 30 min in 0.037 % formaldehyde (V/V), hydroxyde nitrate (15 mg/ml). The reaction was inhibited in a sodium carbonate solution (15mg/ml). The different reactions were performed at 20 °C. The developer and silver nitrate solutions were prepared immediately prior use. The gel was digitised on a Sharp JX-325 high resolution colour transmission scanner, and the fragment intensity was measured using the Image Master Software (Pharmacia®) with appropriate background subtraction.

To check that the equation 2 was able to take into account the signal saturation for APOE allelic quantitation, we studied the relationship between the amount of a PCR product loaded

on a gel and the resulting OD measured for different ratios of the ε4 compared with the ε3 allele of the APOE gene. The percentage of the ε4 allele after amplification was calculated as :

$$\frac{N_{\varepsilon 4\,\text{allele}}}{N_{\varepsilon 4\,\text{allele}} + N_{\varepsilon 3\,\text{allele}}} = \frac{L_{\varepsilon 4\,\text{allele}/\varepsilon 3\,\text{allele}} OD_{\varepsilon 4\,\text{allele}}}{L_{\varepsilon 4\,\text{allele}/\varepsilon 3\,\text{allele}} OD_{\varepsilon 4\,\text{allele1}} + OD_{\varepsilon 3\,\text{allele}}}, \qquad 7$$

where $L_{\varepsilon 4\ \text{allele}/\varepsilon 3\ \text{allele}}$ is a coefficient allowing to correct the OD difference associated to the variation of length between the ε3 and ε4 allele restriction fragments. This coefficient was defined as the ratio between the fragment length (in bp), specific of each allele. So, since the ε4 allele after digestion is characterised by 72 pb fragment and the e3 allele, by a 91 pb frgament, $L_{\varepsilon 4\ \text{allele}/\varepsilon 3\ \text{allele}}=91/72$.

To establish the equation, we verified that the amplification efficiency was constant between the different templates and that the L coefficient allowed a valid correction, using kinetic experiments (Figure 1) (data not shown). Introducing the *A* values, we obtained from the equations 5 and 7:

$$\frac{N_{\varepsilon 4\,\text{allele}}}{N_{\varepsilon 4\,\text{allele}} + N_{\varepsilon 3\,\text{allele}}} = \frac{L_{\varepsilon 4\,\text{allele}/\varepsilon 3\,\text{allele}} A_{\varepsilon 4\,\text{allele}}}{L_{\varepsilon 4\,\text{allele}/\varepsilon 3\,\text{allele}} A_{\varepsilon 4\,\text{allele}} + A_{\varepsilon 3\,\text{allele}}}. \qquad 8$$

The *A* coefficients (for the ε4 and ε3 alleles) were obtained from OD by two approaches : (i) estimation 1 is obtained from a curve fitting using the least squares method (Fig. 2b). This method allowed to estimate the K'_{st} constant and the OD_{max} value and thus to calculate the *A* coefficients. (ii) estimation 2 used the equation 6 and allowed to estimate by linear regression the *A* coefficients (Fig. 2c). The estimation 1 gave a higher weight to high concentrations, conversely to the estimation 2 that gave a higher weight to low concentrations.

For the two methods of calculation, the curves obtained by regression followed the plot distribution (Fig. 2b and 2c). This was confirmed by the linear regression obtained from estimation 2, for which the linear regression were always close to 1 (Fig. 2c). Independently

of the estimation method, the final ratio of the ε4 allele corresponded to the initial ratio of this allele whatever the tested percentage. Furthermore, the quality of the method of calculation was not modified by the initial concentration of genomic DNA (Table 1).

In conclusion, we demonstrated that the use of a method developed from the Langmuir equation allowed to take into account a phenomenon of saturation in silver staining and presents several advantages : the amount of template had little effect in our system and the introduction of the K_{st}' constant allowed to normalise the silver staining technique including the unavoidable gel to gel variations. This method of calculation have been applied with success to quantify allelic *APOE* ratio from mRNA of AD and control brain tissues and we demonstrated that the ε4 allele was overexpressed in the ε3/ε4 AD compared with the control samples (34.9±2.7% versus 22.9±2.4%, respectively, $p<0.0001$) (Lambert et al., 1998).

Furthermore, we suggest that this method of calculation could be extended to other techniques of signal detection such as DNA intercaling agents, fluorescent, luminescent or radioactive detection.

REFERENCES.

Becker-André M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). Nucleic Acids Res., 1989, 17: 9347-9351.

Chartier-Harlin M-C, Parfitt M., Legrain S, Pérez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V, Fruchart J-C, Delacourte A, Rossor M, Amouyel P. Apolipoprotein E ε4 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.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, Van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. JAMA, 1997; 278: 1349-1356.

Gilliland G, Perrin S, Blanchart K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci., 1990, 87: 2725-2729.

Hixon JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. J. Lipid Res., 1991, 31: 545-548.

Jensen LG, Lensen HK, Heath F, Eiberg H, Kjeldsen M, Faergeman O, Kolvraa S, Bolund L, Gregersen N. Allele-specific measurement of low-density lipoprotein receptor transcript levels. Hum. Mutation., 1996, 8: 126-133.

Lambert J-C, Pérez-Tur J, Dupire M-J, Galasko D, Mann D, Amouyel P, Hardy J, Delacourte A, Chartier-Harlin M-C. Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease, Hum. Mol. Genet., 1997; 6: 2151-2154.

Lambert, J-C, Berr C., Pasquier F, Delacourte A, Frigard B, Cottel D, Pérez-Tur J, Mouroux V, Mohr M, Cécyre D, Galasko D, Lendon C, Poirier J, Hardy J, Mann D, Amouyel P, Chartier-Harlin M-C. Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared to -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's Disease. Hum. Mol. Genet., 1998; 7: 1511-1516.

Lehninger AL. Biochemistry, 6th edition. Worth Publishers, INC, NY, 1972.

Vari F, Bell K. A simplified silver diammine method for the staining of nucleic acids in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 1996; 17:20-25.

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci., 1989; 86: 9717-9721.

initial ratio of ε4 allele	Initial genomic DNA quantity in each PCR sample			
	20 ng		50 ng	100 ng
	estimation 1[(a)]	estimation 2[(b)]	estimation 2[(b)]	estimation 2[(b)]
10%	11.49 ± 0.26	10.17 ± 0.04	11.37 ± 1.13	10.53 ± 1.61
20%	18.85 ± 0.03	20.87 ± 0.47	-	-
30%	28.51 ± 1.38	30.04 ± 0.41	31.30 ± 0.57	31.08 ± 0.52
40%	38.82 ± 1.11	39.61 ± 0.60	-	-
50%	50.54 ± 1.60	49.94 ± 0.58	49.33 ± 2.55	49.91 ± 0.76
70%	68.30 ± 3.60	69.25 ± 2.24	69.35 ± 1.53	69.06 ± 0.24

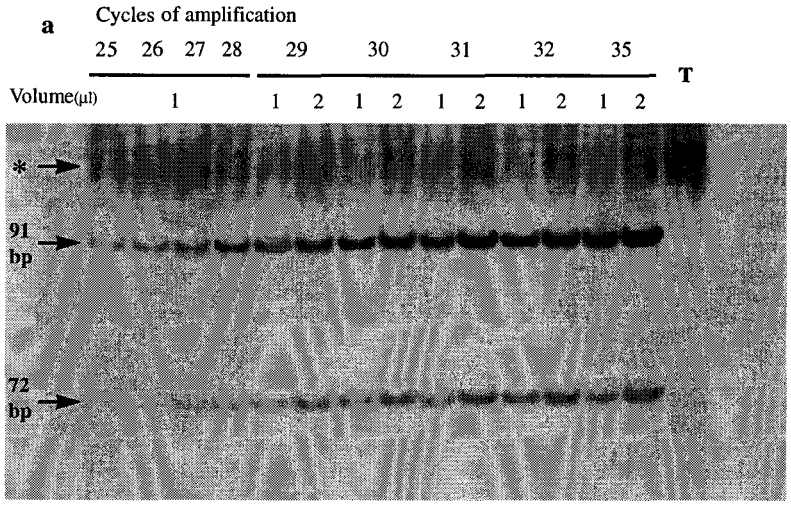
Table 1. Comparison of the estimated and calculated final ε4 ratio in function of the genomic DNA amount in the PCR sample and the known initial ε4 ratio. Three determinations were done for experiments using 20 ng of DNA, the other conditions were assayed twice each.

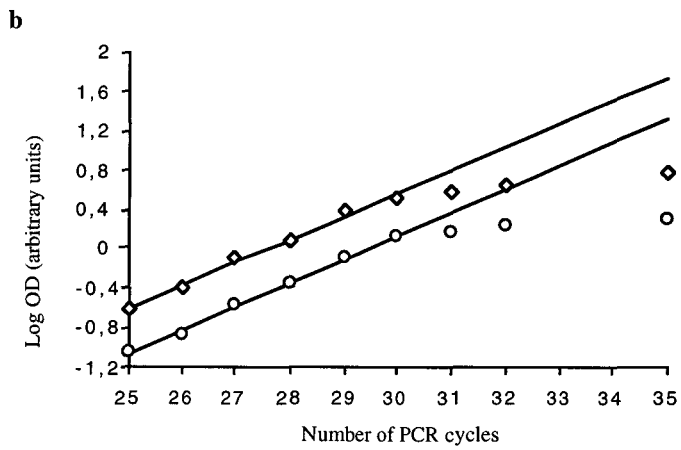
[(a)] estimation 1 corresponded to the curve fitting using the method of least squares and allowed to calculate the K'_{st} and OD_{max} values.

[(b)] estimation 2 consisted to calculate directly the *A* coefficients from the equation 6.

Fig. 1. Example of kinetic experiments. (a) Digitalised gel of the ε3 and ε4 alleles digested PCR products after silver staining. **(b)** Quantitation by densitometry of the restriction fragments. A linearity zone (25-30 cycles of amplification) was defined between the logarithm of the staining intensity of the (72 bp O, 91bp ◊) restriction fragments and the numbers of PCR cycles. **(c)** A linear relationship between the 91bp and 72 bp OD was established in the linearity range of the PCR reaction. The calculated ratio of ε4 allele was 27.6% whereas the initial ratio was 27.3%.

Figure 2. Example of semi-quantitation experiments and the different mathematical processing developed to interpretate the experimental measures. (a) This example corresponded to an ε4 allele initial ratio of 20%. **(b)** Relationship between the staining intensity of the two restriction fragments (72 bp, 91bp) and the volume of PCR products applied on the gel. Curve fittings (full line) using the least squares method from the equation 2, were done for the 72bp (◊) and 91bp (O) OD values. For the 72 bp (ε4 allele) fragment, we found OD_{max}=2.881 and K'_{st}=6.448 µl. For the 91bp (ε3 allele), the calculated values were OD_{max}=4.327 and K'_{st} =1.781 µl. The final ε4 allele percentage calculated from these data was 18.87%. **(c)** Relationship between the inverse of the staining intensity of the two (72 bp ◊, 91bp O) restriction fragments and inverse of the volume of PCR products. Linear regressions (full line) were performed for the 72bp and 91bp OD values. The equation obtained for the ε4 allele (72bp OD values) was y=1.702x+0.615 (r^2=0,995) and y=0.348x+0.281 (r^2=0,999) for the ε3 allele (91 bp values). The final ε4 allele percentage calculated from these data was 20.53%.


a
Cycles of amplification
25 26 27 28 29 30 31 32 35
T
Volume(µl)
1 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2
*
91 bp
72 bp


b
Log OD (arbitrary units)
2
1,6
1,2
0,8
0,4
0
-0,4
-0,8
-1,2
25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
Number of PCR cycles

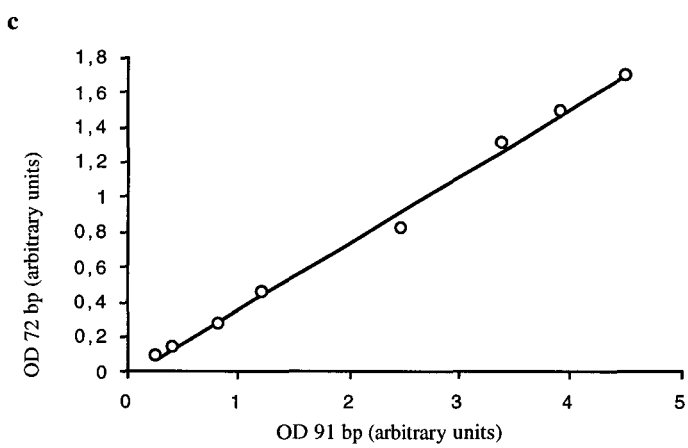

c
OD 72 bp (arbitrary units)
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0 1 2 3 4 5
OD 91 bp (arbitrary units)

Figure 1

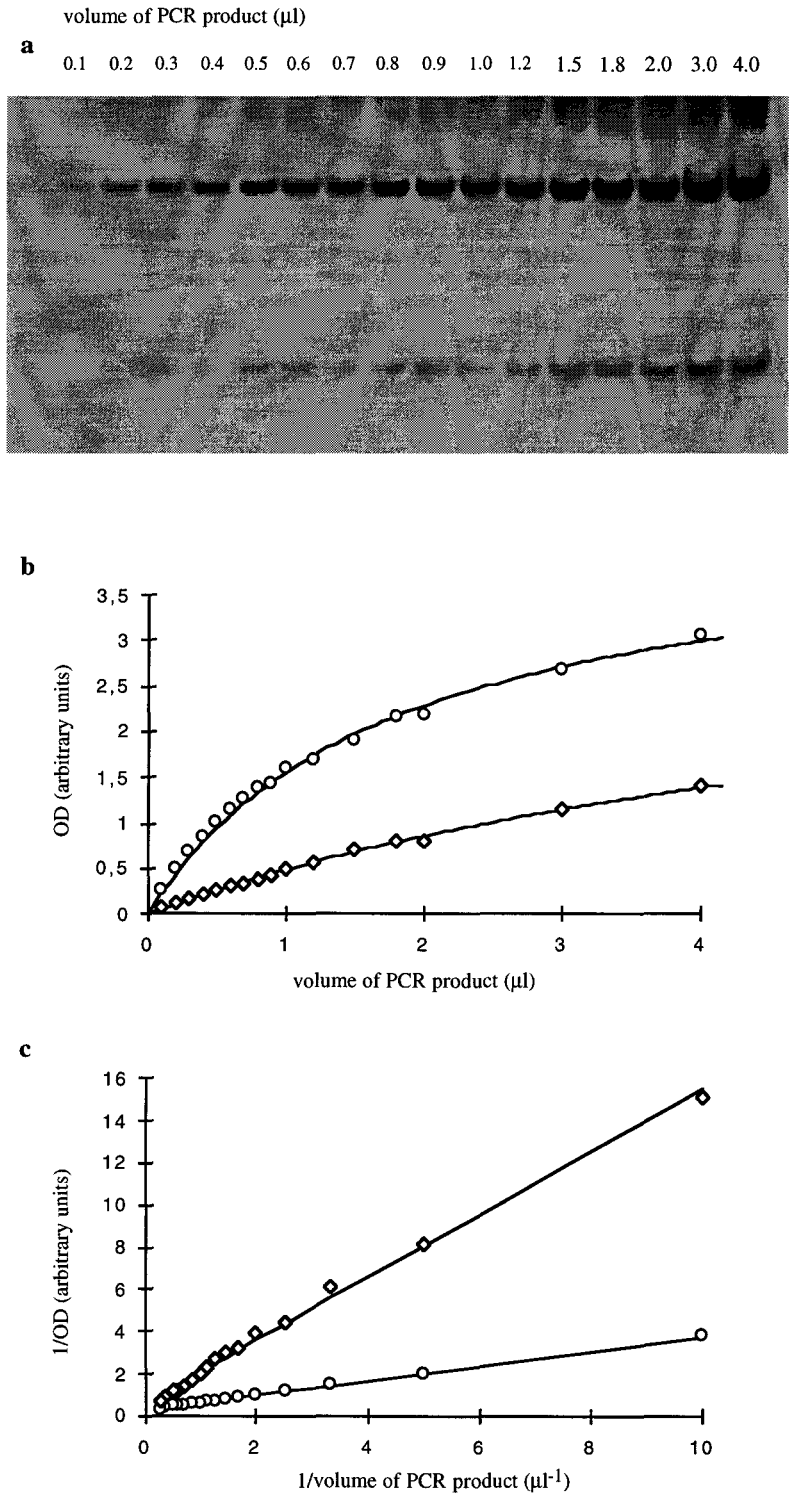

a
volume of PCR product (µl)
0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0 1.2 1.5 1.8 2.0 3.0 4.0
b
OD (arbitrary units)
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0 1 2 3 4
volume of PCR product (µl)
c
1/OD (arbitrary units)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0 2 4 6 8 10
1/volume of PCR product (µl-1)

Figure 2

© 1997 Oxford University Press

Human Molecular Genetics, 1997, Vol. 6, No. 12 2151–2154

Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease

Jean-Charles Lambert[1,2], Jordi Pérez-Tur[1,3], Marie-Joëlle Dupire[1], Douglas Galasko[4], David Mann[5], Philippe Amouyel[2], John Hardy[3], André Delacourte[1] and Marie-Christine Chartier-Harlin[1,2,*]

[1]INSERM Unité 422, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France, [2]INSERM CJF95-05, Institut Pasteur de Lille, 1 rue de Calmette, 59019 Lille Cedex, France, [3]Birdsall Building, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL 32224, USA, [4]UCSD, Medical Centre, Pulman Ambulatory Care Centre, 9350 Campus Point Drive, La Jolla, CA 92037, USA and [5]Department of Pathological Sciences, Stopford Building, University of Manchester, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK

Received July 25, 1997; Revised and Accepted August 2, 1997

The APOE ε4 allele is a strong genetic susceptibility factor for Alzheimer's disease. Interaction with other biological factors may modulate the effect of the apoE isoforms. However, previous work suggested that other genetic variability within the APOE locus, influencing the effect of the ε4 allele, may exist. Such variability could modify the expression of the APOE gene and, in particular, the level of expression of APOE alleles could be an important determinant of disease pathogenesis. To test this hypothesis we examined the levels of expression of APOE in heterozygotes with AD and in controls, using a new method of semi-quantitation. We report that relative ε4 mRNA expression is increased in AD compared with controls and suggest that genetic variability in the neural expression of APOE contributes to disease risk.

INTRODUCTION

The ε4 allele of the APOE gene is a major risk factor for late-onset Alzheimer's disease (LOAD) (1), and is also implicated as a risk factor for early-onset disease in some populations (2,3). Previous studies have described ε4 homozygotes as having a higher risk of developing disease than ε3ε4 heterozygotes. However, individuals bearing one or two ε4 alleles, do not inevitably develop the disease. Detailed genetic analysis around the APOE locus has suggested the existence of other genetic variability in this region which could contribute to disease risk (4). There are two possible explanations for these observations: (i) there is another genetically variable locus in the vicinity of the APOE gene involved in the pathogenesis of the disease; (ii) there is a genetic variability in the control of expression of the APOE gene (4).

There has been little examination of the mRNA expression of APOE in AD (5,6). The available evidence suggests that APOE expression is increased by neuronal damage (7,8) and that the bulk of the expression occurs in astrocytes (5). This expression is believed to be part of a compensatory mechanism aimed at aiding reafferentation and reactive synaptogenesis (9). Only a few studies have examined the expression of the apoE protein in AD cases and controls relative to the APOE genotype (9,10). Bertrand *et al.* have suggested that the amount of apoE protein could be inversely correlated to the number of ε4 alleles carried by subjects: higher levels were observed in ε3 homozygotes, lower in ε4 homozygotes and intermediate levels in ε3ε4 heterozygotes (10).

We hypothesised that, since ε4 homozygotes have a higher risk of developing disease than ε3ε4 heterozygotes, and a high proportion of individuals with the latter genotype reach a greater age without developing AD, a likely explanation of this was that there was genetic variability in neural expression at the APOE locus and that ε3ε4 heterozygote individuals who were high ε4 expressors and/or low ε3 expressors were more likely to develop AD than individuals with high ε3 expressors and/or low ε4 expressors.

The identification of the APOE allele transcription products is easily achieved by RT-PCR, using restriction fragment length polymorphism. We developed a semi-quantitative assay to measure allelic expression of APOE mRNA by RT-PCR using silver staining (11). This method of quantitation has been applied to brains of heterozygote subjects collected at various centres and used to assess the percentage of ε4 mRNA expression in ε3ε4 and ε2ε4 subjects and ε2 mRNA expression in ε2ε3 individuals. This has been carried out both in AD cases and controls.

RESULTS

We selected a series of ε3ε4, ε2ε4, ε2ε3 AD cases (n = 14) and controls (n = 12) in order to measure the relative level of expression of the APOE allele in the frontal cortex (Fig. 1). We observed that ε3 mRNA expression was consistently greater than ε4 mRNA expression in all cases (Fig. 2). In addition, there was a clear and consistent difference in the ε4 allelic expression ratio between AD

*To whom correspondence should be addressed at: INSERM CJF95-05, Institut Pasteur de Lille, 1 rue de Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Tel: +33 3 20 87 72 28; Fax: +33 3 20 87 78 94; Email: marie-christine.chartier-harlin@pasteur-lille.fr

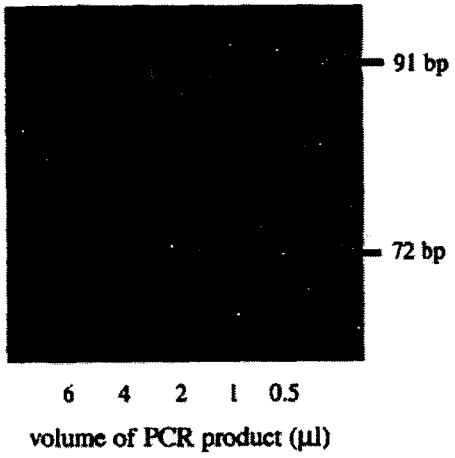


Figure 1. Semi-quantitation of the ε4 allele ratio in a control case. The final ε4 allele ratio calculated from this data was 21.42%.

cases and controls (Fig. 2), with AD cases showing a higher relative expression of ε4 mRNA than controls (34.4 ± 2.6% versus 22.6 ± 1.8%, respectively, $P = 0.001$ with Mann–Whitney test). Regarding the other heterozygous genotypes, the small size of each group prevented us from reaching any definite conclusion. Nevertheless, a trend towards the same situation as observed in the ε3ε4 group could be noted, an increase in the expression of the ε4 allele in the ε2ε4 group (42.6 ± 3.7% in the AD cases versus 28.9 ± 1.2% in the only control), whereas nothing was apparent in the ε2ε3 group (39.0 ± 1.4% in the only AD case versus 45.8 ± 4.3% in controls). Furthermore, a difference in the allelic expression ratio between ε2ε4 and ε3ε4 AD cases was observed, since ε2ε4 patients showed a 1.25-fold increase of the ε4 allele ratio ($P = 0.01$ with Mann–Whitney test).

DISCUSSION

It is important to note that measurement of the ratio of expression of the two alleles in heterozygotes is likely to be a much more robust measurement than the determination of absolute levels of mRNA expression in the same tissue, since the latter will be profoundly affected by post-mortem delay, agonal state and cell population and density.

As can be seen in Figure 2, the level of expression of the ε3 allele is consistently higher than that of the ε4 allele in the AD group as well as in the control group. These data suggest that there is either differential stability of the different mRNA species, or that there is genetic variability in the expression of the two alleles in disequilibrium with the coding polymorphism. However, in addition there was a clear and consistent difference in the ε4 allelic expression ratio between AD cases and controls. These results are consistent with the notion that part, at least, of the genetic risk of developing AD encoded at the APOE locus relates to the expression of this protein in the brain. It would seem that heterozygote individuals who express a relatively high proportion of the ε4 allele are at greater risk for developing disease than those expressing a relatively low proportion. The observation that the different alleles of APOE are not equally expressed may be of importance in the formulation of hypotheses relating to the role of APOE in the pathogenesis of AD in general. At present, there is much speculation and experimentation designed to determine the nature of the role of the different alleles of APOE in the pathogenesis of AD. As previously suggested, the E4 isoform may facilitate (12) or not limit (13) the amyloid substance deposition. This isoform would not protect against oxidative stress, conversely to the E2 isoform (14). Finally, it has been suggested that the E2 and E3 isoforms may prevent the aggregation of Tau protein, while the E4 isoform may not prevent the paired helical filament formation (15). However, these hypotheses are based on the premise that the APOE allele isoforms are equally expressed and present at similar concentrations in the brain. These isoform-specific differences could be enhanced by a different representation of each isoform in an individual.

To date, it seems difficult to link APOE mRNA and apoE protein levels. Several studies had explored this issue reporting contradictory findings in brain (10,16), cerebrospinal fluid (17,18) and plasma (19). But even if the apoE level was tested according to the APOE genotype, none of the previous studies have been able to determine the relative ratio between the different isoforms and thus our results are not comparable with them. The development of isoform-specific monoclonal antibodies would help to determine whether the variation that is observed in our population is also present at the protein level (20).

There are two major findings in our work. First, that the expression of the ε3 allele is consistently higher than the expression of the ε4 allele. Second, that the expression of the ε4 allele beyond a certain level seems to greatly influence the vulnerability of an individual to Alzheimer's disease.

It is interesting to note that APOE is up-regulated as a consequence of an insult. Poirier *et al.* showed an increase in the level of expression of APOE mRNA in rat after lesioning of the cerebral cortex (6). Similarly, Diedrich *et al.* showed that APOE mRNA was increased in AD brains (5). Together these results support an event, which may lead to an increase of the APOE mRNA and, in parallel, a distortion of the allelic expression. The distortion of the allelic expression may be specific to brain, and possibly restricted to certain areas (21). This suggests a neural genetic susceptibility for AD associated with the APOE gene.

Interestingly, Templeton reached a similar conclusion using a cladistic analysis of our previously reported genetic data (4). Using haplotype data from markers surrounding the APOE locus, including the APOE polymorphism, Templeton showed that the coding polymorphism in the APOE gene was not sufficient to explain the increased risk for AD (22). Our data suggest that the influence of non-coding polymorphism on ApoE expression may supply the rest of the answer.

MATERIALS AND METHODS

RNA extraction

Fourteen late-onset AD cases of Caucasian origin with a mean age of 74.1 ± 11.8 years (five male and nine female) and 12 controls with a mean age of 83.0 ± 10.6 years (five male and seven female) were selected as a function of their APOE genotype (23). The mean age at sampling was 75.6 ± 8.8 years for the AD cases genotyped ε3ε4 and 77.6 ± 11.0 years for the controls genotyped ε3ε4. Diagnoses were confirmed by neuropathological examination.

Total RNA extraction was performed from frontal lobe samples as described by Gilmour *et al.* (24) and then digested by DNase

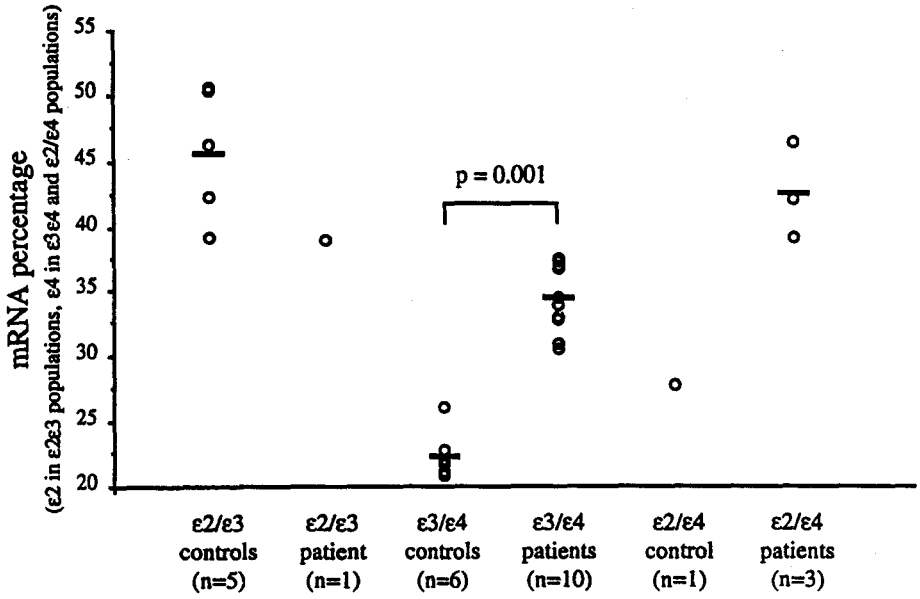


Figure 2. Differential expression of the APOE mRNA for the three heterozygote genotypes in Alzheimer's disease cases and controls. The ε2 mRNA percentage was measured in the ε2ε3 population and the ε4 mRNA percentage in the ε3ε4 and ε2ε4 population. The average level of expression is indicated by a bold line in each category. For each brain sample, RT-PCR and semi-quantitation was repeated three times.

(Eurogentec). No DNA contamination was observed after DNase digestion as detected by PCR of the digested product.

RT-PCR amplification of APOE mRNAs

The RT reaction was performed for 1 h 30 min at 37°C, using the F4 primer 5′-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTA-3′ at 50 pmol and 1 µg of total RNA as template for the M-MLV reverse transcriptase following the conditions described by the supplier (Gibco/BRL). The PCR step was carried out with the F6 primer 5′-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3′ at 50 pmol in a final volume of 10 µl, for 30 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C each cycle) to remain in the linear range of the reaction. Briefly, PCR was performed in a total volume of 25 µl containing 1.25 U *Taq* DNA polymerase, 0.2 mM of each dNTP, 4 mM of DTT, 0.1 mM of $MgCl_2$, 0.04% of Triton X-100, 10% (v/v) of glycerol using the whole RT reaction as template.

Electrophoresis

RT-PCR DNA was then digested by 12 U *Cfo*I endonuclease (Promega), DNA fragments were resolved on an 8% polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide 19:1), over 4 h at 12 V/cm. A range from 6 to 0.2 µl of the RT-PCR product was loaded.

Silver staining

The gel was fixed over 90 min in 10% (v/v) ethanol, 0.5% (v/v) acetic acid. After two washings with deionised water, the gel was placed in silver nitrate solution (1 mg/ml) for 25 min. The gel was then washed twice with deionised water. The DNA polymorphism fragments were stained for 30 min in 0.037 % formaldehyde (v/v), hydroxyde nitrate (15 mg/ml). Finally, the reaction was stopped in a sodium carbonate solution (15 mg/ml). The developer and silver nitrate solutions were prepared extemporaneously. The gel was digitalised on a Sharp JX-325 high resolution colour scanner, and the fragment intensity was measured using the Image Master Software (Pharmacia) with appropriate background subtract.

Allele quantitation

The percentage of the ε4 allele was calculated with the equation below as described in ref. 11:

$$\frac{No^{\epsilon 4\ mRNA}}{No^{\epsilon 4\ mRNA} + No^{\epsilon 2\ or\ \epsilon 3\ mRNA}} = \frac{A\alpha'^{\epsilon 4\ mRNA}}{A\ \alpha'^{\epsilon 4\ mRNA} + \alpha'^{\epsilon 2\ or\ \epsilon 3\ mRNA}}$$

$No^{\varepsilon 4\ mRNA}$ and $No^{\varepsilon 3\ mRNA}$ were the initial number of the ε3 and ε4 mRNAs. $\alpha'^{\varepsilon 4\ mRNA}$ and $\alpha'^{\varepsilon 2\ or\ \varepsilon 3\ mRNA}$ were the coefficients allowing silver staining, and the phenomenon of saturation due to this staining, to be integrated and normalised. A is a coefficient of proportionality, correcting for the length difference between each restriction fragments. After digestion by *Cfo*I, the ε3, ε2 and ε4 alleles can be characterised by 91, 83 and 72 bp fragments, respectively. The A coefficient is therefore calculated as A = 91/72 for ε3ε4 individuals, A = 83/72 for ε2ε4 individuals and A = 91/83 for the ε2ε3 population.

Because both ε2 and ε3 alleles give a restriction length fragment at 91 bp, $AOD_{\varepsilon 2\ mRNA} + OD_{\varepsilon 3\ mRNA} = OD_{91\ bp}$.

The initial ε2 allele percentage in the ε2ε3 population was calculated as:

$$\frac{No^{\epsilon 2\ mRNA}}{No^{\epsilon 2\ mRNA} + No^{\epsilon 3\ mRNA}} = \frac{A\alpha'^{\epsilon 2\ mRNA}}{\alpha'^{\ 91\ bp}}$$

Details of the calculations and modelling of the method are described in ref. 11. We tested the viability of this approach on the APOE alleles by using genomic DNA as template for different parameters such as initial concentrations of DNA template or initial percentage of an allele compared with another (11).

Linear regressions (necessary to perform ratio percentage) and Mann–Whitney U-test were performed using SAS software release 6.04 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

REFERENCES

1. Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., St. George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D. and Roses, A.D. (1993) Association of apolipoprotein E allele ε4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, **43**, 1467–1472.
2. Van Duijn, C.M., De Kniff, P., Wehnert, A., De Voecht, J., Bronzova, J.B., Havekes, L.M., Hofman, A. and Van Broeckhoven, C. (1995) Reduced survival of patients with early-onset Alzheimer's disease that carry the Apolipoprotein E2 allele. *Ann. Neurol.*, **37**, 605–610.
3. Pérez-Tur, J., Campion, D., Martinez, M., Brice, A., Tardieu, S., Hannequin, D., Agid, Y., Delacourte, A., Clerget-Darpoux, F., Chartier-Harlin, M.-C. and the French Alzheimer's disease collaborative group (1995) Evidence for apolipoprotein E ε4 association in early-onset Alzheimer's patients with late-onset relatives. *Am. J. Med. Genet.*, **60**, 550–553.
4. Chartier-Harlin, M.-C., Parfitt, M., Legrain, S., Pérez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vidal, O., Roques, P., Gourlet, V., Fruchart, J.C., Delacourte, A., Rossor, M. and Amouyel, P. (1994) Apolipoprotein E ε4 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.
5. Diedrich, J.F., Minnigan, H., Carp, R.I., Whitaker, J.N., Race, R., Frey, W.,II and Haase, A.T. (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**, 4759–4768.
6. Poirier, J., Hess, M., May, P.C. and Finch, C.E. (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Mol. Brain Res.*, **11**, 97–106.
7. Malhey, R.W. (1988) Apolipoprotrein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, **240**, 622–630.
8. Leblanc, A.C. and Poduslo, J.F. (1990) Regulation of Apolipoprotein E gene expression after injury of the rat sciatic nerve. *J. Neurosci. Res.*, **25**, 162–171.
9. Guillaume, D., Dea, D., Davignon, J. and Poirier, J. (1995) Low-density lipoprotein pathways in the central nervous system and Apolipoprotein E isoform-specific differences. In Iqbal, Mortimer, Winblad and Wisniewski (eds) *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. John Wiley and Son, pp. 386–395.
10. Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C.E. and Pasinetti, G.M. (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Mol. Brain Res.*, **33**, 174–178.
11. Lambert, J.-C., Pérez-Tur, J., Amouyel, P., Delacourte, A. and Chartier-Harlin, M.-C. (1997) Overcoming and normalisation of the signal saturation due to silver staining: a way to quantify allele specific RT-PCR products. *Nucleic Acids Res.*, submitted.
12. Strittmatter, W.J, Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.-M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M, Goldgaber, D. and Roses, A.D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8098–8102.
13. Evans, K., Berger, E.P., Cho, C.G., Weisgraber, K.H. and Lansburry, P.T. (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implication for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 763–767.
14. Miyata, M. and Smith, J.D. (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β-amyloid peptides. *Nature Genet.*, **14**, 55–60.
15. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Goedert, M., Saunders, A.M., Huang, D., Corder, E.H., Dong, L.-M., Jakes, R., Alberts, M.J., Gilbert, J.R., Han, S.H., Hulette, C., Einstein, G., Schmechel, D.E., Pericak-Vance, M.A. and Roses, A.D. (1994) Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease are related to Apolipoprotein E genotype. *Exp. Neurol.*, **125**, 163–171.
16. Harr, S.D., Vint, L., Hollister, R., Hyman, B.T. and Mendez, A.J. (1996) Brain expression of Apolipoprotein E, J and A-I in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, **66**, 2429–2435.
17. Lehtimäki, T., Pirttilä, T., Mehta, P.D., Wiesniewski, H.M., Frey, H. and Nikkari, T. (1995) Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum. Genet.*, **95**, 39–42.
18. Lefranc, D., Vermersch, P., Dallongeville, J., Daems-Monpeurt, C., Petit, H. and Delacourte, A. (1996) Relevance of the quantification of apolipoprotein E in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **212**, 91–94.
19. Taddei, K., Clarnette, R., Gandy, S.E. and Martins, R.N. (1997) Increased plasma apolipoprotein E (apoE) levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **223**, 29–32.
20. Nukina, N., Uchida, K., Sakamoto, T., Ide, K. and Kanazawa, I. (1995) Monoclonal antibody against the polymorphic site distinguishes apolipoprotein E4 from other isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **216**, 467–472.
21. Ishimaru, H., Ishikawa, K., Haga, S., Shoji, M., Ohe, Y., Haga, C., Sasaki, A., Takashashi, A. and Maruyama, Y. (1996) Accumulation of apolipoprotein E and b-amyloid-like protein in a trace of the hippocampal CA1 pyramidal cell layer after ischaemic delayed neuronal death, *Neuroreport*, **7**, 3063–3067.
22. Templeton, A.R. (1995) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping or DNA sequencing. V. Analysis of case/control sampling designs: Alzheimer's disease and the Apolipoprotein E locus. *Genetics*, **140**, 403–409.
23. Hixon, J.E. and Vernier, D.T. (1991) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha*I. *J. Lipid Res.*, **31**, 545–548.
24. Gilmour, R.S. and Dixon, G.H. (1972) Biosynthesis of protamine in trout testis. *J. Biol. Chem.*, **247**, 4621–4627.

Mise en évidence de polymorphismes dans le promoteur du gène de l'APOE.

Impact de ces mutations sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer.

Présentation du travail.

Nos résultats précédents suggèrent donc l'existence d'une variabilité génétique dans le contrôle de l'expression du gène de l'APOE, susceptibles de moduler le risque de développer la maladie d'Alzheimer en modifiant l'expression des allèles de ce gène.

Nous avons donc rechercher des mutations dans la zone proximale du promoteur de l'APOE et avons mis en évidence un polymorphisme que nous avons appelé Th1/E47cs, car présent dans un site consensus de fixation du facteur de transcription Th1/E47. Dans un premier temps, nous avons testé l'impact de ce polymorphisme sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer, en y associant l'étude du marqueur anonyme D19S178, utilisé en 1994 par Chartier-Harlin *et al.* (395), mais aussi le polymorphisme 1E1, situé dans l'intron 1 de l'APOE (634).

Dans un même temps, 4 autres polymorphismes ont été décrits dans le promoteur de l'APOE (635). En particulier, le polymorphisme -491 AT a été associé à une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer (636). Nous avons alors estimé les impacts respectifs des polymorphismes Th1/E47cs et -491 AT sur la maladie. De plus, en agrandissant l'étude portant sur l'expression des allèles de l'APOE dans le tissu cérébral, nous avons cherché à établir des relations génotype/phénotype intermédiaire entre ces deux polymorphismes et les niveaux d'expression des allèles de l'APOE.

Présentation des résultats.

Caractérisation d'un nouveau polymorphisme dans le promoteur du gène de l'APOE.

Le séquençage des 375 bases en amont de la boîte TATA du gène de l'APOE, nous a

permis de mettre en évidence un polymorphisme, caractérisé par le changement d'une guanine (allèle G) par une thymine (allèle T) et situé à -186 bases de la boite TATA ou à -219 bases du site d'initiation de transcription. Ce polymorphisme a été appelé Th1/E47cs (Th1/E47 consensus) car se trouvant dans un site consensus de fixation du facteur de transcription Th1/E47cs.

Confirmation de l'implication du locus de l'APOE dans la maladie d'Alzheimer, indépendamment du polymorphisme ε2/ε3/ε4 de l'APOE.

L'association avec la maladie d'Alzheimer, des polymorphismes Th1/E47cs, 1E1 et D19S178, a été testée sur une population comprenant 293 cas atteints de formes sporadiques probables de maladie d'Alzheimer et 310 témoins. Dans cette population, les polymorphismes Th1/E47cs et 1E1 sont associés à la maladie d'Alzheimer, l'allèle T de Th1/E47cs présentant un effet délétère, tandis que l'allèle C de 1E1 est associé à un effet protecteur. Par contre, le marqueur anonyme D19S178 ne semble pas être associé à la pathologie.

Du fait d'un déséquilibre de liaison significatif entre les polymorphismes Th1/E47cs, 1E1 et ε2/ε3/ε4 de l'APOE, nous avons déterminé de deux façons si ces polymorphismes pouvaient présenter un impact indépendant de l'allèle ε4 sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Nous avons (i) estimé les fréquences des haplotypes résultant de la combinaisons de tous les polymorphismes étudiés et (ii) déterminé l'impact de chacun des polymorphismes, ajustés les uns par rapport aux autres par régression logistique multivariée. Ces deux approches nous ont permis de montrer que l'association des polymorphismes Th1/E47cs et 1E1, permettait de mieux définir des sous populations à risque par rapport aux seuls polymorphismes ε2/ε3/ε4 de l'APOE.

Effet propre du polymorphisme Th1/E47cs ?

Même si les résultats précédents confirment que le locus de l'APOE est impliqué dans la pathologie en dehors du polymorphisme ε2/ε3/ε4 de ce gène, cette étude ne nous permet pas réellement de déterminer si les polymorphismes Th1/E47cs ou 1E1 sont fonctionels ou correspondent à des marqueurs en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme. En effet, dans la même période, une équipe rapportait qu'un polymorphisme dénommé -491 AT était associé au risque de développer la maladie d'Alzheimer (636). Cependant, un certain nombre de nos résultats renforce l'hypothèse d'un rôle fonctionel Th1/E47cs : (i) Nous avons déterminé que le polymorphisme Th1/E47cs, mais pas le polymorphisme 1E1, peut moduler le risque associé à l'allèle ε4, suggérant que ce polymorphisme a un impact sur l'expression des allèles de l'APOE. (ii) Nous avons testé l'impact des polymorphismes -491 AT, -427 CT et Th1/E47cs en augmentant l'effectif de la population précédemment étudiée, incluant ainsi 573 patients atteints de formes probables de la maladie d'Alzheimer et 509 témoins. Dans ces conditions, seul l'allèle T du polymorphisme Th1/E47cs est associé à une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer, indépendamment de l'allèle ε4.

Impact du polymorphisme Th1/E47cs sur le taux d'expression des allèles de l'APOE.

Nos données épidémiologiques suggérant donc un effet propre du polymorphisme Th1/E47cs, nous avons supposé que ce dernier pouvait moduler l'expression des allèles de l'APOE. Tout d'abord, en augmentant le nombre d'échantillons de tissus cérébraux étudiés, nous avons confirmé la surexpression relative de l'allèle ε4 par rapport à l'allèle ε3 chez les patients comparés aux témoins. Ces résultats ont été étendus aux individus de génotype ε2/ε4,

où une surexpression relative de l'allèle ε4 est aussi mis en évidence, l'allèle ε2 étant sous exprimé chez les malades de génotype ε2/ε3 par rapport aux témoins de même génotype.

Lorsque le taux d'expression de l'allèle ε4 est stratifié en fonction du génotype Th1/E47cs, il est mis en évidence une modification de ce taux chez les patients hétérozygotes, seul génotype pour lequel nous puissions estimer un effet différent des allèles de Th1/E47cs. Ces résultats suggèrent donc que le polymorphisme Th1/E47cs est fonctionnel et est capable de moduler l'expression du gène de l'APOE dans le tissu cérébral.

Discussion.

Ainsi, nos résultats semblent-ils indiquer que le polymorphisme Th1/E47cs est associé à la maladie d'Alzheimer, l'allèle T de ce polymorphisme augmentant le risque de développer la pathologie. Un certain nombre d'autres données semble indiquer que ce polymorphisme est fonctionnel : (i) Son impact sur la pathologie est indépendant de l'allèle ε4, malgré un déséquilibre de liaison entre ces deux allèles. (ii) Une étude *in vitro* a montré qu'en fonction des allèles, le profil électrophorétique en gel retard n'était pas identique, indiquant une fixation de protéines nucléaires différentes. (iii) L'allèle T est associé à une diminution d'expression d'un gène rapporteur par rapport à l'allèle G, dans une lignée d'hépatocytomes (635). (iv) Enfin, le polymorphisme Th1/E47cs est capable de moduler le taux d'expression de l'allèle ε4 dans le tissu cérébral des malades de génotype ε3/ε4. Cependant à ce jour, aucune étude épidémiologique n'a été publiée concernant ce polymorphisme.

Il n'en est pas de même pour le polymorphisme -491 AT, pour lequel le génotype AA a été initialement associé à une augmentation du risque de développer la pathologie. Plusieurs études, outre la nôtre, ont tenté de vérifier les résultats publiés par Bullido *et al.*, les résultats obtenus étant contradictoires. Ainsi, trois d'entre elles reportent une association de ce

polymorphisme avec la maladie d'Alzheimer (637-639) tandis que trois autres n'ont pu montrer cette association (640-642). La plupart de ces études utilisent des populations relativement restreintes, pouvant ainsi expliquer la difficulté à obtenir des résultats reproductibles. Cependant, un autre point important est le fait que les fréquences génotypiques entre les différentes populations de témoins varient, celles ci étant significativement différentes entre les populations hispanique, japonaise, américaine mais aussi française. Cela suggère donc que l'impact de ce polymorphisme puisse être différent en fonction du groupe ethnique étudié, expliquant ainsi l'hétérogénéité des résultats obtenus. Par ailleurs, des résultats *in vitro* suggèrent tout de même la fonctionnalité du polymorphisme -491 AT. En effet, l'allèle A comparé à l'allèle T, est associé à une augmentation de l'expression d'un gène rapporteur mais aussi à une fixation plus importante de protéines issues d'extraits nucléaires (636).

Ainsi, apparaît-il que les résultats concernant l'implication des variants du promoteur de l'APOE sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer, peuvent paraître ambigus en raison de la difficulté à déterminer l'effet propre de chacun de ces polymorphisme par rapport au polymorphisme ε2/ε3/ε4 de l'APOE, mais aussi en raison des variations des fréquences génotypiques observées entre les populations. Ainsi faut-il s'attendre à de nombreux travaux épidémiologiques contradictoires et seul un nombre important d'études indépendantes, permettra de répondre à ces contradictions.

© 1998 Oxford University Press

Human Molecular Genetics, 1998, Vol. 7, No. 3 533–540

A new polymorphism in the *APOE* promoter associated with risk of developing Alzheimer's Disease

Jean-Charles Lambert[1], Florence Pasquier[2], Dominique Cottel[1], Bernard Frigard[3], Philippe Amouyel[1,*] and Marie-Christine Chartier-Harlin[1]

[1]INSERM CJF95-05, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France, [2]CHR et U de Lille, Clinique Neurologique, Centre de la Mémoire, Hôpital Salengro, 59037 Lille cedex, France and [3]Centre de Gériartrie de Wasquehal Molinel, rue Salvador Allende, B.P. 165, 59444 Wasquehal, France

Received October 28, 1997; Revised and Accepted December 19, 1997

The ε4 allele of the Apolipoprotein E gene (*APOE*), one of the main allele of *APOE* polymorphism, is a major risk factor for the development of Alzheimer's disease. However, several data suggest that genetic factors, within the *APOE* locus, may also modulate the risk associated with this polymorphism. We look for new mutations in the *APOE* promoter, susceptible to modify the risk associated with the *APOE* ε4 allele. We characterised a G→T mutation at −186 bp of the *APOE* gene TATA box, named Th1/E47cs. This new polymorphism is located in a consensus sequence of a potential transcriptional (Th1/E47) factor binding site. We studied the impact of this new polymorphism with those of other markers of the *APOE* locus in a large case-control study and observed that Th1/E47cs modulated the influence of the *APOE* ε4 allele on the risk of Alzheimer's disease.

INTRODUCTION

The apolipoprotein E gene (*APOE*), a key player of the lipid transport, exists as three main alleles in the general population: ε2, ε3 and ε4. These polymorphisms correspond to mutations in the coding sequence of the *APOE* gene resulting in amino acid substitutions (Arg and Cys) at positions 112 and 158 of the protein. This gene is located on chromosome 19 at position q13.2. The implication of chromosome 19 in Alzheimer's disease (AD) was suspected on at least three occasions (1–3) before the report of an association between late-onset AD and the *APOE* ε4 allele (4). Numerous studies confirmed this finding and extended this observation to early-onset AD (5–7). It is now established that carrying an ε4 allele increases the risk of AD in an allele dose dependent manner and shifts the age of onset of the disease to earlier ages (8). Conversely, bearing an ε2 allele confers a protection against the disease (5,9,10). Thus, the *APOE* genotype appears as an important biological marker for AD susceptibility accounting for between 45 and 60% of AD genetic variability.

Several biological mechanisms have been proposed to underlie this association. The E4 isoform would facilitate or not limit the amyloid substance deposition (11,12). This isoform may not protect against oxidative stress, in contrast to the E2 isoform (13). It has also been suggested that the E2 and E3 isoforms would prevent the aggregation of Tau protein by limiting abnormal phosphorylation leading to the constitution of paired helical filament, while the E4 isoform would not (14).

However, none of these hypotheses fully explained why as many as 50% of homozygous subjects who survive until 80 years, do not develop AD. This observation suggests that other factors should influence the *APOE* associated risk. Indeed, other genetic and environmental factors such as family history, gender, smoking, oestrogen, cholesterol level or other polymorphisms located in *APOE* receptor genes for instance (15–20), may modify the *APOE* associated risk. However, recent reports suggest that additional genetic factors within the *APOE* locus itself may also modulate this risk. Firstly, a genetic study of markers in the vicinity of the *APOE* locus demonstrated that a combination of three polymorphisms increases the estimation of the *APOE* associated risk of AD compared with *APOE* polymorphism alone (5). Secondly, a distortion of the allelic expression of the *APOE* gene is observed in the brain of affected patients; indeed, the relative expression of the ε4 allele is increased 1.5-fold in the ε3/ε4 bearer AD patients, compared with ε3/ε4 bearer controls (21).

Together, these data suggest the potential existence of one or more additional genetic susceptibility factors in the APOE sequence, modifying the risk associated with the *APOE* ε4 allele in the occurrence of AD. Detailed sequence analyses and a study of the *APOE* locus are needed to characterise such additional genetic factors. For instance, Mui *et al.* reported a polymorphism (1E1) in the first intron of the *APOE* gene in strong linkage disequilibrium with the *APOE* ε4 allele (22).

To go further in this hunt for other polymorphism(s), we sequenced the 375 bp upstream of the *APOE* TATA box and detected a new polymorphism whose impact on AD risk, together with the *APOE* ε4 allele was investigated in a large case-control study.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 20 87 77 10; Fax: +33 3 20 87 78 94; Email: philippe.amouyel@pasteur-lille.fr

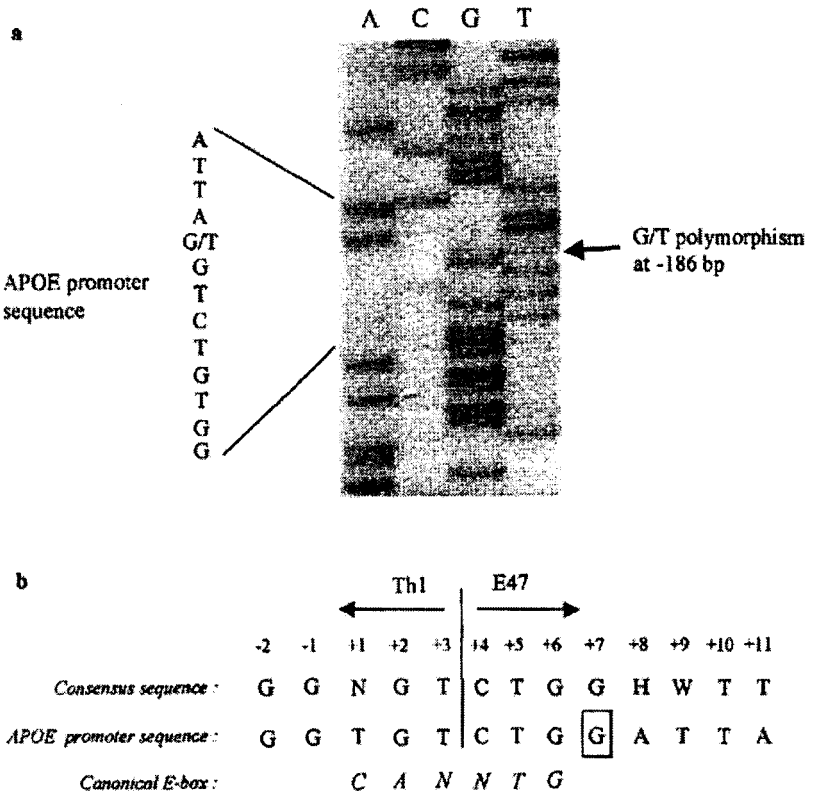


Figure 1. (a) Autoradiograph of a sequencing gel from part of the *APOE* promoter in an heterozygous Th1/E47cs individual showing the G→T base-pair change. (b) Comparison of the *APOE* promoter sequence including the Th1/E47cs polymorphism and the consensus sequence of the predicted binding site of the Th1/E47cs heterodimer (21). The predicted positions of Th1 and E47 binding site are indicated at the top and are based on the known half-site specificity of E47 and that predicted for Th1. The G→T mutation (boxed) is located in the half-site specificity of E47. Nucleotide positions are numbered relative to the canonical E-box sequence.

RESULTS

Sequencing the 375 bp upstream to the TATA box of *APOE*, we found a (G→T) polymorphism at position −186 of the TATA box, located in a potential consensus binding sequence of the Th1/E47 heterodimer transcriptional factor (Fig. 1) (23). Because of this location, we named it Th1/E47cs polymorphism (for Th1/E47 consensus sequence polymorphism).

We studied the association of the Th1/E47cs polymorphism with AD in a large case-control study (310 cases, age = 74.6 ± 9.3 years; 293 controls, age = 73.5 ± 10.9 years). We analysed the Th1/E47cs polymorphism together with the *APOE*, the 1E1 and the D19S178 repeat polymorphisms. The distributions of these polymorphisms are presented in Table 1. No deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium were observed for any of these polymorphisms. As expected, the ε4 allele was strongly associated with AD (OR = 4.67, 95% IC [3.28–6.67]), while the ε2 allele exhibited a protective effect (OR = 0.27, 95% CI [0.14–0.52]). In the control population, the Th1/E47cs G allele was the common one (0.531), in contrast to the AD population (0.468). The allelic and genotypic distributions were significantly different in the AD cases when compared with the control cases ($P = 0.03$ and $P = 0.007$, respectively). The Th1/E47cs T allele was associated with an increased risk of developing AD (OR = 1.29, CI 95% [1.02–1.63]) and the OR was 1.79 (CI 95% [1.21–2.65], $P = 0.002$) for individuals bearing at least one T allele. For the 1E1 polymorphism, the allelic and genotypic distributions, similar to the ones reported by Mui *et al.* (20), were significantly different between the AD and control populations ($P = 0.002$ and $P = 0.0005$, respectively). The 1E1 C allele was associated with a decreased risk of developing AD (OR = 0.56, CI 95% [0.40–0.78], $P = 0.0003$). No difference in the allelic or genotypic distributions of the D19S178 repeat alleles was observed ($P = 0.90$ and $P = 0.95$, respectively).

We calculated pairwise linkage disequilibriums between D19S178, Th1/E47cs, 1E1 and *APOE* polymorphisms (Table 2). As expected significant linkage disequilibriums existed between Th1/E47cs, 1E1 and *APOE* polymorphisms. D19S178 was independent of the other polymorphisms, although a weak linkage disequilibrium existed with *APOE* in the control population.

We estimated the haplotypes generated by these four polymorphisms using the myriad haplotype algorithm. Among the 16 theoretical haplotypes, 15 were observed (Table 3a). All haplotypes were observed in AD cases, while three (nos 2, 5 and 7) were not represented in controls. The difference in the distribution of the estimated haplotype frequencies between cases and controls was tested with a likelihood ratio test with 13 degrees of freedom ($\chi^2 = 696$). To take into account the strong association of the *APOE* ε4 allele with AD, we compared the estimated haplotype distributions in the ε3/ε3 and in the ε3/ε4 AD and control subgroups (Table 3b and c). In each subgroup (ε3/ε3 and ε3/ε4 genotype bearers, respectively), the estimated haplotype distributions were significantly different between AD and control subjects (likelihood test $\chi^2 = 374$, df = 8 and $\chi^2 = 160$, df = 6, respectively), suggesting potential independent effect of the other polymorphisms.

Table 1. Distribution and combination of the different polymorphism alleles in the controls and AD cases

		Allele frequency			Genotype frequency					
APOE[a]	*n*	**ε2**	**ε3**	**ε4**	**ε2/ε2**	**ε2/ε3**	**ε2/ε4**	**ε3/ε3**	**ε3/ε4**	**ε4/ε4**
Control cases	308	0.081	0.805	0.114	0.003	0.133	0.230	0.649	0.179	0.130
AD cases	292	0.034	0.639	0.327	–	0.034	0.034	0.425	0.393	0.113
Th1/E47cs	*n*	**G**[b]	**T**		**GG**[c]	**GT**	**TT**			
Control cases	310	0.531	0.469		0.320	0.422	0.258			
AD cases	279	0.468	0.532		0.208	0.520	0.272			
1E1	*n*	**G**[d]	**C**		**GG**[e]	**GC**	**CC**			
Control cases	307	0.615	0.385		0.388	0.456	0.156			
AD cases	293	0.711	0.289		0.533	0.382	0.085			
D19S178[f]	*n*	**L**	**S**		**LL**	**LS**	**SS**			
Control cases	272	0.498	0.502		0.246	0.504	0.250			
AD cases	276	0.507	0.493		0.257	0.500	0.243			
	n	**ε2/ε3**[g]	**ε3/ε3**		**ε3/ε4**	**ε4/ε4**	**ε2/ε4**			
APOE and 1E1 polymorphism combination										
AD cases										
CC	22	1	20	–	1	–				
GC	100	4	50	46	–	–				
GG	139	4	44	56	27	8				
Total	261	9	114	102	28	8				
Control cases										
CC	41	0	41	0	–	–				
GC	112	12	76	24	–	–				
GG	100	25	50	15	3	7				
Total	253	37	167	39	3	7				
APOE and Th1/E47cs polymorphism combination										
AD cases										
GG	55	4	36	13	1	1				
GT	134	5	54	60	8	7				
TT	78	–	24	29	19	–				
Total	261	9	114	102	28	8				
Control cases										
GG	85	25	52	5	–	3				
GT	108	11	76	16	1	4				
TT	60	1	39	18	2	–				
Total	253	36	167	39	3	7				

[a]$P < 0.001$; [b]$P = 0.03$, OR(T^+/T^-) = 1.29, CI 95% [1.02–1.63]; [c]$P = 0.007$; [d]$P = 0.002$, OR(G^+/G^-) = 1.44, CI 95% [1.14–1.84]; [e]$P = 0.0005$; [f]NS; [g]one individual was ε2/ε2 in control cases.

Table 2. Pairwise linkage disequilibrium in the 19q13.2 chromosomal region

	D19S178	Th1/E47cs	1E1	*APOE*
AD cases				
D19S178	–	–1.0	–0.6	0.6
Th1/E47cs	7	–	–8.4	–5.8
1E1	6	79	–	–6.1
APOE	6	49	54	–
Controls				
D19S178	–	0.5	0.1	1.2
Th1/E47cs	3	–	11.9	–1.9
1E1	1	86	–	–3.7
APOE		32	42	–

APOE polymorphism was analysed as a biallelic marker (i.e., allele 4 versus allele 2 or 3).
Above, the diagonal Δ standardised linkage disequilibrium coefficient.
Below, the diagonal D′ percentage of the linkage disequilibrium coefficient maximum possible value at the given allele frequencies.

Table 3. Polymorphism haplotype estimations along the 19q.13.2 chromosomal region

Haplotype	Polymorphisms				Estimated haplotype frequencies		
No.	D19S178	Th1/E47cs	1E1	*APOE*	AD cases	Controls	Expected controls
(a) General population							
1	S	T	G	ε4+	0.130	0.032	0.029
2	S	T	C	ε4+	0.004	0.000	0.019[a]
3	S	G	G	ε4+	0.031	0.006	0.035[a]
4	L	T	G	ε4+	0.100	0.043	0.027
5	L	T	C	ε4+	0.005	0.000	0.018[a]
6	L	G	G	ε4+	0.044	0.022	0.033
7	L	G	C	ε4+	0.003	0.000	0.021[a]
8	S	T	G	ε4−	0.018	0.009	0.114[a]
9	S	T	C	ε4−	0.127	0.183	0.072[a]
10	S	G	G	ε4−	0.184	0.267	0.142[a]
11	S	G	C	ε4−	0.000	0.011	0.087[a]
12	L	T	G	ε4−	0.020	0.014	0.113[a]
13	L	T	C	ε4−	0.128	0.170	0.070[a]
14	L	G	G	ε4−	0.195	0.224	0.136[a]
15	L	G	C	ε4−	0.011	0.019	0.084[a]
Number of chromosomes					522	506	
(b) Population genotyped ε3/ε3							
1	S	T	G		0.035	0.014	0.129[a]
2	S	T	C		0.192	0.239	0.116[a]
3	S	G	G		0.259	0.268	0.151[a]
4	S	G	C		0.009	0.013	0.136[a]
5	L	T	G		0.027	0.010	0.113[a]
6	L	T	C		0.193	0.198	0.103[a]
7	L	G	G		0.285	0.234	0.133[a]
8	L	G	C		0.000	0.024	0.119[a]
Number of chromosomes					228	334	
(c) Population genotyped ε3/ε4							
1	S	T	G		0.184	0.154	0.207
2	S	T	C		0.102	0.148	0.092
3	S	G	G		0.169	0.145	0.103
4	S	G	C		0.000	0.000	0.046
5	L	T	G		0.179	0.204	0.254
6	L	T	C		0.113	0.158	0.127
7	L	G	G		0.237	0.188	0.113
8	L	G	C		0.015	0.000	0.056
Number of chromosomes					204	78	

[a]$P < 0.01$.

In the whole population (AD = 261, Controls = 253), we estimated the OR for developing AD for subjects with at least one allele in the genotype for each polymorphism separately (Table 4). As expected a significant effect was observed for all of them except for D19S178. To determine if the effect of the Th1/E47cs and 1E1 polymorphisms were not due to the linkage disequilibrium existing with the APOE polymorphism, we performed a multivariate logistic regression taking into account age, gender, and the four polymorphisms in the same model. The effects of Th1/E47cs and 1E1 polymorphisms persisted and even increased, reinforcing the hypothesis of several genetic susceptibility factors within the *APOE* locus.

Table 4. Adjusted odds ratio estimated with multiple logistic regression

OR 95% CI	D19S178	Th1/E47cs	1E1	*APOE*
	SS + LS/LL	TT + GT/GG	CC + GC/GG	with ε4/without ε4
Non adjusted	0.94 [0.63–1.41]	1.79 [1.21–2.65]	0.56 [0.40–0.78]	4.32 [2.98–6.28]
	$P = 0.76$	$P = 0.002$	$P = 0.0003$	$P < 0.0001$
Adjusted for	0.82 [0.46–1.46]	1.90 [1.28–2.83]	0.58 [0.41–0.82]	4.66 [3.14–6.93]
age and gender	$P = 0.50$	$P = 0.002$	$P = 0.002$	$P < 0.0001$
Adjusted for gender, age	0.87 [0.38–2.00]	2.51 [1.38–4.56]	0.43 [0.25–0.74]	3.22 [2.06–5.02]
and other polymorphisms	$P = 0.75$	$P = 0.001$	$P = 0.002$	$P < 0.0001$

If we assume that the level of expression of the *APOE* alleles is increased due to *cis* mutations in the promoter region, this hypothesis has three major implications: (i) the promoter mutation may modulate the expression of the *APOE* alleles leading to an increased deleterious risk for ε4 and to an increased protective effect for ε2; (ii) given that what determines the risk is the importance of the relative level of expression of both alleles of the *APOE*, this promoter mutation will have a differential effect in *APOE* heterozygous and homozygous genotypes; (iii) the effect of the *cis* mutation in heterozygous individuals will depend on the phase of this polymorphism with the *APOE* ε alleles (i.e., the haplotype). In heterozygous Th1/E47cs and *APOE* ε4 genotype bearers, the ε4 allele may be combined either with the Th1/E47cs T or G allele. One of these combinations may increase the relative expression level of the ε4 allele and decrease the relative expression level of the ε3 allele, the other combination having the inverse influence. Thus, in the ε3/ε4 genotype bearers, the risk of developing AD will be different between the Th1/E47cs heterozygous and homozygous individuals. To test these assumptions, we studied the gender and age adjusted OR for developing AD for Th1/E47cs heterozygous genotype bearers compared with homozygous Th1/E47cs individuals. The Th1/E47cs heterozygous genotype was only associated with an increased risk of developing AD in the heterozygous *APOE* individuals (OR = 2.40, CI 95% [1.40–4.12], $P = 0.001$) and not in the homozygous *APOE* individuals (OR = 1.02, CI 95% [0.67–1.57], $P = 0.91$). In particular, in the ε3/ε4 sub-population (Table 5), the risk of developing AD for the heterozygous Th1/E47cs individuals was increased compared with the homozygous Th1/E47cs individuals (OR = 1.90, CI 95% [0.97–3.70], $P = 0.06$, AD = 107 and Controls = 54). This increased risk became significant in a larger ε3/ε4 population (OR = 2.07, 95% CI [1.21–3.54], $P = 0.008$, AD = 152 and Controls = 91). However the risk obtained for the heterozygous 1E1 individuals was not significant compared to the homozygous 1E1 individuals (OR = 0.62, 95% CI [0.36; 1.05], $P = 0.07$). To assess the contribution of each polymorphism on the risk of developing AD in the ε3/ε4 population, we performed a multiple logistic regression. We detected an increased risk tendency for developing AD only in the heterozygous Th1/E47cs (OR = 1.89 CI 95% [1.07–3.35], $P = 0.027$) but not in the heterozygous 1E1 bearers (OR = 0.75, 95% CI [0.43–1.33], $P = 0.33$). Altogether, these data suggest that the Th1/E47cs polymorphism could modify the relative level of expression of the APOE alleles.

Table 5. Distribution of the 1E1 and Th1/E47cs genotypes in the larger ε3/ε4 population

	1E1 polymorphism[a]			Th1/E47cs polymorphism[b]		
	n	GG	GC	GG	GT	TT
Control cases	91	50	41	16	38	37
AD cases	152	67	85	19	89	44

[a]$P = 0.10$; [b]$P = 0.04$.
No 1E1 CC genotype was found.

In order to approach the influence of the phase of the Th1/E47cs and *APOE* polymorphisms on the AD risk, we estimated the frequencies of the haplotypes with the Th1/E47cs T or G allele associated with the ε4 allele in the AD or controls ε3/ε4 bearer populations (as described in Materials and Methods). For the *APOE* ε3/ε4 and Th1/E47cs G/T bearers, 57.6% of the controls were estimated to have the ε4 and T alleles on the same chromosome, while this proportion was 69.7% in the case group, leading to an estimated OR of 1.7.

DISCUSSION

Recently, the hypothesis of other(s) mutation(s) nearby the *APOE* gene was fuelled by new physiological data: a difference in the allelic expression of the *APOE* gene was observed (19), suggesting that non-coding polymorphism(s) in the regulatory regions of the *APOE* gene could modify the risk of developing AD. Looking for such new polymorphisms, we found a (G→T) polymorphism located at position +7 of a degenerative E-box consensus (Fig. 1) (23), that influenced the effect of *APOE* polymorphisms on AD in the expected way.

The Th1/E47cs and 1E1 polymorphisms were associated with AD when studied separately. Although a strong linkage disequilibrium existed between the ε4, Th1/E47cs T and 1E1 G alleles, the effect of each of these polymorphisms persisted when introduced in the same logistic regression model. This observation suggested that the risk associated with the *APOE* ε alleles may be modulated according to their combination with other polymorphisms. To have at least one Th1/E47cs T or 1E1 C allele significantly modified the risk of developing AD in the whole population. Furthermore, the impact of the ε4 allele seemed decreased, suggesting that part of its effect may be attributed to the promoter polymorphisms. Another argument

was brought forward when estimating the risk associated with the phase. The estimated risk of developing the disease for the ε3/ε4 genotype bearers was not similar according to the combination of the Th1/E47cs and *APOE* ε alleles on the same chromosome. These results were in accordance with our previous data which suggest that the ε3/ε4 individuals will preferentially develop AD, because they expressed the ε4 allele at a greater level. Thus, a *cis* mutation in the *APOE* promoter, may favour the relative expression level of the ε4 allele, and potentially the deleterious action of the E4 isoform.

The Th1/E47cs polymorphism was characterised into a binding site of the basic helix–loop–helix transcription factor, E47. This factor E47 belongs to the class A proteins which are ubiquitously expressed and form combinatorial interactions with the class B proteins to control tissue-specific gene expression (24). In particular, E47 is expressed in brain, associated with multiple class B protein and is implicated in the development and maintenance of the mammalian nervous system (25–27). Little is known about the Th1 factor. It was identified in a screen of a mouse embryo cDNA library. Its homologous protein in *Drosophila* is a partner for the *Drosophila* class A protein daughterless, expression of which is essential for neurogenesis (28).

Nevertheless it is essential to determine, *in vitro* and *in vivo*, the functionality of this transcriptional factor sequence binding. Furthermore, the effect of this new polymorphism susceptible to modulate the risk associated to the APOE alleles must be confirmed by other epidemiological studies and a more profound analysis will have to be performed to determine the haplotypes. In conclusion, The Th1/E47cs polymorphism, located within a putative regulatory element of the APOE promoter could contribute to the APOE expression level but other polymorphisms in the regulatory sequences of this gene may exist and a more extended screening of these regulatory regions needs to be developed. The regulation of the *APOE* gene could be very important for deciphering the mechanisms of the involvement of the *APOE* alleles, in particular to better define subjects at higher risk of developing AD.

POPULATION AND METHODS

Populations

The AD and control samples were Caucasian originating from France. Sixteen cases were from other European countries. These different ethnic origins did not influence genotype distributions. Diagnoses of probable AD were established according to the DSM-III-R and NINCS-ADRDA criteria (n = 293; age = 74.6 ± 9.3, range 51–98; age of onset = 71.02 ± 8.9, range 49–94; 32.2% of men) (29,30). The Caucasian controls were defined as subjects without DMS-III-R dementia criteria and with integrity of their cognitive functions (n = 310; age = 73.5 ± 10.9, range 59–105; 37.4% of men). Each individual or their relatives signed an informed consent. The number of subjects tested for the different polymorphisms varied as followed: Th1/E47cs study, 279 AD cases and 310 controls; 1E1 study, 293 AD cases and 307 controls; D19S178 study, 272 AD cases and 279 controls.

In order to increase the statistical power of the study for further analysis in heterozygous individuals, we increased the number of individuals with the ε3/ε4 genotype adding new ε3/ε4 subjects from independent populations, up to a total of 152 AD and 91 control cases (73.3 ± 8.5 and 70.3 ± 8.5 years, respectively).

Sequencing

Direct sequencing was performed with the 70770 sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (Amersham Life Science) using [γ-^{35}S]dATP. *APOE* PCR products were obtained as described in ASO technique (see below). Reactions were run on a 6% acrylamide/8 M urea gel for 1–2 h under 60 W. The gels were then exposed to X-ray film.

Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from white blood cells. We analysed the Th1/E47cs polymorphism distribution together with two other polymorphisms located in the 19q13.2 chromosomal region flanking the Th1/E47cs polymorphism: the 1E1 polymorphism located 1.15 kb downstream of the Th1/E47cs polymorphism and the anonymous $(CA)_n$ repeat DNA marker, D19S178 located ~2.4 cM upstream of the *APOE* gene. The frequency of the D19S178 repeat alleles were dichotomised in long (167 and over) and short alleles (5).

The four markers were amplified by polymerase chain reaction in a Perkin-Elmer Cetus thermal cycler. The anonymous $(CA)_n$ repeat DNA marker, D19S178, the 1E1 polymorphism and the *APOE* polymorphism were tested as previously described (8,22,31). Because the Th1/E47cs polymorphism did not create or destroy any restriction enzyme sites, two techniques were used to confirm the results. The first one consisted of designing a mismatch primer which contained one mismatched base pair, four bases away from the 3′ end of the forward primer and five bases from the polymorphism. When incorporated into a PCR product, this primer produced a *Bstn* I cut site when a G was present and no cut site when a T was present at the polymorphic site. Briefly, the PCR step was performed during 40 cycles (1 min at 94°C, 1 min 15 s at 54°C and 1 min at 72°C each cycle) with the forward primer 5′-AGAATGGAGGAGGGTGCCTG-3′ and the reverse primer 5′-ACTCAAGGATCCCAGACTTG-3′ in a total volume of 50 µl containing 1.25 U Taq DNA polymerase, 0.2 mM of each dNTP, 1% of DMSO, 0.5 mM of $MgCl_2$. Twenty five µl PCR of product was digested with 1 U *Bstn* I at 60°C overnight. Digestion products were visualised with a 12% polyacrylamide gel. The Th1/E47cs T allele was characterised by a 49 bp fragment and the G allele by a 31 bp fragment. The second technique consisted of performing an allele-specific oligonucleotide (ASO) hybridisation. A 375 bp fragment containing the Th1/E47cs polymorphism was amplified using as forward primer: 5′-TACTTTCTTTCTGGGATCCAGG-3′ and reverse primer: 5′-ACTCAAGGATCCCAGACTTG-3′. PCR was performed in a total volume of 50 µl during 35 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 50°C and 1 min at 72°C each cycle) containing 1.25 U Taq polymerase, 0.2 mM of each dNTP, 1 mM of $MgCl_2$. The two primers: 5′-GCCCAGTAATCCAGACACCC-3′ and 5′-GCCCAGTAATACAGACACCC-3′ (for the G and T allele detection, respectively), were 5′ end labelled with DIG (Boerhinger Mannheim). Allele-specific hybridisation was obtained after washing for 3 min in a 0.1% SDS and 0.5× SSC solution at 61°C and 62°C for the G and T allele hybridisation, respectively.

Detection was realised as described by the supplier (Boerhinger Mannheim).

Statistical analysis

The SAS software release 6.10 was used (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Univariate analysis was performed using Pearson's χ^2 test and Fisher exact test when necessary. Since the impact of the ε4 allele is the more pronounced in a range from 60 to 75 years (32,33) and since no significant difference was observed in the distribution of the different markers according to the age (a cut-off of 65 years was tested), we analysed the different polymorphisms without performing distinction between early and late onset. Deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium hypothesis were tested.

Pairwise linkage disequilibriums were measured on collapsed data after estimation of two marker haplotype frequencies by the maximum likelihood procedure for D19S178, Th1/E47cs, 1E1 and *APOE* (coded as biallelic marker, i.e. allele ε4 versus allele ε2 or ε3) (34). The standardised disequilibrium (δ) and the percent of the maximum possible value of disequilibrium were computed as outlined by Thompson *et al.* (35). Statistical significance for linkage disequilibrium was considered only at $P < 0.001$ level since multiple non-independent pairwise comparisons were performed. Extended haplotype frequencies of the four markers were estimated on collapsed data using the myriad haplotype algorithm described by McLean and Morton (36), implemented in a computer program by Cox *et al.* (37). The comparisons between haplotype frequencies in cases and controls were tested with a likelihood ratio test. The estimated frequencies were compared with those expected on the basis of equilibrium by Pearson's χ^2 or Fisher exact test as necessary (38). In the multivariate analysis, we coded the genotypes of each subject as dummy variables according to the tested hypotheses (at least one D19S178 short allele: SS+SL versus LL, at least one Th1/E47cs T allele: TT+TG versus GG, at least one 1E1 C allele: CC+GC versus GG and at least one ε4 allele). The effects of these variables on the disease were tested in a multiple logistic regression model adjusted for age and gender.

Estimation of the risk of developing AD according to the combination of the Th1/E47cs T and ε4 alleles in the ε3/ε4 subgroup

According to the three polymorphisms presented in Table 3c, we defined in the ε3/ε4 sub-populations:

$$f_i = x_i + y_i \qquad 1$$

where f_i is the frequency of the haplotype i (i = 1–8; as defined in Table 3c), x_i is the frequency of the ε3 allele found in the haplotype i and y_i, the frequency of the ε4 allele found in the haplotype i.

Because our estimation is performed in the ε3/ε4 sub-population with equal total proportion of ε3 and ε4 alleles, we have:

$$\sum x_i = 0.5 \text{ and } \sum y_i = 0.5 \qquad 2$$

Given that the 1E1 C allele is in strong linkage disequilibrium with the *APOE* ε polymorphism (Tables 2 and 3) and is only associated with the ε3 allele, $y_2 = y_4 = y_6 = y_8 = 0$. Thus, the x_2, x_4, x_6 and x_8 values are directly obtained from Table 3c with $f_i = x_i$. From equation **2**, we obtain:

$$x_1 + x_3 + sx_5 + x_7 = 0.5-(x_2 + x_4 + x_6 + x_8 \qquad 3$$
$$\text{and } y_1 + y_3 + y_5 + y_7 = 0.5$$

x_i can be directly approached with the haplotype distribution estimated in the ε3/ε3 subgroup.

If x_i' is the frequency of the haplotype i in the ε3/ε3 AD or control subgroup, the x_i value is estimated as follows:

$$x_i = \frac{x_1 + x_3 + x_5 + x_7}{x_1' + x_3' + x_5' + x_7'} x_i' \qquad 4$$

and from equation **4**:

$$x_i = \frac{0.5-(x_2 + x_4 + x_6 + x_8)}{x_1' + x_3' + x_5' + x_7'} x_1' \qquad 5$$

The y_i value can be deduced from equation **1**. Thus, we estimated frequency of the four possible phases of the Th1/E47cs G/T and *APOE* ε3/ε4 heterozygous AD and control sub-populations as follows:

ε4 and Th1/E47cs T allele: $x_1 + x_3$
ε4 and Th1/E47cs G allele: $x_2 + x_4$
ε3 and Th1/E47cs T allele: $y_1 + y_2 + y_5 + y_6$
ε3 and Th1/E47cs G allele: $y_3 + y_4 + y_7 + y_8$

ACKNOWLEDGEMENTS

J.C.L. was a recipient of the Ministère d l'Enseignement supérieur et de la Recherche. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut Pasteur de Lille (IPL) and the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais 'axe régional de recherche sur les maladies neurodégénératives et le vieillissement cérébral' (to P.A., M.C.C.H. and F.P.).

REFERENCES

1. Schellenberg,G., Deeb,S.S., Boehnke,M., Bryant,E.M., Martin,G.M., Lampe,T.H. and Bird,T.H. (1987) Association of an Apolipoprotein CII allele with familial dementia of the Alzheimer type. *J. Neurogenet.*, **4**, 97–108.
2. Pericak-Vance,M.A., Bedout,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 disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, **55**, 991–1000.
3. Schellenberg,G., Boehnke,M., Wijsman,E.M., Moore,D.K., Martin,G.M. and Bird,T.D. (1992), Genetic association and linkage analysis of the apolipoprotein E-CII locus and Familial Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, **31**, 223–227.
4. Strittmatter,W.J, Saunders,A.M, Schmechel,D., Pericak-Vance,M., Englhild,J., Salvesen,O.S. and Roses,A.D. (1993) 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**, 1977–1981.
5. Chartier-Harlin,M.-C., Parfitt,M., Legrain,S., Pérez-Tur,J., Brousseau,T., Evans,A., Berr,C., Vidal,O., Roques,P., Gourlet,V., Fruchart,J.C., Delacourte,A., Rossor,M. and Amouyel,P. (1994) Apolipoprotein E ε4 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.
6. Van Duijn,C.M., De Kniff,P., Wehnert,A., De Voecht,J., Bronzova,J.B., Havekes,L.M., Hofman,A. and Van Broeckhoven,C. (1995) Reduced survival of patients with early-onset alzheimer's disease that carry the Apolipoprotein E2 allele. *Ann. Neurol.*, **37**, 605–610.
7. Pérez-Tur,J., Campion,D., Martinez,M., Brice,A., Tardieu,S., Hannequin,D., Agid,Y., Delacourte,A., Clerget-Darpoux,F., Chartier-Harlin,M.-C. and the French Alzheimer's disease collaborative group (1995) Evidence for apolipoprotein E ε4 association in early-onset alzheimer's patients with late-onset relatives. *Am. J. Med. Genet.*, **60**, 550–553.

8. 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 Alzheimer's disease in late-onset families. *Science*, **261**, 921–923.
9. Corder,E.H., Saunders,A.M., Risch,N.J., Strittmatter,W.J., Schmechel,D.E., Gaskell,P.C., Rimmler,J.B., Locke,P.A., Conneally,P.M., Schmader,K.E., Small,G.W., Roses,A.D., Haines,J.L. and Pericak-Vance,M.A. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 for late-onset alzheimer's disease. *Nature Genet.*, **7**, 180–184.
10. Talbot,C., Lendon,C., Craddock,N., Morris,J.C. and Goate,A. (1994) Protection against Alzheimer's disease with *APOE* ε2. *Lancet*, **343**, 1432–1433.
11. Strittmatter,W.J, Weisgraber,K.H., Huang,D.Y., Dong,L.-M., Salvesen,G.S., Pericak-Vance,M., Schmechel,D., Saunders,A.M., Goldgaber,D. and Roses,A.D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8098–8102.
12. Evans,K., Berger,E.P., Cho,C.G., Weisgraber,K.H. and Lansburry,P.T. (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implication for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 763–767.
13. Miyata,M. and Smith,J.D. (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β-amyloid peptides. *Nature Genet.*, **14**, 55–60.
14. Strittmatter,W.J., Weisgraber,K.H., Goedert,M., Saunders,A.M., Huang,D., Corder,E.H., Dong,L.-M., Jakes,R., Alberts,M.J., Gilbert,J.R., Han,S.H., Hulette,C., Einstein,G., Schmechel,D.E., Pericak-Vance,M.A. and Roses,A.D. (1994) Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in Alzheimer disease are related to Apolipoprotein E genotype. *Exp. Neurology*, **125**, 163–171.
15. Van Duijn,C.M., De Knijff,P., Cruts,M., Wehnert,A., Havekes,L.M, Hofman,A. and Van Broeckhoven,C. (1994) Apolipoprotein E4 allele in a population based study of early-onset alzheimer's disease. *Nature Genet.*, **7**, 74–78.
16. Payami,H., Montee,K.R., Kaye,J.A., Bird,T.D., Yu,C.E., Wijsman,E.M. and Schellenberg,G.D. (1994) Alzheimer's disease, apolipoprotein E4, and gender. *J. Am. Med. Assoc.*, **271**, 1316–1317.
17. Van Duijn,C.M, Havekes,L.M., Van Broeckhoven,C., De Knijff,P. and Hofman,A. (1995) Apolipoprotein E genotype and association between smoking and early-onset alzheimer's disease. *Br. Med. J.*, **310**, 627–631.
18. Jarvik,G.P., Wijsman,E.M., Kukull,W.A, Schellenberg,G.D., Yu,C. and Larson,E.B. (1995) Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology*, **45**, 1092–1096.
19. Wavrant-De Vrièze,F., Pérez-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-related receptor protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **227**, 68–70.
20. Helbecque,N., Richard,F., Cottel,D., Neuman,E., Guez,D. and Amouyel,P. (1998) The very low density lipoprotein (VLDL) receptor is a genetic susceptibility factor for Alzheimer's disease in a European Caucasian population, Alzheimer's disease and related disorders, in press.
21. Lambert,J-.C., Pérez-Tur,J., Dupire,M.J., Galasko,D., Mann,D., Amouyel,P., Hardy,J., Delacourte,A. and Chartier-Harlin,M.-C. (1997) Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2151–2154.
22. Mui,S., Briggs,M., Chung,H., Wallace,R.B., Gomez-Isla,T., Rebeck,G.W. and Hyman,B.T. (1996) A newly identified polymorphism in the apolipoprotein E enhancer gene region is associated with AD and strongly with the ε4 allele. *Neurology*, **47**, 196–201.
23. Hollenberg,S.M., Sternglanz,R., Cheng,P.F. and Weintraub,H. (1995) Identification of a new family of tissue-specific basic helix–loop–helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3813–3822.
24. Murre,C., McCaw,P.S. and Baltimore,D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, **77**, 451–459.
25. Shimizu,C., Akasawa,C., Nakanishi,S. and Kageyama,R. (1995) MATH-2, a mammalian helix–loop–helix factor structurally related to the product of drosophilia proneuronal gene atonal, is specifically expressed in the nervous system. *Eur. J. Biochem.*, **229**, 239–248.
26. Akasawa,C., Izshibashi,M., Shimizu,C., Nakanishi,S. and Kageyama,R (1995) A mammalian helix–loop–helix factor structurally related to the product of drosophilia proneuronal gene atonal is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8730–8738.
27. Peyton,M., Stellrecht,C.M., Naya,F.J., Huang,H.P., Samora,P.J. and Tsai,M.J. (1996) BETA3, a novel helix–loop–helix protein, can act as a negative regulator of BETA2 and MyoD-responsive genes. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 626–633.
28. Caudy,M., Vässin,H., Brand,M., Tuma,R., Jan,L.Y. and Jan,Y.N. (1988) Daughterless, a drosophilia gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to myc and the achaete-scute complex. *Cell*, **55**, 1061–1067.
29. American Psychiatric Association (1987) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Third edition revised (DMS-III-R) American Psychatric Association (ed.) Washington DC.
30. McKahn,G., Drachman,D., Folstein,M., Karzman,R., Price,D. and Stadlan,E. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRA work group. *Neurology*, **34**, 939–944.
31. Hixon,J.E. and Vernier,D.T. (1991) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid Res.*, **31**, 545–548.
32. Bickböller,H., Campion,D., Brice,A., Amouyel,P., Hannequin,D., Didierjean,O., Penet,C., Martin,C., Pérez-Tur,J., Michon,A., Dubois,B., Ledoez,F., Thomas-Anterion,C., Pasquier,F., Puel,M., Demonet,J.F., Moreaud,O., Babron,M.C., Meulien,D., Guez,D., Chartier-Harlin,M.-C., Frebourg,T., Agid,Y., Martinez,M. and Clerget-Darpoux,F. (1997) Apolipoprotrein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 439–446.
33. The *APOE* and Alzheimer disease meta analysis consortium (1997) Effects of age, gender and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.*, **278**, 1349–1356.
34. Hill,W.G. (1975) Tests for association of gene frequencies at several loci in random mating diploid populations. *Biometrics*, **31**, 881–888.
35. Thompson,E.A., Deeb,S., Walker,D. and Motuslsky,A.G. (1988) The detection of linkage disequilibrium between closely markers: RFLPs at the AI-CIII apolipoprotein genes. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 113–124.
36. Mc Lean,C.J. and Morton,N.E. (1985) Efficiency of lod scores for representing multiple locus linkage data. *Genet. Epidemiol.*, **2**, 263–272.
37. Cox,N.J., Bell,G.I. and Xiang,K.S. (1988) Linkage disequilibrium in the human insulin/insulin-like growth factor II region of human chromosome II. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 495–501.
38. Benlian,P., Boileau,C., Loux,N., Pastier,D., Masliah,J., Coulon,M., Nigou,M., Ragab,A., Guimard,J., Ruidavets,J.B., Bonaïté-Pellié,C., Fruchart,J.C., Douste-Blazy,P., Bereziat,G. and Junien,C. (1991) Extended haplotypes and linkage disequilibrium between II markers at the APOAI-C3-C4-A4 gene cluster on chromosome II. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**, 903–910.

© 1998 Oxford University Press

Human Molecular Genetics, 1998, Vol. 7, No. 9 1511–1516

Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with –491 AT mutation on neural *APOE* gene expression and risk of developing Alzheimer's disease

Jean-Charles Lambert, Claudine Berr[1], Florence Pasquier[2], André Delacourte[3], Bernard Frigard[4], Dominique Cottel, Jordi Pérez-Tur[5], Vincent Mouroux, Michel Mohr[6], Danielle Cécyre[7], Douglas Galasko[8], Corinne Lendon[9], Judes Poirier[7], John Hardy[5], David Mann[10], Philippe Amouyel and Marie-Christine Chartier-Harlin*

INSERM CJF95-05, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cédex, France, [1]INSERM U360, Hôpital de la Salpétrière, 75651 Paris Cédex 13, France, [2]CHR et U de Lille, Clinique Neurologique, Centre de la Mémoire, Hôpital Salengro, 59037 Lille Cédex, France, [3]INSERM U422, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France, [4]Centre de Gériatrie de Wasquehal, rue Salvador Allende, BP 165, 59444 Wasquehal, France, [5]Birdsall Building, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL 32224, USA, [6]Institut de Pathologie, 1 place de l'Hôpital, BP 22, 67064 Strasbourg Cédex, France, [7]McGill Centre for Studies in Aging, 6875 La Salle Boulevard, Verdun, Québec, Canada H4H 1R3, [8]Department of Neurosciences, University of California, San Diego, 3350 La Jolla Village Drive, San Diego, CA 9216, USA, [9]Departments of Psychiatry, Neurology and Genetics, Washington University School of Medicine, St Louis, MO 63310, USA and [10]Department of Pathological Sciences, Stopford Building, University of Manchester, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK

Received June 1, 1998 Revised and Accepted July 8, 1998

Possession of the apolipoprotein E (*APOE*) ε4 allele is the most frequently associated genetic susceptibility factor for Alzheimer's disease (AD). Recently, new polymorphisms in the regulatory region of the *APOE* gene have been described. We analysed the effects of three of these mutations (–491 AT, –427 CT and Th1/E47cs) on disease risk in a large case–control study, and tested their impacts on *APOE* allelic expression in brain tissues. The Th1/E47cs T allele was associated with an increased risk of occurrence of AD, while the –491 T allele was associated with a decreased risk, independently of the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism effect. However, the impact of the Th1/E47cs mutation was the strongest. The –427 CT polymorphism was not associated with the disease. In AD subjects heterozygous for the ε4 allele, analysis of allelic expression showed that the relative expression levels of the ε4 allele were higher than those of the corresponding controls. Consistent with epidemiological data, the relative level of expression of the ε4 allele was modified accordingly to the presence or absence of the two main promoter polymorphisms, indicating, *in vivo*, the deleterious effect of the Th1/E47cs T allele and the protective effect of the –491 T allele in population. These data indicate that in addition to the qualitative effect of the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphisms on the AD occurrence, the quantitative variation of expression of these alleles due to functional *APOE* promoter mutations, is a key determinant of AD development.

INTRODUCTION

The presence of at least one apolipoprotein E (*APOE*) ε4 allele is a major genetic susceptibility factor for late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease (AD). This risk factor accounts for ~45–60% of cases (1). Indeed, the ε4 allele is associated with an increased risk of AD in an allele dose dependant manner (2,3). Conversely, the ε2 allele protects against the disease (4,5). The mechanisms by which apoE isoforms are implicated in human nervous system physiology and influence the pathogenesis of AD, are not fully understood (2,6–8). The effect of the *APOE* ε2/ε3/ε4 alleles may not be due only to the intrinsic biochemical properties of the isoforms coded by these alleles. Other genetic variants influencing *APOE* allele expression may account for the increase or decrease in the level of risk of AD. This hypothesis is supported firstly by preliminary observations of the relative overexpression of the ε4 allele compared with the ε3 allele in the brain of patients with AD, compared with controls (9). Secondly, Th1/E47cs and –491 AT polymorphisms located in the *APOE* promoter have been described and associated with AD risk

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 20 87 72 28; Fax: + 33 3 20 87 78 94; Email: marie-christine.chartier@pasteur-lille.fr

(10,11). Moreover the effect of these two polymorphisms on AD occurrence was described separately in case–control studies. This prompted us to analyse the relative contribution of these two promoter polymorphisms, and also a third, located at position –427 of the *APOE* promoter together with the ε2/ε3/ε4 alleles, towards AD risk in a large case–control study (509 controls and 573 AD cases). Furthermore, we investigated the possible influences of the two main polymorphisms on *APOE* ε2/ε3/ε4 allelic relative expression in brain tissues, to approach their *in vivo* functionality, in brain samples from 49 AD cases and 45 controls.

RESULTS

As expected, possession of the ε4 allele was strongly associated with AD [odds ratio (OR) = 5.40; 95% confidence interval (CI): 4.11–7.09, $P < 0.0001$], while the presence of the ε2 allele exhibited a protective effect (OR = 0.47; 95% CI: 0.31–0.70, $P = 0.0003$). The frequency of the Th1/E47cs T allele was increased in AD cases compared with controls ($\chi^2 = 23.1$, $P < 0.0001$; Table 1). The risk of developing AD for carriers of at least one T allele was 2.13 (95% CI: 1.61–2.83). Conversely, the frequency of the –491 T allele was decreased in patients, compared with controls ($\chi^2 = 9.5$, $P = 0.002$). The genotype and allele frequencies of the –491 AT polymorphism were both similar to those observed in the North American population but differed from the Spanish sample (11). The OR to develop AD in subjects bearing at least one –491 T allele was 0.67 (95% CI: 0.52–0.88, $P = 0.004$). No association with the disease was detected for the –427 CT polymorphism. To eliminate possible confounding effects of the *APOE* ε4 allele on the association of the Th1/E47cs and –491 AT polymorphisms with AD, we controlled the effects of each allele using logistic regression adjusted for the presence or absence of the ε4 allele. After adjustment, the risk associated with possession of at least one Th1/E47cs T allele persisted (OR = 1.56; 95% CI: 1.15–2.11, $P = 0.004$), while the risk associated with –491 T allele did not (OR = 0.82; 95% CI: 0.62–1.10, $P = 0.19$). This observation suggested that the effect of the Th1/E47cs T allele is independent of that of the ε4 allele, while the –491 T allele is not. However, since the Th1/E47cs G and ε2 alleles are in complete disequilibrium (Table 2), we also performed a logistic regression including both protective and deleterious effects of ε2 and ε4 alleles, respectively. The risk associated with the Th1/E47cs T allele still persisted (OR = 1.41; 95% CI: 1.03–1.92, $P = 0.03$).

If we assume that the level of expression of the *APOE* alleles is increased or decreased due to *cis* mutations in the promoter region, this hypothesis has two major implications: (i) promoter mutations may modulate the expression of the *APOE* alleles leading to an increase or decrease of the deleterious or protective risk associated with the ε4 or ε2 allele, respectively; and (ii) given that what determines the risk is the importance of the relative level of expression of both alleles of *APOE*, as suggested by preliminary data (12), the promoter mutations will have differential effects detectable mainly in *APOE* ε2/ε3/ε4 heterozygous individuals. To verify these assumptions, we studied the OR of developing AD for *APOE* heterozygous and homozygous individuals, using logistic regression adjusted for age, sex and the presence of at least one –491 T and one Th1/E47 T allele. In *APOE* ε2/ε3/ε4 homozygotes, no effect was found (OR = 1.13; 95% CI: 0.77–1.65, and OR = 0.99; 95% CI: 0.68–1.44, for Th1/E47 T and –491 T alleles, respectively). Conversely, in *APOE* ε2/ε3/ε4 heterozygotes, individuals bearing at least one Th1/E47 T allele had an increased risk of developing AD (OR = 3.57; 95% CI: 2.22–5.75, $P < 0.0001$), while individuals bearing at least one –491 T allele exhibited a protective effect (OR = 0.57; 95% CI: 0.37–0.90, $P = 0.014$), consistent with our initial hypothesis.

Table 1. *APOE*, Th1/E47cs and –491 AT allele and genotype distributions

	Allele	Genotype							
APOE	ε2	ε3	ε4	ε2ε2[a]	ε2ε3	ε2ε4	ε3ε3	ε3ε4	ε4ε4
Controls	75 (0.07)	832 (0.82)	111 (0.11)	4 (0.01)	57 (0.11)	10 (0.02)	344 (0.68)	88 (0.17)	6 (0.01)
AD	40 (0.03)	699 (0.61)	407 (0.36)	-	16 (0.03)	24 (0.04)	223 (0.39)	237 (0.41)	73 (0.13)
Th1/E47cs	G	T	GG[a]	GT	TT				
Controls	562 (0.55)	456 (0.45)	162 (0.32)	238 (0.47)	109 (0.21)				
AD	515 (0.45)	631 (0.55)	103 (0.18)	308 (0.54)	162 (0.28)				
-427 TC[b]	T	C	TT	TC	CC				
Controls	874 (0.91)	88 (0.09)	396 (0.82)	82 (0.17)	3 (0.01)				
AD	1000 (0.92)	86 (0.08)	458 (0.84)	84 (0.16)	1 (0.00)				
-491 AT	A	T	AA[c]	AT	TT				
Controls	833 (0.82)	185 (0.18)	343 (0.67)	147 (0.29)	19 (0.04)				
AD	993 (0.87)	153 (0.13)	432 (0.75)	129 (0.23)	12 (0.02)				

Allele and genotype numbers (frequencies) are presented.
The genotypic distributions in control population were in Hardy–Weinberg equilibrium.
[a]$P < 10^{-4}$.
[b]Not significant.
[c]$P = 0.005$.

Table 2. Combination of the –491 AT, Th1/E47cs and *APOE* polymorphism alleles in the controls and AD cases

APOE and Th1/E47cs polymorphism combination						
	n	ε2/ε3[a]	ε3/ε3	ε3/ε4	ε4/ε4	ε2/ε4
AD cases						
GG	103	5	60	30	3	5
GT	306	11	113	136	27	19
TT	139	–	49	70	43	–
n	571	16	222	236	73	24
Control cases						
GG	162	41	100	16	–	5
GT	238	20	170	40	2	5
TT	109	–	73	32	4	–
n	509	61	343	88	6	10
APOE and –491 AT polymorphism combination						
	n	ε2/ε3[a]	ε3/ε3	ε3/ε4	ε4/ε4	ε2/ε4
AD cases						
AA	431	6	157	190	67	11
AT	128	8	58	44	6	12
TT	12	2	7	2	–	1
n	261	16	222	102	28	24
Control cases						
AA	342	24	242	65	5	6
AT	147	34	89	19	1	4
TT	20	3	12	4	–	–
n	509	61	343	88	6	10
Th1/E47cs and –491 AT polymorphism combination						
	n	AA	AΣ	ΣΣ		
AD cases						
GG	103	79	22	2		
GT	307	226	75	6		
TT	162	127	31	4		
n	572	432	128	12		
Control cases						
GG	162	111	48	3		
GT	238	162	67	9		
TT	109	69	32	8		
n	509	342	147	20		

[a]Three individuals were ε2/ε2 in control.

The –491 A and ε4 alleles present a degree of linkage disequilibrium of 26 and 75% in control and AD populations, respectively. The Th1/E47cs G and ε2 alleles are in complete linkage disequilibrium in both populations, while the Th1/E47cs T and ε4 alleles show a linkage disequilibrium of 44% in both populations. No linkage disequilibrium was found between –491 AT and Th1/E47cs polymorphisms.

The location of both polymorphisms within the regulatory region of the *APOE* gene, and their potential effect *in vitro* reported in hepatoma cells, suggested that these polymorphisms may play a role in the control of *APOE* expression levels in brain. In order to test this hypothesis, we obtained 94 AD or control brain tissues heterozygous for the *APOE* and measured the percentage of the expression level of the three *APOE* alleles. In controls, the ε4 allele was strongly underexpressed compared with the ε3 or the ε2 allele in the ε3ε4 and ε2ε4 brain samples, respectively, while the ε2 and ε3 expressions were almost similar in the ε2ε3 samples (Fig. 1). As suggested by preliminary data (9), there was a clear and consistent increase in the relative ε4 allelic expression between ε3ε4 patients and ε3ε4 controls (34.9 ± 2.7 versus 22.9 ± 2.4%, respectively, $P < 10^{-4}$). A significant decrease in the relative ε2 expression was demonstrated in ε2ε3 AD brains compared with ε2ε3 controls (32.8 ± 4.5 versus 47.8 ± 3.9%, respectively, $P = 0.002$). An increased expression of the ε4 allele was also detected between the ε2ε4 AD and controls (46.0 ± 5.4 versus 28.0 ± 2.8%, respectively, $P = 0.01$). Measured values in ε2ε4 AD cases and controls corresponded to the expected values estimated from the other genotypes reinforcing our observations (see Materials and Methods; arrows in Fig. 1).

The previous epidemiological data suggest that the –491 AT polymorphism and the Th1/E47cs polymorphism may be good candidates to mediate these allelic distortions. In particular, estimation of the OR associated with the combination of the ε4 and the Th1/E47cs T allele on the same chromosome indicate an estimated increased risk of 1.7 for the heterozygous ε3/ε4 individuals presenting this haplotype, as described previously (10). Thus, if the ε4 allele is associated with the Th1/E47cs T allele on the same chromosome, while the ε3 allele is associated with the Th1/E47cs G allele on the other, the relative ε4/ε3

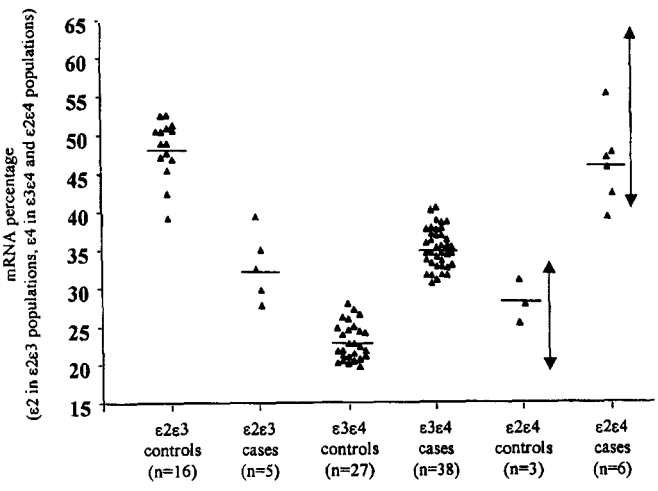


Figure 1. Differential expression of the *APOE* mRNA for the three heterozygous genotypes in AD and control cases. The average level of expression is indicated by a bold line in each category. For each brain sample, RT–PCR and semi-quantitation was repeated at least twice. Bold arrows indicate the expected values of the ε4 allele percentage in the ε2ε4 samples, calculated from the ε2 and ε4 percentage in the ε2ε3 and ε3ε4 AD and control cases, respectively.

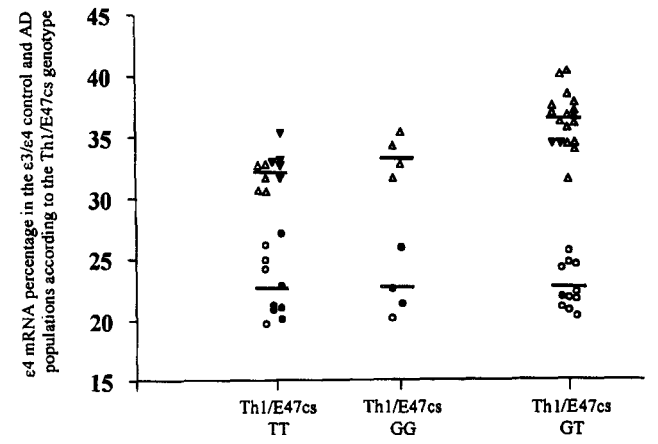


Figure 2. Differential expression of the ε4 allele in the ε3ε4 AD and control cases, according to the Th1/E47cs genotype. AD cases are denoted by triangles and controls by circles. Closed symbols and open symbols correspond to the –491 AT and AA genotypes, respectively.

mRNA ratio should be significantly increased and associated with AD. Conversely, if both ε4 and ε3 alleles are under the control of the same Th1/E47cs allele, either G or T, the level of expression should be similar. Thus, we expected a stronger distortion in Th1/E47cs heterozygotes than in homozygotes. This argument is clearly illustrated by our experimental data (Table 3). The same approach is valid for the –491 AT mutation.

The influence of both polymorphisms on relative mRNA expression level could be observed only in cases (Fig. 2 and Table 3). Affected patients carrying the Th1/E47cs GT or the –491 AT genotypes had the highest and lowest relative levels of expression of ε4 expression, respectively (Fig. 1 and Table 3). The difference in the levels of expression in cases was more pronounced for the Th1/E47cs GT bearers than for the –491 AT bearers (36.6 ± 2.2 versus 33.5 ± 1.3%, respectively, $P = 0.004$; Fig. 2).

DISCUSSION

The deleterious effect of the Th1/E47cs T allele and the protective effect of the –491 T allele described recently (10,11) were confirmed by this large case–control study. These effects were obvious in the *APOE* heterozygous population, but not in the homozygous population. These data are not surprising for two reasons: (i) we would expect that *APOE* ε4 homozygotes with high expressing promoter alleles on both chromosomes, had a higher risk of developing AD than ε4 homozygotes with low expressing promoter alleles. However, the small size of the ε4/ε4 control population did not allow such an impact to be brought forward; (ii) as a consequence, the measured OR in ε2/ε3/ε4 homozygous individuals mainly depended on the ε3/ε3 population. No effect was found in the latter population whatever the studied promoter polymorphism. Furthermore, the apoE3 isoform is considered as the isoform having the lesser effect on AD pathology.

Table 3. Relative ε4 allele expression according to the Th1/E47cs and –491 AT polymorphisms in AD and control brain samples

	n	AD (%)	*n*	Controls[a] (%)
Th1/E47cs				
GG	4	33.5 ± 1.7	4	22.5 ± 2.5
GT	19	36.3 ± 2.1[b]	11	22.6 ± 1.9
TT	10	32.4 ± 1.4	10	22.8 ± 2.7
491 AT				
AA	26	35.3 ± 2.7	15	22.8 ± 2.2
AT	7	33.5 ± 1.3[c]	10	22.5 ± 2.3

[a]Not significant.
[b]$P < 10^{-4}$.
[c]$P = 0.11$.

We did not confirm the deleterious effect of the –491 AA genotype described in the ε3ε3 Spanish population (11). This discrepancy may be explained by the significant difference in the –491 AT genotype distribution observed between the Spanish and the French or American control populations. Since the AD genotypic frequency was similar in the three studied populations, the deleterious effect of the AA genotype in the ε3ε3 group may only be due to the distribution in the Spanish control population.

When the impacts of these two promoter polymorphisms and the *APOE* ε4 allele were studied simultaneously in a multiple logistic regression model, we demonstrated that only the Th1/E47cs T allele modified the risk of developing AD independently of the ε4 allele, suggesting that the –491 polymorphisms may play a weaker role compared with Th1/E47cs in the development of AD. The location of both polymorphisms in the regulatory region of the *APOE* gene, their effects on the transcriptional activity in hepatoma cells (12) and their impacts in AD population, prompted us to test the hypothesis that they may modulate the *APOE* expression levels in brain and, therefore, be partly responsible for the marked allelic distortion of the *APOE* mRNA we observed in AD brain compared with controls in all the heterozygous genotypes. Indeed, the ε4 allele was overexpressed in ε3ε4 and ε2ε4 AD cases and the ε2 allele underexpressed in ε2ε3 AD cases compared with their respective controls. Consistent with the effects deduced from the case–

control study, the ε4 allele expression in AD brain was also correlated with the polymorphisms of the regulatory region of the *APOE* (Fig. 2): the Th1/E47cs T allele may increase the relative expression of the ε4 allele in AD, while the –491 T allele may decrease it.

Because numerous studies reported contradictory findings in brain and cerebrospinal fluid (CSF) concerning apoE protein level, it is difficult to speculate on the link between *APOE* mRNA and apoE protein levels (13–17). However, as suggested by Yamada *et al.*, the *APOE* expression may be decreased by an ε4 gene dosage in AD: the ε3 homozygous AD cases expressed more *APOE* mRNA than the ε4ε4 AD cases, the ε3ε4 presenting an intermediate mRNA level (18). A similar trend was found for proteins in AD brains (14) or in plasma (J. Poirier, personal communication), indicating that both the protein and mRNA levels may be directly correlated during the disease. Underlining the importance of apoE level, the *APOE* expression has been shown to correlate with Aβ peptide deposition in transgenic mice (19,20).

This observation may be very important, since previous reports showed that the *APOE* gene expression was increased between 2- and 3-fold in AD brains compared with controls regardless of the *APOE* genotype (18,21). In ε3ε4 AD cases, both the ε3 and ε4 alleles would be overexpressed, but the ε4 allele, due to the promoter mutations, being still more overexpressed than the ε3 allele. Exacerbation of *APOE* ε4 expression level may foster the intrinsic deleterious effect of the apoE4 isoform in AD for instance in promoting Aβ aggregation (2,6,22).

This expression level modulation may be intended not only for neurodegenerative disease, but also for neural development. Indeed, we observed a strong underexpression of the ε4 allele compared with the ε3 allele in controls. Although the role of apoE during maturation and ageing is not completely understood yet, the fact that apoE deficient homozygous mice exhibit reversible dendritic alterations and significant learning deficits in the Morris water maze, suggests neurotrophic capabilities for apoE (23–25). However, the abilities of each isoform may be different since the apoE4 isoform does not have the same effects as the apoE3 isoform on neurite outgrowth (26). For instance, apoE3, but not apoE4, may stabilize the neuronal cytoskeleton (7).

A global assessment of the modulation of *APOE* expression is difficult. Indeed, to date, five polymorphisms have been described in the *APOE* promoter region (10,12). Two of the three polymorphisms studied, seem to play a role in AD. The two remaining have allelic frequencies <1% (12), and therefore cannot explain the effects observed in the case–control and mRNA studies. However, it remains possible that other unknown polymorphisms modulate the *APOE* mRNA level. These new mutations may be far away from the promoter polymorphisms, for instance in the brain tissue specific element (27,28). The interaction between all the putative polymorphisms modifying *APOE* expression will be very difficult to model. Various combinations of different mutations may confer a large *APOE* expression heterogeneity at two levels: (i) the absolute level of *APOE* expression and (ii) the percentage of expression of one allele compared with the other in heterozygous individuals, adding to the complexity of the association between *APOE* and AD. Therefore, the variation of the *APOE* expression induced by the *APOE* promoter polymorphisms may partly explain the heterogeneity of the impact of the ε4 allele in different ethnic groups (1,29).

MATERIALS AND METHODS

Populations

The AD and control samples were Caucasians originating from France. Diagnoses of probable AD were established according to the DSM-III-R and NINDCS-ADRDA criteria (n = 573; age = 73.8 ± 8.1 years; age of onset = 70.4 ± 7.9 years; 35.9% of men) (30,31). The Caucasian controls were defined as subjects without DMS-III-R dementia criteria and with integrity of their cognitive functions (n = 509; age = 74.3 ± 9.9 years; 35.9% of men). Each individual or their relatives signed an informed consent.

Brain samples

These consisted of 45 controls (age = 80.3 ± 8.6 years; 44.9% of men) and 49 late-onset AD cases (age = 76.5 ± 9.3 years; age of onset = 68.4 ± 10.0 years; 44.4% of men), selected according to their *APOE* genotype. Eighty-eight samples were extracted from frontal cortex and six from occipital cortex, no difference of relative expressions being observed between those regions. The mean age was 78.4 ± 8.7 years for the AD cases genotyped ε3ε4 and 75.9 ± 7.5 years for the controls. Diagnoses were confirmed by neuropathological examination.

Genotype

The –491 AT, –427 CT, Th1E47cs and *APOE* genotypes were produced by PCR followed by restriction enzyme digestion of the amplified DNA as described (10–12,32).

APOE allelic quantitation

Total RNA extraction from brain tissues, heterozygous for *APOE* genotype, was performed as described (33) or using RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany) and then digested by DNase (Eurogentec, Belgium). No DNA contamination was observed after DNase digestion as detected by PCR of the digested product. *APOE* mRNAs were amplified by RT–PCR and allele quantitation was performed as described previously (9) by measuring a ratio of expression of two alleles in heterozygotes in order to avoid problems due to post-mortem delay, agonal state and cell population density.

Statistical analysis

The SAS software release 6.10 was used (SAS Institute, Cary, NC). Univariate analysis was performed using Pearson's χ^2 test. In the multivariate analysis, we coded the genotypes of each subject as dummy variables according to the tested hypotheses (at least one Th1/E47cs T allele: TT+TG/GG, at least one –491 T allele: TT+AT/AA and at least one ε4 allele). The effects of these variables on the disease were assessed with a multiple logistic regression model adjusted for age and gender. Comparison of the allelic expression was performed using Wilcoxon test.

We calculated the expected range of values of ε4 percentage in ε2ε4 AD and control individuals using the extreme values obtained for the ε2 and the ε4 percentages in the ε3ε4 and ε2ε3

AD and control samples, respectively (the ε3 allele being used as reference).

ACKNOWLEDGEMENTS

J.-C.L. is a recipient of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR). This work was supported by 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' (M.-C.C.-H., P.A. and F.P.) and the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

1. Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N. and van Duijn., C.M. (1997) Effects of age, sex and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *J. Am. Med. Assoc.*, **278**, 1349–1356.
2. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.-M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D. and Roses, A.D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 8098–8102.
3. 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 Alzheimer's disease in late-onset families. *Science*, **261**, 921–923.
4. Chartier-Harlin, M.-C., Parfitt, M., Legrain, S., Pérez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vidal, O., Roques, P., Gourlet, V., Fruchart, J.C., Delacourte, A., Rossor, M. and Amouyel, P. (1994) Apolipoprotein E ε4 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.
5. Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmader, K.E., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. and Pericak-Vance, M.A. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 for late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genet.*, **7**, 180–184.
6. Evans, K., Berger, E.P., Cho, C.G., Weisgraber, K.H. and Lansburry, P.T. (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implication for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 763–767.
7. Miyata, M. and Smith, J.D. (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β-amyloid peptides. *Nature Genet.*, **14**, 55–60.
8. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Goedert, M., Saunders, A.M., Huang, D., Corder, E.H., Dong, L.-M., Jakes, R., Alberts, M.J., Gilbert, J.R., Han, S.H., Hulette, C., Einstein, G., Schmechel, D.E., Pericak-Vance, M.A. and Roses, A.D. (1994) Hypotesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease are related to Apolipoprotein E genotype. *Exp. Neurol.*, **125**, 163–171.
9. Lambert, J.-C., Pérez-Tur, J., Dupire, M.J., Galasko, D., Mann, D., Amouyel, P., Hardy, J., Delacourte, A. and Chartier-Harlin, M.-C. (1997) Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 2151–2154.
10. Lambert, J.-C., Pasquier, F., Cottel, D., Frigard, B., Amouyel, P. and Chartier-Harlin., M.-C. (1998) A new polymorphism in the *APOE* promoter associated with risk of developing Alzheimer's Disease. *Hum. Mol. Genet*, **7**, 533–540.
11. Bullido, M.J., Artiga, M.J., Recuero, M., Sastre, I., Garcia, M.A., Aldudo, J., Lendon, C., Han, S.W., Morris, J.C., Frank, A., Vazquez, J., Goate, A. and Valdivieso, F. (1998) A polymorphism in the regulatory region of *APOE* associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nature Genet.*, **18**, 69–71.
12. Artiga, M.J., Bullido, M.J., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M.A., Aldudo, J., Vazquez, J. and Valdivieso, F. (1998) Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett.*, **421**, 105–108.
13. Lefranc, D., Vermersch, P., Dallongeville, J., Daems-Monpeurt, C., Petit, H. and Delacourte, A. (1996) Relevance of the quantification of apolipoprotein E in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **212**, 91–94.
14. Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C.E. and Pasinetti, G.M. (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Mol. Brain Res.*, **33**, 174–178.
15. Harr, S.D., Vint, L., Hollister, R., Hyman, B.T. and Mendez, A.J. (1996) Brain expression of Apolipoprotein E, J and A-I in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, **66**, 2429–2435.
16. Lehtimäki, T., Pirttilä, T., Mehta, P.D., Wiesniewski, H.M., Frey, H. and Nikkari, T. (1995) Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum. Genet.*, **95**, 39–42.
17. Merched, A., Blain, H., Visvikis, S., Herbeth, B., Jeandel, C. and Siest, G. (1997) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late-onset Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, **145**, 33–39.
18. Yamada, T., Kondo, A., Takamatsu, J., Tateishi, J. and Goto, I. (1995) Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, **129**, 56–61.
19. Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., Piccardo, P., Ghetti, B. and Paul, S.M. (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nature Genet.*, **17**, 263–264.
20. Igeta, Y., Kawarabayashi, T., Sato, M., Yamada, N., Matsubara, E., Ishiguro, K., Kanai, M., Tomidokoro, Y., Osuga, J., Okamoto, K., Hirai, S. and Shoji, M. (1997) Apolipoprotein E accumulates with the progression of A beta deposition in transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **56**, 1228–1235.
21. Diedrich, J.F., Minnigan, H., Carp, R.I., Whitaker, J.N., Race, R., Frey, W. II and Haase, A.T. (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**, 4759–4768.
22. Berr, C., Hauw, J.J., Delaere, P., Duyckaerts, C. and Amouyel, P. (1994) Apolipoprotein E allele epsilon 4 is linked to increased deposition of the amyloid beta-peptide (A-beta) in cases with or without Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **178**, 221–224.
23. Masliah, E., Mallory, M., Ge, N., Alford, M., Veinbergs, I. and Roses, A.D. (1995) Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp. Neurol.*, **136**, 107–122.
24. Gordon, I., Grauer, E., Genis, I., Sehayek, E. and Michaelson, D.M. (1995) Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.*, **199**, 1–4.
25. Masliah, E., Samuel, W., Veinbergs, I., Mallory, M., Mante, M. and Saitoh, T. (1997) Neurodegeneration and cognitive impairment in apoE-deficient mice is ameliorated by infusion of recombinant apoE. *Brain Res.*, **751**, 307–314.
26. Fagan, A.M., Bu, G., Sun, Y., Daugherty, A. and Holtzman, D.M. (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**, 30121–30125.
27. Simonet, W.S., Bucay, N., Pitas, R.E., Lauer, S.J. and Taylor, J.M. (1991) Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **266**, 8651–8654.
28. Roses, A.D. (1997) Apolipoprotein E, a gene with complex biological interactions in the aging brain. *Neurobiol. Dis.*, **4**, 170–185.
29. Tang, M.X., Stern, Y., Marder, K., Bell, K., Gurland, B., Lantigua, R., Andrews, H., Feng, L., Tucko, B. and Mayeux, R. (1998) The APOE-ε4 allele and the risk of Alzheimer Disease among African Americans, whites and Hispanics. *J. Am. Med. Assoc.*, **279**, 751–755.
30. American Psychiatric Association (1987) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Third edition revised (DSM-III-R), American Psychatric Association, Washington, DC.
31. McKahn, G., Drachman, D., Folstein, M., Karzman, R., Price, D. and Stadlan, E. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group *Neurology*, **34**, 939–944.
32. Hixon, J.E. and Vernier, D.T. (1991) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *J. Lipid Res.*, **31**, 545–548.
33. Gilmour, R.S. and Dixon, G.H. (1972) Biosynthesis of protamine in trout testis. *J. Biol. Chem.*, **247**, 4621–4627.

Le polymorphisme Th1/E47cs favorise le dépôt du peptide a$\beta_{1\text{-}42(43)}$.

Présentation du travail.

Nos travaux nous ont donc permis de montrer que le polymorphisme Th1/E47cs présentait dans notre population, un impact plus marqué sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer que le polymorphisme -491 AT. Par ailleurs, de nombreuses données suggèrent que ce polymorphisme est fonctionnel. Ces résultats supposent donc que le polymorphisme Th1/E47cs est susceptible d'influencer l'étiologie de la pathologie.

Puisque les polymorphismes ε de l'APOE sont capables de moduler la formation des dépôts amyloïdes, nous avons supposé que les polymorphismes du promoteur de l'APOE pourraient avoir un impact à ce niveau. Nous avons donc recherché des corrélations potentielles entre ces polymorphismes et la quantité de peptide $A\beta_{40}$, $A\beta_{42(43)}$ et d'Aβ total déposée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, mais aussi de sujets âgés sains.

Résultats.

Relation entre dépôts amyloïdes et polymorphismes du promoteur de l'APOE dans le tissu cérébral de patients.

Une étude en collaboration avec le Pr. David Mann (Université de Manchester, Angleterre), a été mené sur 51 patients atteints de formes certaines de la maladie d'Alzheimer. Les quantités de peptide $A\beta_{1\text{-}40}$, $A\beta_{1\text{-}42(43)}$ ont été mesurées en pourcentage de surface occupée au niveau des aires 8 et 9 du cortex frontal.

Comme décrit précédemment, l'allèle ε4 augmente les dépôts de peptide $A\beta_{1\text{-}40}$ ($p<0,002$). Par contre, l'allèle T du polymorphisme Th1/E47cs est associé à une augmentation

de la quantité totale de peptide Aβ déposé ($p<0,05$), plus particulièrement sous la forme de peptide $A\beta_{1-42(43)}$ ($p<0,03$) (Voir article).

Relation entre dépôts amyloïdes et le polymorphisme Th1/E47cs dans le tissu cérébral d'individus sains.

Une étude similaire a été menée en collaboration avec le Dr. Claudine Berr (INSERM 360, Paris) sur 185 sujets âgés sains d'origine alsacienne (âge : 79,5±6,2; 49% d'hommes); 169 individus ont été inclus dans cette étude après génotypage et exclusion des individus présentant un stade de Braak de niveau V.

	% avec DNF			TH1/E47cs TT/GT+GG	
	GG	GT	TT	Adjusted OR Age and sex	p
Hippocampus					
Dentate gyrus	7	14	25	2.3(0.8-6.7)	0.14
CA4	20	3	42	1.8(0.71-4.5)	0.21
CA3	17	27	29	1.3(0.48-3.4)	0.63
CA2	67	74	73	1.0(0.36-2.8)	0.97
CA1	89	90	96	2.1(0.25-17)	0.50
Subiculum	96	93	96	0.93(0.1-8.3)	0.95
Isocortex	67	67	58	0.62(0.25-1.5)	0.30
Superior temporal cortex (area22)	50	49	54	1.09(0.45-2.6)	0.86
Entorhinal cortex	91	91	100	-	-
Primary visual cortex (area 17-19)	2	0	8	-	-

Tableau 9: DNF (% de sujets avec lésions DNF) dans chaque génotype après comptage des lésions marquées par immunohistochimie contre les protéines Tau hyperphosphorylées.

Ce polymorphisme ne semble pas associé à la DNF dans le cerveau des témoins de cette étude. Seule une tendance peut être observé dans le dentate gyrus, celle-ci n'étant pas significative.

	% avec	PS		TH1/E47cs TT/GT+GG	
	GG	GT	TT	ajusté sur l'âge	p
	n=54	n=91	N=24	et le sexe	
Hippocampus					
Dentate gyrus	0	2	0	-	
CA4	2	1	0	-	
CA3	2	0	0	-	
CA2	7	10	12	1.4(0.34-5.4	0.66
CA1	13	9	30	3.6(1.2-10.7)	0.02
Subiculum	17	18	43	4.0(1.5-10.6)	0.006
Isocortex	30	24	42	1.9(0.78-4.7)	0.16
Superior temporal cortex (area22)	17	33	46	2.2(0.88-5.3)	0.09
Entorhinal cortex	37	26	46	1.9(0.77-4.7)	0.16
Primary visual cortex (area 17-19)	24	22	29	1.3(0.47-3.4)	0.65

Tableau 10: Plaques mises en évidence (% de sujets avec lésions) pour chaque génotype après immunohistochimie contre le peptide Aβ.

Au niveau des plaques séniles, le génotype TT est associé de façon significative à une augmentation du risque de présenter un nombre important de plaques séniles dans le CA1 et le subiculum (Tableau 10). Cependant après ajustement sur la présence d'un allèle ε4, l'impact du polymorphisme Th1/E47cs semble disparaître (OR=2,3 IC 95% [0,7-7,6], p=0,17 dans le CA1 et OR=2.4 IC 95% [0.82-6.9], p=0.11 dans le subiculum.

Discussion.

Ainsi, il existe une corrélation entre le polymorphisme Th1/E47cs et les lésions cérébrales présentes dans le cerveau des patients. Quant à ce qui peut être observé chez les témoins, l'impact de l'allèle T de Th1/E47cs ne peut être exclu dans le subiculum et le CA1, même si l'effet le plus important est probablement porté par l'allèle ε4. Ainsi le fait qu'une

corrélation puisse exister entre la présence de cette lésion et l'allèle T de Th1/E47cs dans des régions touchées durant les stades A et B (paragraphe 4.1.4.), suggèrent que l'expression de l'APOE puisse être un déterminant de la phase d'initiation de la formation des plaques. Cette idée est appuyée par le fait que dans le cerveau des malades, la quantité de peptide $A\beta_{1-42(43)}$ est principalement corrélée au polymorphisme Th1/E47cs, sous réserve du nombre de sujets étudiés. Or il semblerait que ce soit cette forme du peptide Aβ qui soit à l'origine de la formation des dépôts amyloïdes (106). Ainsi la quantité d'APOE pourrait être un important déterminant de la formation initiale des dépôts amyloïdes, idée renforcée par les études récentes sur les souris transgéniques (Paragraphe 6.7.1.3.). L'isoforme APOE4 modifierait alors plus spécifiquement la maturation des plaques car jouant essentiellement sur le dépôt du peptide $A\beta_{1-40}$.

En conclusion, ces résultats confortent l'implication du polymorphisme Th1/E47cs dans la pathologie. Par contre, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'influence du polymorphisme -491 AT sur les lésions cérébrales, appuyant de nouveau l'observation précédente, à savoir que ce polymorphisme aurait un impact moins accentué que le polymorphisme Th1/E47cs sur l'étiologie de la pathologie.

The Th1/E47cs polymorphism of the *APOE* promoter favors $A\beta_{42(43)}$ deposition.

Jean-Charles Lambert, David Mann*, Takeshi Iwatsubo†, Philippe Amouyel, Marie-Christine Chartier-Harlin

Unité INSERM 508
Institut Pasteur de Lille
BP 245, 59019 Lille Cedex

* Department of Pathological Sciences
University of Manchester, Stopford Building
Oxford Road, Manchester M13 9PT
UK

† Department of Neuropathology and Neuroscience
Faculty of Pharmaceutical Sciences,University of Tokyo
Japan

Correspondence should be addressed to Pr David Mann, Department of Pathological Sciences
University of Manchester, Stopford Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT
UK
Tel 44(0)61 275 5296 Fax 44 (0)61 275 5423

Running-head Title: APOE promoter mutations and amyloid plaques in Alzheimer's disease.

This paper contains:
14 references
1 table
Title: 10 words
Abstract: 133 words
Text: 656 words

Abstract

Recently, two polymorphisms (Th1/E47cs and -491 AT) in the apolipoprotein E gene (*APOE*) promoter, have been described to modulate the impact of *APOE* on Alzheimer's disease, likely in modifying its expression. We tested in 51 cases of AD, if those polymorphisms may modify $A\beta_{40}$, $A\beta_{42(43)}$ and total Aβ deposition in the brain in AD. The Th1/E47cs T allele was correlated with an increase in total Aβ deposition, mainly due to an increase in $A\beta_{42(43)}$ load ($p<0.03$). However, the ε4 allele is highly associated to an increase in the $A\beta_{40}$ deposition ($p<0.002$). No effect was found concerning the -491 AT polymorphism. Our results indicated that quantitative variations in *APOE* mRNA mediated by the Th1/E47cs polymorphism could play a major role in risk determination in a way consistent with the 'amyloid hypothesis of AD pathogenesis'.

Introduction

Possession of the apolipoprotein E (*APOE*) ε4 allele is the most frequently associated genetic susceptibility factor for Alzheimer's disease (AD)[1]. At present, there is much speculation and experimentation designed to determine the nature of the role of the ε4 allele in the pathogenesis of AD. The APOE4 isoform would not protect against oxidative stress conversely to the E2 isoform nor would it block inflammatory processes conversely to the APOE3 isoform[5,6]. However, the most recognised hypothesis suggests that the APOE4 isoform may facilitate the extracellular deposition of amyloid β peptide (Aβ) and more specifically, the $A\beta_{40}$ form[7-10].

Recent reports have suggested that, in addition to the biochemical properties of the APOE isoforms, the expression of *APOE* may be an important determinant for the development of AD. Indeed, the impact of the ε4 allele could be modulated by two polymorphisms in the *APOE* promoter (-491 and Th1/E47cs)[2-4], leading to an overexpression of the *APOE* alleles in AD. Since this overexpression may result in exacerbating the biochemical properties of the APOE isoforms, we tested the hypothesis that the APOE promoter polymorphisms might modulate $A\beta_{40}$, $A\beta_{42(43)}$ and total Aβ deposition in the brain in AD.

Materials and Methods

51 cases of AD (age=74.9±7.6 years; age at onset=67.4±7.9 years; 50% of men) were included in this study, the diagnosis being confirmed by postmortem pathological examinations. DNA was extracted from frozen brain tissue and the *APOE*, Th1/E47cs and -491 AT genotypes determined as described elsewhere[2,3]. Area proportion (% of tissue occupied) of $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42(43)}$ containing amyloid deposits was measured as previously

reported[11]. The amyloid load data was compared according to the three genotypes for $A\beta_{40}$, $A\beta_{42(43)}$ and total Aβ containing deposits, using non-parametric test (Wilcoxon with continuity correction of 0.5).

Results

The ε4, Th1/E47cs T and -491 T allele frequencies were 47%; 56% and 13% respectively, similar to those we have already described in probable AD populations[2-4]. Also, as previously described[9,10], the total amount of deposited $A\beta_{40}$ was significantly increased within the brain in cases of AD carrying at least one ε4 allele (table; $p<0.002$). However, no significant effect was observed for $A\beta_{42(43)}$ and total Aβ deposition according to the ε4 allele. Conversely, AD cases bearing at least one Th1/E47cs T allele showed a significantly increased total Aβ deposition ($p<0.05$), mainly due to an increase in the amount of deposited $A\beta_{42(43)}$ ($p<0.03$), whereas no significant modifications in $A\beta_{40}$ deposition were found (table1). Finally, the -491 AT polymorphism had no impact on the three Aβ load variables.

Discussion

We have recently reported that the Th1/E47cs T, and at a weaker level the -491 T allele, may modify the risk of developing AD[2,3]. Our data suggested that the deleterious effect of the Th1/E47cs T allele may be mediated by an increase in *APOE* allele levels of expression[2] and that this in turn might favor Aβ deposition. Our results are consistent with the observation that a lack of APOE reduces Aβ deposition in transgenic mice[12], and support a role for APOE, in facilitating Aβ deposition in the brain in AD. Since $A\beta_{42(43)}$ is suspected to represent the

initial deposited Aβ species in AD[11] and because the Th1/E47cs T allele is correlated to an increase of $A\beta_{42(43)}$ deposition, these observations suggest a role for APOE expression in the very early stages of amyloid deposition. The combination of *APOE* overexpression to the APOE4 biochemical properties may finally favor maturation of the plaques, $A\beta_{40}$ being mostly present in mature plaques containing a central core of Aβ[9,10]. However, we cannot exclude the possibility that APOE directly alters Aβ clearance.

In conclusion, our data reinforces the hypothesis that in conjunction with the modifications of structure due to ε4 allele[13], quantitative variations in *APOE* mRNA also play a major role in risk determination in a way consistent with the 'amyloid hypothesis of AD pathogenesis'[14].

Acknowledgements:

We wish to thanks Ms M Baba and A Takeuchi for their technical assistance. This work was supported by INSERM and Institut Pasteur de Lille.

References:

1. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance, M, Schmechel, D, Saunders, AM; Goldgaber, Roses AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci. 1993;90:8098-8102.
2. Lambert JC, Pasquier F, Cottel D, Frigard B, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's Disease. Hum. Mol. Genet 1998;7:533-540.
3. Lambert JC, Berr C, Pasquier F, Delacourte A, Frigard B, Cottel D, Pérez-Tur J, Mouroux V, Mohr M, Cécyre D, Glasko D, Lendon C, Poirier J, Hardy J, Mann D, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. 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. 1998;7:1511-1516.
4. Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. Nat. Genet. 1998;18:69-71.
5. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. Nat. Genet. 1996; 14:55-61.
6 Barger, SW, Harmon AD. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. Nature 1997;388:878-881.
7. Schmechel D, Saunders AM, Strittmatter WJ, Pericak-Vance R, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Increased amyloid β peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. Proc. Natl.

Acad. Sci. USA:90, 9649-9653 (1993).

8 Berr C, Hauw JJ, Delaere P, Duyckaerts C, Amouyel P. Apolipoprotein E allele epsilon 4 is linked to increased deposition of the amyloid beta-peptide (A-beta) in cases with or without Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 1994;178:221-224.

9 Mann DMA, Iwatsubo T, Pickering-Brown SM, Owen F, Saido TC, Perry RH. Preferential deposition of amyloid β protein (Aβ) in the form Aβ40 in Alzheimer's disease is associated with a gene dose dosage effect of the apolipoprotein E4 allele. Neurosci. Lett. 1997; 221:81-84.

10. Iwatsubo T, Odaka N, Szuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualisation of Aβ(42,43)-positive and Aβ40-positive senile plaques with end-specific Aβ monoclonal antibodies: evidence that an initially deposited species is Aβ1-42(43). Neuron 1995;13:45-53.

11. Gearing M, Mori H, Mirra SS. Aβ peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. Ann. Neurol. 1996;39:395-399.

12. Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. Nat. Genet. 1997:17;263-264.

13. Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. Adv. Protein Chem. 1994;45:249-302.

14. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. Trends Neurosci. 1997;20:154-159.

$A\beta_{40}$, $A\beta_{42(43)}$ and total $A\beta$ depositions according to the presence or absence of the ε4, Th1/E47cs T and -491 T alleles.

	APOE		Th1/E47cs		-491 AT	
	ε4-	ε4+	T-	T+	T-	T+
n	12	39	8	43	38	13
$A\beta_{40}$ (% area)	1.2±1.1	3.9±3.3[a]	1.9±2.8	3.5±3.1[b]	3.3±3.2	3.1±3.0
$A\beta_{42(43)}$ (% area)	7.5±2.5	8.7±3.5	6.5±2.9	8.8±3.2[c]	8.4±3.6	8.7±2.3
Total Aβ (% area)	8.7±3.0	12.4±5.7[b]	8.4±4.7	12.1±5.4[d]	11.5±5.7	11.7±4.5

[a] $p<0.001$; [b] $p<0.06$; [c] $p<0.03$; [d] $p<0.05$.

Association indépendante d'un polymorphisme du promoteur de l'APOE avec une augmentation du risque de développer un infarctus du myocarde et avec une diminution de la concentration d'APOE plasmatique

Présentation du travail.

Les maladies cardio-vasculaires et la maladie d'Alzheimer présentent de nombreux déterminants communs qu'ils soient d'ordre environnementaux ou génétiques, l'allèle ε4 étant l'un de ces facteurs partagés. De plus, les pathologies vasculaires peuvent elles même être des facteurs de risque du développement d'une démence. Ainsi, existerait-il une association entre antécédent de défaillance cardiaque aiguë et incidence de démence (643). Par ailleurs, appuyant cette observation, la quantité de plaques séniles est plus importante chez des sujets non déments ayant une pathologie coronaire, comparée à celle d'un groupe de sujets non déments, indemnes de ce type de maladie (644,645). Enfin, la présence d'athérosclérose est associée à une augmentation du risque de développer une maladie d'Alzheimer (646).

Nous avons donc été amené à tester l'impact des polymorphismes Th1/E47cs, -427 AT et -491 AT sur le risque de développer un infarctus du myocarde.

Présentation des résultats.

Seul l'allèle T du polymorphisme Th1/E47cs est associé à une augmentation du risque de développer un infarctus du myocarde, indépendamment de l'allèle ε4.

Par ailleurs, une diminution de la concentration en APOE plasmatique est observée, corrélée au nombre de copies de l'allèle T de Th1/E47cs, cette association étant de nouveau indépendante des effets du polymorphisme ε2/ε3/ε4 de l'APOE sur cette concentration plasmatique.

Discussion.

Il apparaît donc que le polymorphisme Th1/E47cs est un nouveau déterminant génétique commun aux pathologies cardio-vasculaires et à la maladie d'Alzheimer. De plus, ce polymorphisme modifie la concentration plasmatique en APOE dont le lieu majoritaire de synthèse est le tissu hépatique. Or, Artiga *et al.* ont montré que l'allèle T de Th1/E47cs était associé par rapport à l'allèle G, à une diminution de l'expression d'un gène rapporteur dans une lignée d'hépatocytomes, observation donc cohérente par rapport à ce que l'on peut observer *in vivo*.

De nouveau, nos résultats semblent infirmer l'implication des autres polymorphismes du promoteur de l'APOE et en particulier le -491 AT. En effet, celui-ci n'a aucun impact sur le risque de développer un infarctus du myocarde et ni sur la concentration plasmatique en APOE. Cette observation est en contradiction avec les résultats publiés par Laws *et al.*, qui observent une augmentation de la concentration plasmatique en APOE liée au génotype AA dans leur population témoin. Cependant, le nombre d'individus étudiés dans ce travail est faible (n=44). Des études complémentaires semblent donc nécessaires pour lever cette ambiguïté.

Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations. The ECTIM Study.

Jean-Charles Lambert[1], Thierry Brousseau[1,2], Véronique Defosse[1], Alun Evans[3], Dominique Arveiler[4], Jean-Bernard Ruidavets[5], Bernadatte Haas[4], Jean-Pierre Cambou[5], Gérald Luc[6], Pierre Ducimetière[7], François Cambien[8], Marie-Christine Chartier-Harlin[1] and Philippe Amouyel[1,*]

[1]*INSERM Unité 508, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France.*

[2]*Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 3 rue du Professeur Laguesse, 59006 Lille cedex, France.*

[3]*Belfast MONICA Project, Department of Epidemiology and Public Health, The Queen's University of Belfast, Belfast BT12 6BJ, Northern Ireland.*

[4]*Strasbourg MONICA Project, Laboratoire d'Epidémiologie, Faculté de Médecine, 67085 Strasbourg cedex, France.*

[5]*INSERM Unité 518, Faculté de Médecine Toulouse-Purpan, 31073 Toulouse cedex, France.*

[6]*INSERM U325, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille cedex, France.*

[7]*INSERM Unité 258, Hôpital Paul Brousse, 16, avenue Paul Vaillant-Couturier, 94807 Villejuif cedex, France.*

[8]*INSERM SC7, 17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France.*

Corresponding author : Pr. Philippe AMOUYEL, MD, PhD
INSERM Unité 508, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France.
Phone : +33 (0)3 20 87 77 10
Fax : +33 (0)3 20 87 78 94
E-mail: philippe.amouyel@pasteur-lille.fr

ABSTRACT

Apolipoprotein E (APOE) is a major protein in lipid metabolism existing in three common isoforms APOE2, APOE3 and APOE4. The ε4 allele of the APOE gene (*APOE*) coding for the APOE4 isoform is associated with an increased risk of myocardial infarction (MI) and of Alzheimer's disease (AD). Recently, several polymorphisms in the *APOE* regulatory region have been reported. Some of these have been associated with AD, and modified *APOE* allelic mRNA expression in AD brains.

Here, we have investigated whether three of these promoter polymorphisms (-491 AT, -427 CT and Th1/E47cs) can also modify cardiovascular risk. The hypothesis was tested in a large multicentre case-control study of MI, the ECTIM Study, on 567 cases and 678 controls. Among the three *APOE* promoter polymorphisms tested, only the Th1/E47cs T allele was associated with a significantly increased risk of MI (OR=1.29 95% IC: [1.09-1.52], $p<0.003$) and the effect was shown to be independent of the presence of the other mutations, including the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism. Moreover, the Th1/E47cs T allele greatly decreased the level of circulating plasma APOE concentrations in a dose-dependent manner ($p<0.008$). These data indicate that the Th1/E47cs T allele of the *APOE* regulatory region emerges as a new genetic susceptibility risk factor for MI and constitutes another common risk factor for both neurodegenerative and cardiovascular diseases.

INTRODUCTION

Apolipoprotein E plays a crucial role in lipid metabolism as a ligand for various cell-surface receptors including the low density lipoprotein (LDL) receptor, the LDL-receptor related protein (LRP) and the very low density lipoprotein (VLDL) receptor. In addition to the APOE3 normal isoform encoded by the *APOE* ε3 allele, mutations occurring in the APOE gene (*APOE*) at codon 158 (*APOE* ε2 allele) and codon 112 (*APOE* ε4 allele) determine the existence of two other isoforms, called APOE2 and APOE4 respectively. The *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism has been shown to have an impact on total cholesterol, LDL-cholesterol and APOE plasma levels. Individuals carrying the *APOE* ε4 allele had increased total cholesterol, LDL-cholesterol and decreased APOE plasma levels (1,2). These effects may be due to isoform differences in receptor binding and to modulation of the distribution of APOE among lipoproteins resulting in modulation of the clearance rate of triglyceride-rich APOE-containing lipoproteins, and to subsequent regulation of LDL-receptors by intracellular cholesterol (2). Hence, the genetic impact of the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism on total plasma cholesterol variance, estimated to be more than 8%, is thought to be one of the most powerful genetic components in the regulation of cholesterol levels at a population level (3,4).

Given the strong impact of high total and LDL-cholesterol plasma levels on the occurrence of coronary heart diseases (CHD) and the effect of the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism on these parameters, the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism is suspected to modulate CHD risk. Indeed, several matched case-control studies have shown an increased prevalence of the *APOE* ε4 allele in CHD patients from various populations (1,5). Nevertheless, even if *APOE* ε4 appears as a major genetic risk factor for CHD, individuals bearing *APOE* ε4 do not inevitably develop this disorder. This suggests that other genetic or environmental risk factors may interact with *APOE* ε4 in determining CHD risk.

In Alzheimer's disease (AD), the *APOE* ε4 allele is also strongly associated with an increased risk of developing the disease, but as in CHD, individuals bearing *APOE* ε4 do not necessarily develop dementia (6). It was lately proposed that together with the qualitative modification of the APOE structure due to the *APOE* ε4 allele, quantitative variations of *APOE* mRNA expression played a major role in risk determination (7). Reinforcing this hypothesis, polymorphisms in the *APOE* regulatory region have been recently described at positions –491 AT, –427 TC and –219 GT, and associated with the risk of developing AD (8,9). In particular, the -219 GT polymorphism, also called the Th1/E47cs polymorphism, was shown to have functional activity in vitro (10) and to significantly modify *APOE* allelic mRNA expression levels in human AD brain tissue (11).

In cardiovascular diseases, since the *APOE* locus has been implicated in the genetic predisposition to MI, we tested whether the –491 AT, –427 TC and Th1/E47cs polymorphisms, in addition to the effect of the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism, may modify cardiovascular risk, in a large multicentre case-control study of MI.

RESULTS

Genotypic and allelic distributions are presented in table 1. Allelic and genotypic distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium for all the polymorphism characterized. A statistically significant difference in distribution between cases and controls was detected for the Th1/E47cs and *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphisms, the *APOE* ε4 and Th1/E47cs T alleles being more frequent in cases than controls (table 1). As previously described in the ECTIM Study, the relative risk of MI, approximated by the odds ratio (OR), in men carrying the *APOE* ε4 allele was significantly increased (OR=1.35 [1.08-1.69], p<0.008) compared to non carriers. Furthermore, in men carrying the Th1/E47cs T allele, the risk of developing MI was also significantly increased (OR=1.25 [1.07-1.47], p<0.005) (table 2). After adjustment on covariates (age, centre, body mass index, LDL-cholesterol, alcohol and tobacco consumption), the increased relative risks associated with the *APOE* ε4 allele (OR=1.39 [1.10-1.76], p<0.007) and the Th1/E47cs T allele (OR=1.29 [1.09-1.52], p<0.003) remained significant. Since strong linkage disequilibrium has been shown between the four polymorphisms (8,9,11), we estimated the effect of each polymorphism on MI risk independently of the others by multivariate regression analysis (table 2). These data indicated that the relative risk remained significantly increased in the presence of the *APOE* ε4 allele (OR=1.30 [1.02-1.65], p<0.04) and Th1/E47cs T allele (OR=1.23 [1.03-1.47], p<0.02), confirming the independent effect of both polymorphisms on MI risk.

Assuming that the presence of both the *APOE* ε4 and Th1/E47cs T alleles would be a powerful risk factor for early onset MI, we compared the estimated frequencies of the *APOE* ε2/ε3/ε4-Th1/E47cs haplotypes between cases aged 55 years or less at the date of onset and cases aged more than 55 years (median age of onset). The frequency of the *APOE* ε4-Th1/E47cs T haplotype was significantly higher in younger than in older cases (14.0% vs

9.1%; $p<0.04$). Moreover, in APOE ε4ε4 homozygous cases, the mean age of the ten Th1/E47cs TT bearers was 49.6 ± 8.8 years whereas it was 57.8±7.6 years for the eight Th1/E47cs TT non bearers (non-parametric Wilcoxon test: $p<0.04$). Conversely, frequencies of the other haplotypes did not statistically differ between cases and controls.

Given the key-role of APOE in circulating lipid metabolism, the major impact of plasma lipids on cardiovascular disease, and the effect of the Th1/E47cs polymorphism on MI risk, we tested the impact of the Th1/E47cs polymorphism on various lipid and lipoprotein plasma concentrations in non-treated controls participating in the study. Interestingly, no variation in lipid and lipoprotein plasma levels could be associated to the Th1/E47cs polymorphism but we identified a highly significant difference in plasma APOE concentrations according to the Th1/E47cs genotype ($p<0.0001$; table 3). Plasma APOE concentrations appeared to be allele dose-dependant : the highest APOE plasma levels were observed in Th1/E47cs GG homozygotes, the lowest one in Th1/E47cs TT homozygotes, intermediate ones in heterozygotes, and the lowest Th1/E47cs TT homozygotes. The two other promoter polymorphisms had no effect on APOE plasma concentrations (data not shown). Since the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism strongly determined the APOE concentrations (1), the impact of the Th1/E47cs polymorphism on plasma APOE was reanalyzed after adjustment on the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism. The impact of the Th1/E47cs T allele was still significant ($p<0.008$). Furthermore, when the ECTIM control group was stratified according to APOE genotypes, except in ε2ε3 bearers for which the APOE levels are known to be dramatically increased (1), similar trends of the Th1/E47cs polymorphism on *APOE* plasma concentrations were observed in the ε3ε3, ε3ε4 and ε4ε4 subgroups (table 3).

DISCUSSION

In the ECTIM Study our data demonstrate that the Th1/E47cs polymorphism, located in the *APOE* promoting sequence, significantly modulates the risk of MI, independently of the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism. Given the role of APOE in plasma lipid metabolism, and in order to determine the mechanism by which the Th1/E47cs polymorphism may modify the risk of MI, we tested the impact of the polymorphism on the various lipid and the lipoprotein plasma concentrations. Despite a strong effect of the mutation on APOE plasma concentrations, no major effect could be observed on lipids, especially for total cholesterol and atherogenic LDL subfraction. Other mutations affecting the *APOE* promoter, the –491 AT and –427 TC polymorphisms, did not show any effect on lipid levels or the risk of MI.

Since the –491 AT, –427 TC and Th1/E47cs polymorphisms have been identified in the *APOE* promoting region, the functionality of these mutations is still under debate. The ECTIM Study afforded the opportunity to explore indirectly the putative functionality in two ways: firstly, by evaluating the impact of each polymorphism on the risk of MI, in which the *APOE* locus has been previously and consistently implicated; secondly, by measuring the effect of each polymorphism on APOE plasma concentrations which are, at least partly, influenced by the APOE hepatic synthesis rate and, consequently, by hepatic *APOE* activity. Stemming from intensive research on Alzheimer's disease, numerous data have suggested that the Th1/E47cs polymorphism may be functional: (i) the Th1/E47cs T allele is consistently and independently associated with increased risk of AD (8,11), (ii) the Th1/E47cs polymorphism is associated with modifications of the relative *APOE* allelic mRNA expression in AD brains (11), and (iii) studies of *in vitro* transcriptional activity of the allelic forms of the *APOE* promoter, in hepatoma HepG2 cells, showed an association of the Th1/E47cs T allele with a decreased transcriptional rate of *APOE* (10). Considering its association with MI risk, our data from the ECTIM Study reinforce the probability of functionality of the Th1/E47cs

polymorphism. Moreover, this same Th1/E47cs T allele appears to be a risk factor for both neurodegenerative and cardiovascular diseases. In addition, we were able to link the Th1/E47cs T allele with lower APOE plasma concentrations. This observation is in agreement with the previously reported lower expression of *APOE* associated with the presence of the Th1/E47cs T allele in HepG2 transfected cells (10). Conversely, the ECTIM Study do not support those obtained in AD for other mutations occurring in the *APOE* promoter, specially the –491 AT polymorphism. Indeed, some reports suggested that the –491 AA genotype may increase the AD risk (9,12,13) whereas others did not (11,14-16). Moreover, the –491 A allele was shown to increase *APOE* transcriptional rate in HepG2 transfected cells, and was associated with increased APOE plasma levels in both cases of AD and controls (12). In our study however, multivariate analysis abolished any effect of the –491 AT and –427 TC polymorphisms on MI risk or on APOE plasma concentrations. In summary, the significant and independent effect of the Th1/E47cs polymorphism on the risk of MI and APOE plasma concentrations observed in the ECTIM Study strongly reinforces the hypothesis that the polymorphism may be functional, and implicated in the pathological process of MI and AD by modulating the APOE transcriptional rate.

A major question remains concerning the mechanism by which the Th1/E47cs polymorphism may influence the cardiovascular risk. Despite a substantial effect of the Th1/E47cs T allele on MI risk and APOE plasma concentrations, the polymorphism failed to show any significant effect on circulating lipids, specially total cholesterol and LDL-cholesterol. Consequently, the contribution of the polymorphism to MI risk is unlikely to be mediated though a modulation of plasma lipoprotein metabolism, as it has been suggested to explain the functionality of the APOE ε2/ε3/ε4 polymorphism. Using HepG2 hepatoma cells as a model, Bohnet et al. have demonstrated that the APOE concentrations in VLDL, in addition to the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism, help to determine VLDL affinity for the

APOE-binding receptors, and probably subsequent variations in plasma total and LDL-cholesterol levels (17). In the present study, plasma VLDL-cholesterol levels were highly associated with the *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphism confirming that circulating VLDL-cholesterol is strongly determined by the affinity of APOE isoforms carried by VLDL lipoproteins (1). However, VLDL-cholesterol concentrations were not associated with variations at the Th1/E47cs locus, even after stratification on *APOE* ε2/ε3/ε4 genotypes. Since the Th1/E47cs polymorphism has been shown to influence *APOE* expression, these data suggest that APOE concentrations in VLDL are unaffected by hepatic *APOE* expression. As a consequence, the Th1/E47cs polymorphism is unlikely to modulate VLDL binding affinity for the receptors, and subsequent plasma lipid and lipoprotein variations. Indeed, in our study the Th1/E47cs polymorphism was not associated with significant variation in lipid and lipoprotein plasma levels.

Since the deleterious impact of the Th1/E47cs T allele on MI cannot be explained by a major effect on circulating lipids, it may be mediated by more subtle and local mechanisms, involved, for instance, in the course of atherosclerotic plaque formation. Interestingly, abundant APOE, mainly produced by macrophages, is found in atherosclerotic lesions, suggesting that macrophage-derived APOE may be anti-atherogenic (18,19). This hypothesis has been reinforced by results in *APOE* knock-out mice: (i) after dietary stress, *APOE* homozygous knock-out mice presented extensive atherosclerotic lesions whereas the normal mice did not, while the *APOE* heterozygous knock-out mice presented an intermediate phenotype (20), (ii) *APOE* null mice transplanted with bone marrow from normal mice demonstrated substantially increased resistance to diet-induced atherosclerosis compared with non-transplanted *APOE* null mice (21,22), (iii) Bellosta *et al.*, by studying the effect of macrophage-specific expression of human *APOE* in *APOE* null mice, showed that this specific *APOE* expression reduced atherosclerotic lesion development compared to control

littermates matched for cholesterol level and lipoprotein profile (23).

Several mechanisms have been proposed to explain how macrophage-derived APOE may be anti-atherogenic: (i) APOE may protect against oxidative stress and isoform-specific antioxidant activities have been described, the APOE2 isoform being the most effective agent and the APOE4 isoform being the lesser (24), (ii) macrophage APOE may also modulate cholesterol balance in the arterial wall in an isoform-dependent manner (25,26), APOE2/APOE2 macrophages secreting cholesterol more efficiently than APOE3/APOE3 or APOE4/APOE4 cells (27).

Altogether these data suggest that genetically determined quantitative limitations of *APOE* expression may have major effects in humans, especially when they are stressed by an atherogenic diet, at least by regulating antioxidant activities and cholesterol balance within the arterial wall. In this context, the increased risk of MI and decreased APOE plasma concentrations associated with the Th1/E47cs T allele may suggest that, in addition to the deleterious effect of the APOE ε4, the basal ability of cells to synthesize and secrete APOE may be of particular relevance, irrespective, to some extent, of the isoform. With this in mind, by calculating the mean age of APOE ε4ε4 homozygotes cases according to the Th1/E47cs status, we have suggested that Th1/E47cs TT homozygotes may be at higher risk of MI.

In conclusion, by studying the impact of mutations affecting the *APOE* promoter on cardiovascular disease risk, we reinforced the probability of functionality of the Th1/E47cs polymorphism while other mutations did not seem to exert major effects. The Th1/E47cs should significantly influence the level of synthesis of APOE which may, in addition to the specific properties of the various isoforms, be a critical determinant of physiological and pathological mechanisms involved in both cardiovascular and neurodegenerative disorders relating to the *APOE* locus.

MATERIALS AND METHODS

Population studied

This work was carried out in a large multicentre case-control study, the ECTIM Study (Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde) based on four centres participating in the WHO-MONICA Project: Lille and its suburbs, Strasbourg and the region of Bas-Rhin, Toulouse and the region of Haute-Garonne, in France, and Belfast and its surroundings in Northern Ireland (28). A total population of 587 men aged 25 to 64 years old surviving a definite MI was recruited and compared to a random sample of 727 age-matched male controls from the same geographical areas.

Blood sampling and lipid, lipoprotein, and apolipoprotein analyses

Blood sampling, and lipid, apolipoprotein and lipoprotein measurements were performed according to the methods described elsewhere (28). Samples from cases were obtained between 3 and 9 months after MI.

DNA extraction and genetic analysis

Genomic DNA extraction and PCR amplifications were performed as previously described (8,9). The –491 AT, –427 TC, Th1/E47cs and *APOE* ε2/ε3/ε4 genotypes could be obtained for 1245 subjects (567 cases *vs* 678 controls). APOE ε2/ε3/ε4 was deduced from phenotyping analysis (1). For each other polymorphism, mutations were detected by adequate enzymatic digestion followed by an electrophoretic step in ethidium bromide stained agarose or polyacrylamide gels.

Statistical analysis

The data were analyzed using the SAS statistical software release 6.12 (SAS Institute Inc. Cary, Indiana, USA). Genotype frequencies were compared in cases and controls with multivariate logistic regression analysis including dummy variables to take populations and population-genotype interactions into account. Genotypes were coded according to the hypothesis tested (dose-dependent model as observed in Table 1). Extended haplotype frequencies of the four markers were estimated on collapsed data using the myriad algorithm described by McLean and Morton (29), using a computer program by Cox et al. (30).

In controls, lipid and lipoprotein levels were compared between genotypes by analysis of covariance. The tests were adjusted by age, centre, body mass index, tobacco and alcohol consumption. Triglycerides and APOE plasma concentrations were analyzed after log transformation.

REFERENCES

1. Luc, G., Bard, J.M., Arveiler, D., Evans, A., Cambou, J.P., Bingham, A., Amouyel, P., Schaffer, P., Ruidavets, J.B. and Cambien, F. (1994) Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb.*, **14**, 1412-1419.
2. Boerwinkle, E. and Utermann, G. (1988) Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet*, **42**, 104-112.
3. Sing, C.F. and Davignon J. (1985) Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet*, **37**, 268-285.
4. Boerwinckle, E.S., Visvikis, S., welsh, D., Steinmetz, J., Hanash, S.M. and Sing, C.F. (1987) The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in men. II. The role of apolipoprotein polymorphism in determining levels, variability and covariability of cholesterol, beta-lipoprotein and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am J Hum Genet*, **51**, 567-582.
5. Nakai, K., Fusazaki, T., Zhang, T., Shiroto, T., Osawa, M., Kamata, J., Itoh, M., Nakai, K., Habano, W., Kiuchi, T., Yamamori, S. and Hiramori, K. (1998) Polymorphism of the apolipoprotein E and angiotensin I converting enzyme genes in Japanese patients with myocardial infarction. *Coron Artery Dis*, **9**, 329-34.
6. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Song L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D. and Roses A.D. (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* USA, 90, 8098-102.
7. Lambert, J-C., Perez-Tur, J., Dupire, M-J., Galasko, D., Mann, D., Amouyel, P., Hardy, J., Delacourte, A. and Chartier-Harlin, M-C. (1997) Distorsion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **6**, 2151-2154.
8. Lambert, J-C., Pasquier, F., Cottel, D., Frigard, B., Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M-C. (1998) A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 533-40.
9. Bullido, M-J., Artiga, M-J., Recuero, M., Sastre, I., Garcia, M.A., Aldudo, J., Lendon,

C., Han, S.W., Morris, J.C., Frank, A., Vazquez, J., Goate, A. and Valdivieso, F. (1998) A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet*, 18, 69-71.

10. Artiga, M.J., Bullido, M.J., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M.A., Aldudo, J., Vazquez, J., Valdivieso, F. (1998) Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett.*, **421**, 105-108
11. Lambert, J-C., Berr, C., Pasquier, F., Delacourte, A., Frigard, B., Cottel, D., Perez-Tur, J., Mouroux, V., Mohr, M., Cecyre, D., Galasko, D., Lendon, C., Poirier, J., Hardy, J., Mann, D., Amouyel, P. and Chartier-Harlin, M-C. (1998) 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, 1511-1516.
12. Laws, S.M., Taddei, K., Martins, G., Paton, A., Fisher, C., Clarnette, R., Hallmayer, J., Brooks, W.S., Gandy, S.E. and Martins, R.N. (1999) The -491AA polymorphism in the APOE gene is associated with increased plasma apoE levels in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, **10**, 879-882.
13. Town, T., Paris, D., Fallin, D., Duara, R., Barker, W., Gold, M., Crawford, F. and Mullan, M. (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**, 95-98.
14. Song, Y.Q.,, Rogaeva, E., Premkumar, S., Brindle, N., Kawarai, T., Orlacchio, A., Yu, G. Levesque, G., Nishimura, M., Ikeda, M., Pei, Y., O'Toole, C., Duara, R., Barker, W., Sorbi, S., Freedman, M., Farrer, L. and St George-Hyslop, P. Absence of association between Alzheimer disease and the -491 regulatory region polymorphism of APOE. *Neurosci. Lett.*, **250**, 189-192.
15. Toji, H., Maruyama, H., Sasaki, K., Nakamura, S. and Kawakami, H. (1999) Apolipoprotein E promoter polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci. Lett.*, **259**, 56-58.
16. Roks, G., Cruts, M., Bullido, M.J., Backhovens, H., Artiga, M.J., Hofman, A., Valdivieso, F., Van Broeckhoven, C., Van Duijn, C.M. (1998) The -491 A/T polymorphism in the regulatory region of the apolipoprotein E gene and early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **258**, 65-68.
17. Bohnet, K., Pillot, T., Visvikis, S., Sabolovic, N. and Siest, G. (1996) Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors. *J. Lipid. Res.*, **37**, 1316-1324.

18. Rosenfeld, M.E., Butler, S., Ord, V.A., Lipton, B.A., Dyer, C.A., Curtiss, L.K., Palinski, W., Witztum, J.L.. (1993) Abundant expression of apolipoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb.*, **13**, 1382-1389.

19. O'Brien, K.D., Deeb, S.S., Ferguson, T.O. McDonald, T.O., Allen, M.D., Alpers, C.E. and Chait, A. (1994) Apolipoprotein E localization in human coronary atherosclerosis plaques by in-situ hybridization and immunohistochemistry and comparison with lipoprotein lipase. *Am. J. Pathol.*, **144**, 538-48.

20. Zhang, S.H., Reddick, R.L., Burkey, B. and Maeda, N. (1994) Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J. Clin. Invest.*, **94**, 937-945.

21. Linton, M.F., Atkinson, J.B., and Fazio, S. (1995) Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science*, **267**, 1034-1037.

22. Boisvert, W.A., Spangenberg, J. and Curtiss, L.K. (1995) Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.*, **96**, 1118-1124.

23. Bellosta, S., Mahley, R.W., Sanan, D.A., Murata, J., Newland, D.L., Taylor, J.M. and Pitas, R.E. (1995) Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *J. Clin. Invest.*, **96**, 2170-2179

24. Miyata, M. and Smith, J.D. (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat. Genet.*, **14**, 55-61.

25. Kruth, H.S., Skarlatos, S.I., Gaynor, P.M. and Gamble, W. (1994) Production of cholesterol-enriched nascent high density lipoproteins by human monocyte-derived macrophages is a mechanism that contributes to macrophage cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.*, **269**, 24511-24518.

26. Mazzone, T. and Reardon, C. (1994) Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3. *J. Lipid. Res.*, **35**, 1345-1353.

27. Cullen, P., Cignarella, A., Brennhausen, B., Mohr, S., Assmann, G. and Von Eckardstein, A. (1998) Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and in cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages. *J.*

Clin. Invest., **101**, 1670-1677.

28. Parra, H-J., Arveiler, D., Evans, A.E., Cambou, J-P., Amouyel, P., Bingham, A., McMaster, D., Schaffer, P., Douste-Blazy, P. and Luc, G. (1992) A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler. Thromb.*, **12**, 701-707.
29. Mc Lean, C.J. and Morton, N.E. (1985), Efficiency of lod scores for representing multiple locus linkage data, Genet. Epidemiol., **2**, 263-272.
30. Cox, N.J., Bell, G.I. and Xiang, K.S. (1988), Linkage disequilibrium in the human insulin/insulin-like growth factor II region of human chromosome II, Am. J. Hum. Genet., **42**, 495-501.

Table 1. Comparison of genotypic and allelic distributions of the –491 AT, –427 TC, Th1/E47cs and *APOE* ε2/ε3/ε4 polymorphisms between cases and controls in the ECTIM study.

Table 2. Impact of the *APOE* locus polymorphisms (OR, 95% confidence interval) on the occurrence of myocardial infarction.

BMI: Body Mass Index; LDL-C: Low Density Lipoprotein Cholesterol.

Table 3. Effect of the Th1/E47cs genotypes on APOE plasma levels stratified on *APOE* ε2/ε3/ε4 genotypes, in controls.

Tests were performed on log transformed values and adjusted on age, body mass index, centre, tobacco and alcohol consumption. Subjects treated by hypolipidemic drugs were excluded.

Table 1.

		Genotypes			p	Alleles		p
-491 AT		AA	AT	TT		A	T	
Cases	n	404 (0.71)	150 (0.27)	13 (0.02)		958 (0.85)	176 (0.15)	
Controls	n	456 (0.67)	201 (0.30)	21 (0.03)	NS	1113 (0.82)	243 (0.18)	NS
-427 TC		TT	TC	CC		T	C	
Cases	n	460 (0.81)	100 (0.18)	7 (0.01)		1020 (0.90)	114 (0.10)	
Controls	n	549 (0.81)	125 (0.18)	4 (0.01)	NS	1223 (0.90)	133 (0.10)	NS
Th1/E47cs		GG	GT	TT		G	T	
Cases	n	148 (0.26)	270 (0.48)	149 (0.26)		566 (0.50)	568 (0.50)	
Controls	n %	216 (0.32)	324 (0.48)	138 (0.20)	<0.02	756 (0.56)	600 (0.44)	<0.004
***APOE* ε4**		εX εX	εX ε4	ε4 ε4		εX	ε4	
Cases	n	402 (0.71)	147 (0.26)	18 (0.03)		951 (0.84)	183 (0.16)	
Controls	n	524 (0.77)	141 (0.21)	13 (0.02)	<0.03	1189 (0.88)	167 (0.12)	<0.007
***APOE* ε2**		εX εX	εX ε2	ε2 ε2		εX	ε2	
Cases	n	497 (0.87)	67 (0.12)	3 (0.01)		1061 (0.94)	73 (0.06)	
Controls	n	571 (0.84)	103 (0.15)	4 (0.01)	NS	1245 (0.92)	111 (0.08)	NS

Table 2.

Adjustments	-491 T	-427 C	Th1/E47cs T	*APOE* ε4	*APOE* ε2
None	0.84 [0.68-1.04] NS	1.03 [0.79-1.34] NS	**1.25[1.07-1.47]** p<0.005	**1.35 [1.08-1.69]** p<0.008	0.77 [0.57-1.05] NS
Age, centre, BMI, LDL-C, alcohol and tobacco consumption	0.88 [0.70-1.10] NS	1.03 [0.77-1.37] NS	**1.29 [1.09-1.52]** p<0.003	**1.39 [1.10-1.76]** p<0.007	0.74 [0.53-1.04] NS
Age, centre, BMI, LDL-C, alcohol and tobacco consumption and other *APOE* locus polymorphisms	0.93 [0.73-1.20] NS	1.03 [0.76-1.39] NS	**1.23 [1.03-1.47]** p<0.02	**1.30 [1.02-1.65]** p<0.04	0.87 [0.60-1.28] NS

Table 3.

APOE (mg/dl) Mean (SD)		GENOTYPES GG	GT	TT	p
Total		4.9±1.8	4.7±1.7	4.1±1.5	0.0001
	n	159	236	109	
Stratification on APOE genotype					
ε2ε2		10.1±1.1	-	-	-
	n	3			
ε2ε3		6.3±1.7	6.4±2.1	6.3±2.1	
	n	33	36	3	ns
ε3ε3		4.5±1.4	4.6±1.6	4.2±1.4	
	n	131	174	89	0.12
ε3ε4		4.3±2.0	4.1±1.4	3.9±1.2	
	n	15	56	23	ns
ε4ε4		-	5.4±0.5	3.1±1.7	
	n		2	8	ns

Discussion et Conclusion.

Discussion et Conclusion.

Nos différents résultats suggèrent donc que la quantité d'APOE est un important déterminant de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, en reprenant l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'impact de l'isoforme APOE4 pourrait être modulé en fonction de la quantité de cette isoforme produite. Cette quantité d'APOE dépendrait de mutations dans le promoteur du gène, le polymorphisme Th1/E47cs constituant un bon candidat.

Cependant, de nombreuses interrogations sont soulevées par cette hypothèse, que ce soit en amont ou en aval de ce mécanisme.

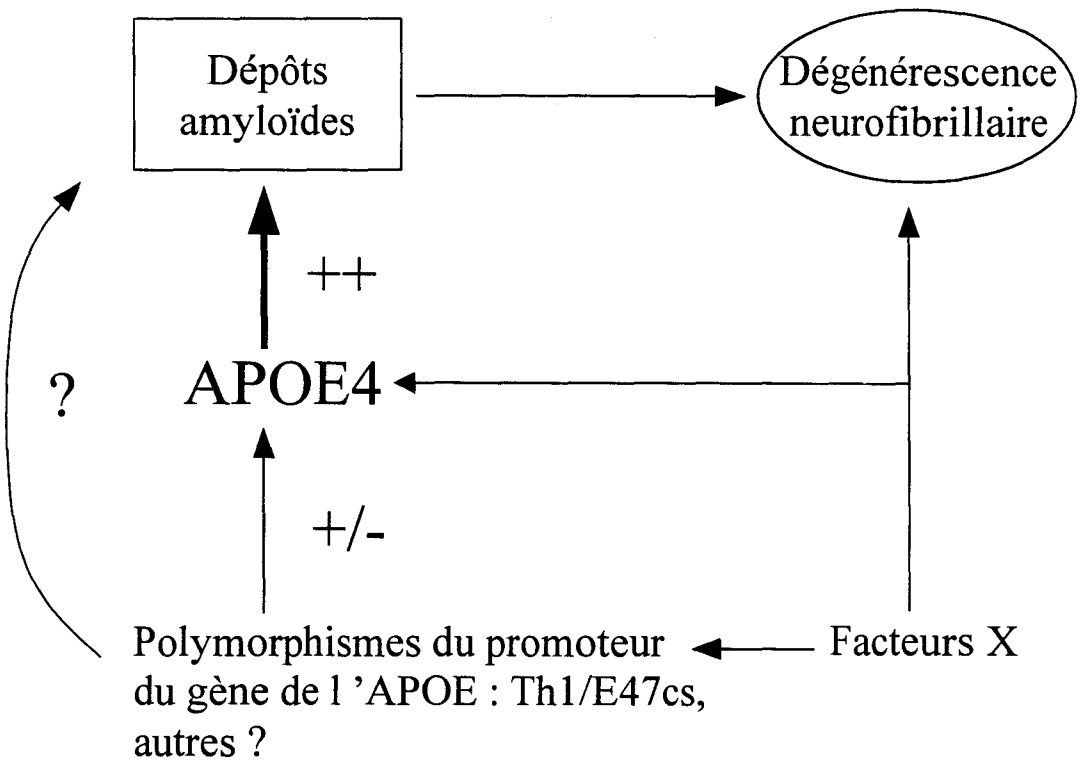


Figure 18 : Impact du gène de l'APOE sur la formation des dépôts amyloïdes : hypothèses et interrogation sur le rôle de l'expression de ce gène dans ce mécanisme.

Augmentation ou diminution de la production d'APOE ?

Nous avons décrit une augmentation relative de la quantité d'ARNm issu de l'allèle ε4 par rapport à l'allèle ε3 dans le cerveau des patients comparés à celles des témoins. Cependant, nous n'avons pas déterminé s'il s'agissait (i) d'une augmentation totale de production d'APOE et donc préférentiellement due à l'allèle ε4, ou (ii) au contraire d'une diminution de cette production majoritairement due à l'allèle ε3.

Cette information est essentielle à obtenir car elle permettrait probablement de choisir, entre les hypothèses décrites, celle se rapprochant le plus du mécanisme pathologique réel. A ce jour, seules deux études ont montré une augmentation de la quantité d'ARNm dans le cerveau des patients par rapport aux malades (481,482), données cohérentes avec une surexpression de ce gène suite à une lésion cérébrale (647). Cependant, au niveau protéique, une seule étude a été réalisée dans le tissu cérébral et ne montre aucune différence entre patients et malades (648). Quant à la quantification d'APOE dans le LCR, les résultats sont très contradictoires en fonction des études (649-651).

Impact du polymorphisme Th1/E47cs sur le niveau d'expression du gène de l'APOE ?

L'étude de l'impact du polymorphisme Th1/E47cs pourrait aider à déterminer si une diminution ou une augmentation de la quantité d'APOE est délétère. En effet, nous avons montré que l'allèle T de ce polymorphisme était associé à une augmentation de la formation des dépôts amyloïdes, principalement sous la forme $A\beta_{1-42(43)}$. Or, la concentration plasmatique en APOE est diminuée en fonction du nombre d'allèles T dans l'étude ECTIM. Ces résultats pourraient suggérer qu'une synthèse moins importante d'APOE pourrait conduire à la formation de plaques. Ceci serait alors en accord avec l'hypothèse décrite dans le

paragraphe 6.7.1.2., soit l'APOE inhibitrice de l'amyloïdogénèse. La quantité d'APOE serait donc un déterminant essentiel de l'élimination du peptide $A\beta_{1-42(43)}$, une quantité importante d'APOE limitant alors la nucléation du peptide. L'étude de souris transgéniques humanisées pour l'APP^{I717V} et l'APOE, semble soutenir cette hypothèse (490).

Cependant, rien ne suppose pour l'instant que le polymorphisme Th1/E47cs ait les mêmes effets dans le tissu hépatique et le tissu cérébral. De même, il est tout à fait envisageable que son impact puisse être différent dans un tissu sain ou un tissu pathologique. Il est intéressant de noter que les études d'haplotypes suggèrent que la combinaison de l'allèle ε4 et de l'allèle T de Th1/E47cs est plus souvent présente chez les malades par rapport aux témoins. Or si dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'allèle T est aussi associé à une diminution de synthèse de l'APOE, ceci reviendrait à dire que produire moins d'APOE4 par rapport à l'APOE3, est délétère. Cette hypothèse serait donc en contradiction avec l'effet délétère propre de l'allèle ε4 par rapport à l'allèle ε3 (voir paragraphe 6.7.). Par contre, une augmentation de synthèse de l'APOE, accentuée par l'allèle T, rendrait compte des différences des fréquences haplotypiques estimées.

Quels mécanismes contrôlent l'expression du gène de l'APOE au niveau du processus pathologique ?

La connaissance des mécanismes contrôlant l'expression du gène de l'APOE au cours du processus pathologique permettrait probablement de lever une ambiguïté importante sur les questions précédemment posées. Puisque l'hypothèse d'une réponse inflammatoire chronique induisant un stress oxydatif a été proposée comme un mécanisme pathologique possible pour la maladie d'Alzheimer (paragraphe 4.5 et 6.7.3.), nous avons cherché à déterminer comment l'expression de l'APOE pouvait être modulée suite à un tel stress sur la lignée de

neuroblastome Kelly, de génotype ε3/ε4 (Annexe pour méthodologie).

Cette étude préliminaire semble indiquer qu'un stress oxydatif induit une surexpression du gène de l'APOE et préférentiellement de l'allèle ε4. De plus, cette augmentation en quantité d'ARNm de l'APOE se traduirait par un accroissement en quantité de la protéine correspondante (Figure 19). Cette surproduction d'APOE semblerait devancer la mort cellulaire, probablement due à une apoptose.

Outre le fait que ces données préliminaires suggèrent que l'APOE est produite afin de prendre en charge un stress oxydatif (520), ces résultats sembleraient indiquer que ce stress oxydatif est capable d'induire une expression préférentielle de l'allèle ε4 par rapport à l'allèle ε3. Cette observation est donc à mettre en rapport avec ce qui peut être observé dans le cerveau des malades par rapport aux témoins. Cependant, même si ces données semblent soutenir l'hypothèse d'une augmentation de l'expression de l'APOE dans le tissu cérébral suite à un événement X, celles-ci ne permettent pas d'affirmer que cet événement ait lieu au cours du processus pathologique et soit en partie responsable du développement de la maladie.

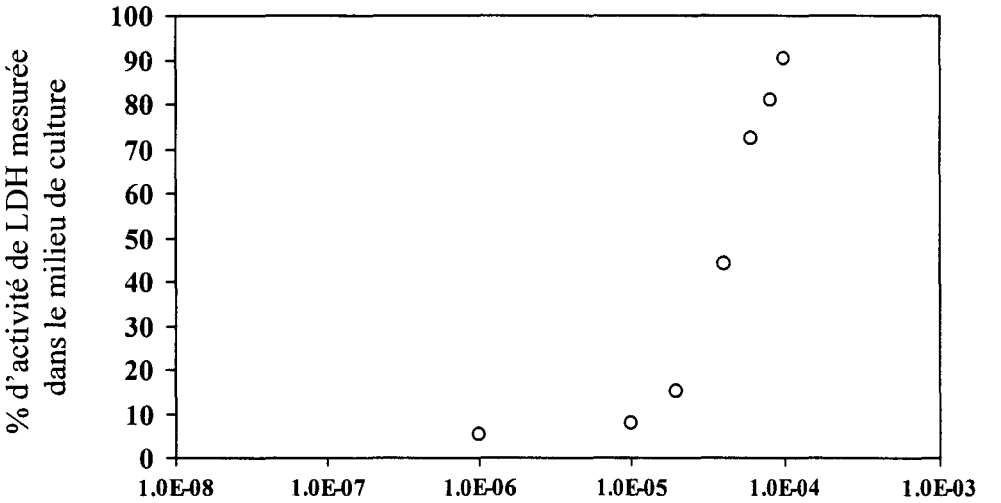
Perspectives.

Notre travail sur l'expression du gène de l'APOE a conduit à proposer qu'une variabilité de l'expression de ce gène pouvait induire une susceptibilité génétique différente en fonction du niveau d'expression. Cette hétérogénéité serait en partie due à des mutations dans le promoteur, la fréquence de celles-ci variant probablement d'un groupe ethnique à un autre (636,642,652). Le polymorphisme Th1/E47cs serait en partie responsable de cette hétérogénéité, mais d'autres mutations doivent probablement interagir avec ce polymorphisme.

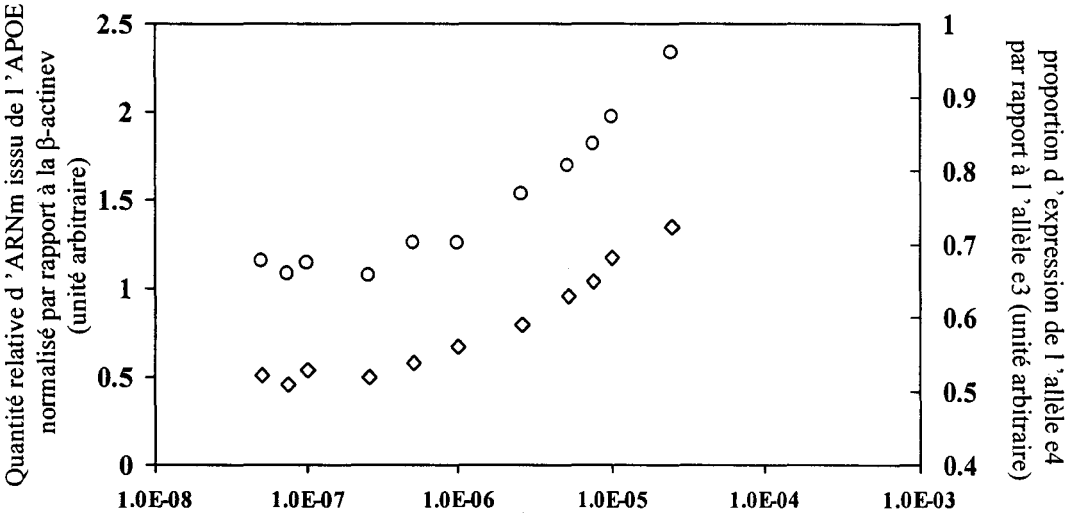
Récemment, 121 polymorphismes ont été décrit dans le locus contenant le gène de

Figure 19: *Exposition des neuroblastomes Kelly à une concentration croissante en H_2O_2.* **(a)** Pourcentage de mort cellulaire mesuré par libération de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture. **(b)** Impact du stress oxidatif sur le niveau d'expression de l'APOE et estimation de la proportion des ARNm dus à l'allèle ε4. Mesures réalisées par RT-PCR suivant la méthode décrite précédemment **(c)** Production de protéines APOE mesurée par western-blot avec l'utilisation de l'anticorps anti-APOE monoclonal E01.

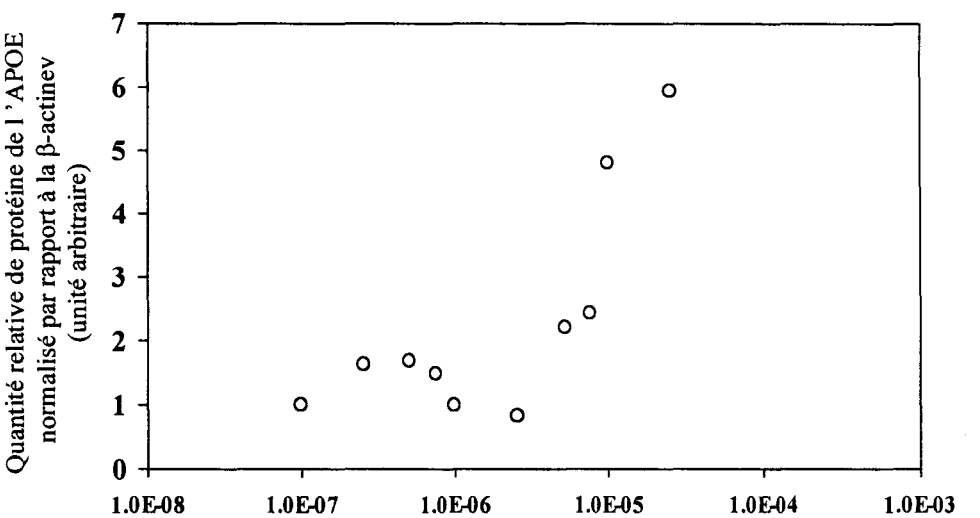
a



b



c



Concentration en H_2O_2 (M)

l'APOE (653). Par ailleurs, le polymorphisme *Hpa* I du gène de l'APOCI situé dans le même cluster de gène que l'APOE a été décrit associé au risque de développer la maladie d'Alzheimer (654), et à une modification de l'expression du gène de l'APOE (652). Ainsi, le niveau d'expression observable est donc probablement complexe à appréhender, en fonction du patrimoine génétique des individus. La difficulté principale sera alors de déterminer les risques encourus pour chacune des combinaisons haplotypiques possibles.

Au niveau du mécanisme de la pathologie, l'étude la plus importante est probablement la mesure du niveau d'expression absolu de l'APOE. Ce travail est d'ailleurs, en cours de réalisation en collaboration avec le Dr. Tony Wyss Coray (Université de San Diego, USA). Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre le rôle de l'expression du gène de l'APOE dans le processus pathologique. Ce niveau d'expression pourra alors être corrélé à la quantité de dépôts amyloïdes, permettant ainsi de déterminer l'impact de la quantité d'APOE sur la formation de ces dépôts. La continuité de ce travail consistera alors à caractériser les facteurs contrôlant l'expression du gène de l'APOE, susceptibles d'être impliqué dans le processus pathologique, approche que nous avons commencé à développer au cours de cette thèse. L'intérêt de la compréhension de ces mécanismes peut être double : (i) Contrôler l'expression de l'APOE à des fins thérapeutiques. (ii) Tester de nouveaux gènes candidats impliqués dans la modulation de l'expression du gène de l'APOE.

D'AUTRES DETERMINANTS GENETIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ?

Impact du gène du LRP sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer.

Présentation du travail.

Le deuxième gène candidat situé sur le chromosome 12 et impliqué dans le métabolisme de l'APOE est le gène du *LRP*. Dès 1997, des polymorphismes connus de ce gène ont été testés dans des études cas-témoins. Ainsi, l'allèle de 87pb d'un polymorphisme en 5' UTR du gène du *LRP*, a-t-il été décrit comme augmentant le risque de développer la maladie d'Alzheimer (545), tandis qu'une autre étude peu après, montrait au contraire un effet protecteur de cet allèle (655). Durant la même période, Kang *et al.* ont rapporté l'association d'un polymorphisme silencieux de l'exon 3 du *LRP* avec des formes familiales tardives de la maladie d'Alzheimer (619).

Présentation du travail.

Les deux polymorphismes décrits ci-dessus ont été testés dans notre population cas-témoins. Nous avons alors observé que l'allèle T du polymorphisme de l'exon 3 présentait un effet protecteur, ou que le génotype CC était associé à une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer principalement pour les formes tardives de la pathologie. Nous avons ainsi étendu les résultats de Kang et al., aux formes sporadiques tardives de la maladie.

Concernant le polymorphisme de répétition en 5' UTR du gène de l'*APOE*, nous avons trouvé un effet délétère de l'allèle de 91 pb, cet effet étant de nouveau plus marqué pour les formes tardives de la pathologie.

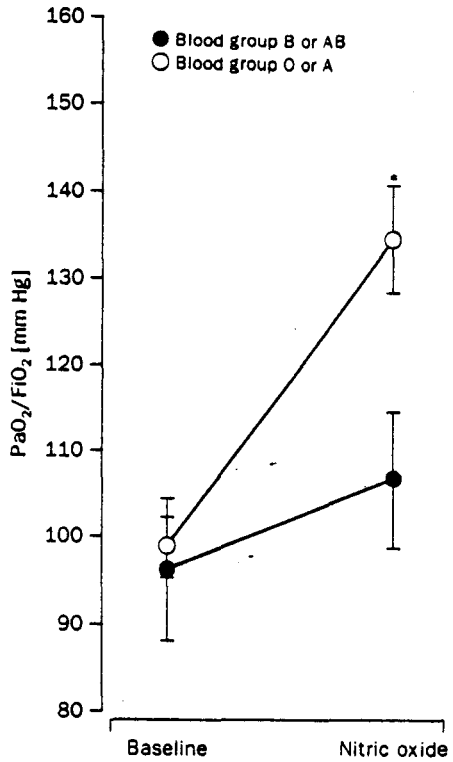
Ces résultats suggérent donc que le locus du *LRP* est impliqué dans les formes tardives de la maladie d'Alzheimer. Cependant il était peu probable que ces deux polymorphismes puissent avoir un effet physiologique. En collaboration avec l'équipe du Pr. John Hardy

(Mayo clinic, USA) et l'équipe du Pr. Fred Van Leuven (Université de Van Leuven, Belgique), le gène du *LRP* a été séquencé chez 12 patients. Une seule mutation codante a alors été trouvée provoquant le changement d'une alanine (allèle C) en valine (allèle T) au codon 216. La fréquence de cet allèle dans la population témoin est faible (2,6%). Cependant, un effet protecteur peut être observé pour les individus porteurs d'au moins un allèle T.

Discussion.

L'étude séparée de trois polymorphismes localisés dans le locus du *LRP*, montrent une association systématique de ces polymorphismes avec la maladie d'Alzheimer dans notre population, l'impact de ceux-ci étant cependant relativement faible. Par ailleurs, même si l'association du tétranucléotide est controversée (656-658), l'association du polymorphisme de l'exon 3 avec l'affection a été récemment confirmée par une méta-analyse (659).

Ces deux polymorphismes ne semblent pas fonctionnels, suggérant qu'ils puissent être en déséquilibre de liaison avec un autre variant génétique dans le locus du *LRP*, localisé par exemple dans le promoteur de ce gène. Néanmoins, nos résultats semblent indiquer que le gène du *LRP* ne serait qu'un déterminant mineur du risque de développer une forme sporadique tardive de la maladie d'Alzheimer.



PaO_2/FiO_2 ratio during nitric-oxide inhalation
Data are mean (SE). *p=0·03.

nitric oxide was measured as the percentage increase in PaO_2/FiO_2 ($\Delta PaO_2/FiO_2$). If more than one nitric-oxide dose was inhaled, the largest $\Delta PaO_2/FiO_2$ was recorded. Patients with a $\Delta PaO_2/FiO_2$ 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 ($\Delta PaO_2/FiO_2$ 13 [4]%, n=27) compared with patients without genotype B who express blood group O or A ($\Delta PaO_2/FiO_2$ 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.

1 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.
2 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.
3 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.
4 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.
5 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 ε4 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 endocystosis 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 disequlibrium 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 colleagues[4] (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 ε4 allele (2·2 [1·3–3·7], p=0·006), than in people without an ε4 allele (1·5 [1·0–2·3], p-0·080), despite the lack of significance of the statistical interaction.

Kang and colleagues[4] 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 disequlibrium 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,[3] 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 CJF 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 literature[2] 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 "feming".[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 (≥100 000 amps) which rise in μs 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):

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

Where μ_o=magnetic permeability of air $4\pi(10^{-7})$ Webers/A·m I_p=peak current (amps). R=distance from the lightning stoke (m).
For a distance of 1·0 m, $B_p=2(10^{-1})$ 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 μs, electrical impedance of cardiac-cell membranes is due almost entirely to the membrane capacitance (Cm) which is on the order of 0·01 F/m², the change in membrane potential (ΔVm) is

$$\Delta Vm=\frac{J(\Delta t)}{Cm}$$

For J=1000 A/m², and the duration of the current pulse, $\Delta t=10^{-6}$ s, predicts a ΔVm 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 Forens 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 Dius 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**

Neurogenetics (1999) 2:109–113
DOI 10.007/s100489900061

BU LILLE I

Original article

Is the LDL receptor-related protein involved in Alzheimer's disease?

Jean C. Lambert · Marie C. Chartier-Harlin · Dominique Cottel · Florence Richard Eric Neuman · David Guez · Sylvie Legrain · Claudine Berr · Philippe Amouyel Nicole Helbecque

Received: October 29, 1998 / Accepted: December 30, 1998 / Published online: March 11, 1999

ABSTRACT

LDL-related protein receptor (LRP) is the main receptor in the brain for apolipoprotein E. Moreover, the *LRP* gene is located on chromosome 12, the site of a potential Alzheimer's disease (AD) locus. We explored the association between the *LRP* gene and AD in 600 French Caucasian patients (37.8% men, mean age 72.0 ± 8.0 years, mean age at onset 68.7 ± 8.1 years) and age-matched controls ($n = 646$, 37.0% men, mean age 72.5 ± 8.2 years) and observed an association between a (TTTC) repeat at the 3' end of an *Alu* sequence in the *LRP* gene and the risk of developing AD. Three alleles were detected in this population [corresponding to 83, 87, and 91 base pairs (bp)], the 91-bp allele being associated with an increased risk of developing AD [all patients: odds ratio (OR) 1.6, $P < 0.01$; late-onset AD: OR 1.8, $P < 0.01$]. This suggests an association between the *LRP* locus and AD. However, in the light of studies related to the exon *3 LRP* polymorphism and given the low strength of the association reported here, a biologically active variant may exist on chromosome 12, either in the *LRP* gene itself or in another gene in the vicinity.

J.C. Lambert · M.C. Chartier-Harlin · D. Cottel · F. Richard
P. Amouyel (✉) · N. Helbecque
Service d'Epidémiologie et de Santé Publique – INSERM U.508, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, F-59019 Lille Cedex, France
Tel.: (33)-3-20 87 77 10; Fax: (33)-3-20 87 78 94;
email: philippe.amouyel@pasteur-lille-fr

E. Neuman · D. Guez
IRIServier, 6 place des Pléiades, F-92415 Courbevoie Cedex, France

S. Legrain
Hôpital P. Brousse, 12 avenue Paul Vaillant Couturier, F-94807 Villejuif Cedex, France

C. Berr
INSERM U.360, Hôpital de la Salpétrière, F-75651 Paris Cedex, France

Key words Alzheimer disease · LDL-related protein receptor · Polymorphism · Population study

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia among the elderly. The age at onset allows classification of patients into early (before 65 years) and late-onset (after 65 years) AD. Previous studies have shown an influence of genetic factors (amyloid-β precursor protein [1], presenilin-1 [2], and presenilin-2 [3, 4] genes) on the age at onset of the disease. In particular, the $\varepsilon 4$ allele of the apolipoprotein E (*APOE*) gene acts in a dose-related manner [5] to decrease age at onset of AD. At present, the *APOE* $\varepsilon 4$ allele is the most frequently identified genetic risk factor for AD, accounting for about 40%–50% of late-onset cases.

The mechanism of this association is not fully understood. In the brain, apoE is proposed to function as a ligand stimulating cholesterol and/or lipid utilization in neurons [6]. Its main receptor in the brain is the LDL receptor-related protein (LRP) [7], which is also a possible amyloid precursor protein receptor [8]. The *LRP* gene is located on chromosome 12, a susceptibility locus implicated in AD [9, 10]. Hence we investigated the association between a previously described tetranucleotide polymorphism and AD in a European population. The reported polymorphism involves a $(TTTC)_n$ repeat, and four different alleles have been described to date [11, 12] corresponding to 83, 87, 91, and 95 base pairs (bp) (the 87- and 91-bp being the most frequent). An association between the 87-bp allele and late-onset AD has been reported in an American population [13], but other studies were not able to find any association [14–17]. A preliminary study from our laboratory on a small number of Caucasians [18] showed a tendency for the 87-bp allele to be protective. In order to clarify this controversy, we undertook this study of a large European population.

PATIENTS AND METHODS

The study comprised 600 French Caucasian AD patients recruited in hospitals (227 men/373 women, mean age 72.0±8.0 years, mean age at onset 68.7±8.1 years). All patients were thoroughly investigated clinically. The diagnosis of AD was made according to the DSM-III-R [19] criteria and NINCDS-ADRDA [20]. None of the subjects had a family history of AD consistent with mendelian inheritance. Caucasian controls of similar ages ($n=646$, 239 men/407 women, mean age 72.5±8.2 years) were recruited in France and defined as subjects without DSM-III-R dementia criteria and with integrity of their cognitive functions. Each individual or their relatives signed an informed consent.

Genotyping

Genomic DNA was prepared from white blood cells as described earlier [21]. DNA samples were genotyped for the *LRP* gene $(TTTC)_n$ polymorphism as described by Zuliani and Hobbs [11]. The *APOE* genotypes were determined using the *Hha I* restriction polymorphism [22].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the SAS software release 6.10 (SAS Institute, Cary, N.C., USA). Means and standard deviations were calculated for quantitative variables. Categorical data were tested using Pearson's, χ^2, or Fisher exact test when necessary. Multivariate logistic regression models were used to explore the effects of the *LRP* polymorphism on AD risk. *LRP* alleles were coded as a binary variable (1 when at least one allele was present in the genotype and 0 otherwise). The covariates taken into account were age, gender, and *APOE* status (presence or absence of at least one *APOE ε4* allele). Statistical interactions between *LRP* genotype and covariates were systematically explored. Adjusted odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were estimated from this multivariate analysis. Given the number of tests, significant levels were set at $P<0.01$.

RESULTS

The study population consisted of 600 sporadic AD patients (227 men/373 women) and 646 controls (239 men/407 women) of similar ages (AD 72.0±8.0 years, controls 72.5±8.2 years). The distribution of the *LRP* genotype and allele frequencies in AD and controls are shown in Table 1. The genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium and were similar in men and women. Three alleles (*83*, *87*, and *91*) were present in this sample. Similar frequencies of the *87/91* genotype (the most frequent) were observed in the AD and control groups (47.0% for AD, 45.7% for controls). The second most-frequent genotype was the *91/91* genotype for both groups (40.3% for AD, 35.0% for controls), while the *87/87* genotype was under-represented (11.7% for AD, 16.5% for controls). A statistically significant difference ($P=0.0032$) – due to an increase in *LRP* homozygote *91/91* genotype frequency (Table 2) – was observed between cases and controls for allele distributions. In AD patients, the *LRP 91* allele distribution showed a tendency to increase with age (age <65 years 60.1%, 65≤ age<75 years 63.5%, 75 years ≤ age 66.8%; test for trend NS) and with age at onset (onset <65 years 62.0%, 65 ≤ onset <75 years 64.6%, 75 years ≤ onset 65.8%; test for trend NS). In controls, a weak tendency for the same allele to decrease in frequency with age was observed (age <65 years 63.2%, 65 ≤ age <75 years 58.4%, 75 years ≤ age 59.5%).

Table 1 Gentoype and allele frequencies of a polymorphism in the *LRP* gene (*AD* Alzheimer's disease)

Genotype*	AD cases ($n=600$)	Controls ($n=646$)
83/87	1 (0.002)	4 (0.006)
83/91	5 (0.008)	14 (0.022)
87/87	70 (0.117)	107 (0.165)
87/91	282 (0.470)	295 (0.457)
91/91	242 (0.403)	226 (0.350)

* $P=0.0098$, Fisher exact test

Allele*	AD cases	Controls
83	6 (0.005)	18 (0.014)
87	423 (0.353)	513 (0.397)
91	771 (0.642)	761 (0.589)

* $P=0.0032$, Fisher exact test

Table 2 Distribution of genotype frequencies according to the presence of the *91*-base pair allele

Gentoype*	*XX*	*91/X*	*91/91*
AD cases ($n=600$)	71 (0.119)	287 (0.478)	242 (0.403)
Controls ($n=646$)	111 (0.172)	309 (0.478)	226 (0.350)

* $P=0.014$ (cases vs. controls)

We estimated the relative risk of developing AD (expressed as OR) conferred by the presence of the *LRP* allele *87* or *91*, adjusting for age, gender, and *APOE* status. Using a multivariate logistic regression model, the adjusted OR for developing AD when bearing at least one *LRP* allele *91* was 1.6 (95% CI 1.1–2.2, $P<0.01$). No statistically significant interaction between the *LRP* allele *91* and *APOE* status was detected, suggesting a homogeneous effect of the *LRP* allele *91* in patients with or without an *APOE ε4* allele. We further explored this effect by stratifying our population according to *APOE ε4* status. In the group of *ε4* bearers ($n=348$ AD, 134 controls), the OR was 1.4 (95% CI 0.8–2.4, $P=0.28$), while in *ε4* non-bearers ($n=252$ AD, 508 controls) it was 1.7 (95% CI 1.1–2.7, $P=0.022$). No significant association was found between the presence of at least one *LRP* allele *87* and the disease, although this allele did exhibit a tendency to be protective (OR=0.8), probably due to the balance of allele frequencies. If we compared only late-onset patients (≥65 years) ($n=434$, age 75.5±5.5 years, age at onset 72.5±5.4 years) with age-matched controls ($n=455$, age 74.3±7.2 years), the presence of the *LRP* allele *91* remained deleterious ($P<0.01$,

OR = 1.8, 95% CI 1.2–2.8) after adjustment. There was no effect of the *LRP* allele *91* in early onset patients (< 65 years) ($n = 166$, age 62.8 ± 5.9 years, age at onset 58.5 ± 4.4 years) compared with age-matched controls ($n = 168$, age 65.1 ± 1.3 years). In all cases, the presence of at least one *APOE ε4* allele was a risk factor (all patients: $P < 0.0001$, OR = 5.2, 95% CI 4.1–6.7; early onset: $P < 0.0001$, OR = 5.8, 95% CI 3.7–9.2; late-onset: $P < 0.0001$, OR = 5.8, 95% CI 4.2–7.9) for developing AD.

DISCUSSION

This study of 600 French Caucasian AD patients and 646 age-matched controls of similar origin demonstrated that the presence of at least one *LRP* allele *91* was associated with an increased risk of developing AD, although at least one *APOE ε4* allele was the main risk factor. Although no significant interaction between the *LRP* genotype and age was detected in this population, the deleterious effect of at least one *LRP 91* allele was detected in late-onset but not in early onset patients.

The observed genotype and allele frequencies were similar to those previously published for American [11–14, 16, 17] and European [18] controls, except for an American population [15] where the non-Caucasian origin of 35% of the subjects may explain the difference. The observed genotype and allele frequencies were similar among the different AD populations studied, except for the American patients in the study of Lendon et al. [13] and for the familial AD patients in the study of Scott et al. [16]. In both studies there was a higher frequency of the *87/87* genotype in AD patients; this might be associated with a tendency to develop vascular disease [23]. In our population, an increase in the frequency of the 91-bp allele was observed for AD patients, due to an increase in subjects homozygous for this allele compared with controls. A preliminary and independent study conducted in our laboratory on older sporadic AD patients ($n = 144$) gave similar results [18]. Although differences in allele frequencies between studies cannot be due to ethnic background (all populations were of Caucasian origin), there are at least two possible explanations: (1) the American population described by Lendon et al. [13] consisted of individuals having one or more affected first-degree relatives (35% of patients, 20% of controls) and the subgroup studied by Scott et al. [16] consisted of familial cases, while our patients were all sporadic cases; (2) the TTTC repeat polymorphism is probably a nucleotide variation in linkage disequilibrium with biologically relevant variability elsewhere in the gene; thus different TTTC alleles may be in disequilibrium in different populations. Finally, age does not seem to be responsible for the discrepancy. Although the patients described here are younger and have an earlier age at onset than the American populations, similar results were obtained with our previous sample which was older and had a later age at onset than the American sample.

Because the *APOE ε4* allele has been found to be the main risk factor for AD to date, it is likely that genes coding for apoE receptors could also be implicated [14]. The present study shows an association between the 91-bp allele of the *LRP* gene and AD in a large sample of Europeans, whatever their *APOE* status. Indeed there is no statistical association of the *APOE ε4* allele and the *LRP 91* allele. The ORs were almost similar in *ε4* allele bearers and non-bearers, suggesting that LRP may have an independent effect on AD risk. However, because the TTTC repeat is a non-functional polymorphism likely in linkage disequilibrium with a biologically active variant, we cannot exclude that this variant may interact with the *APOE* allele.

This study suggests that other proteins involved in apoE metabolism, in particular apoE receptors, may be involved in AD. There are several biological and genetic observations implicating LRP in AD. Firstly, this receptor was found in senile plaques, tangles, and dystrophic neurites of AD patients. LRP mediates neuronal cell growth which is dependent on the apoE isoforms [24]. Secondly, this receptor has been shown to bind the β-amyloid precursor protein [8], whose cleavage product Aβ peptide accumulates in the senile plaques of AD patients. Thirdly, two [25, 26] of three [27] linkage studies have shown association between the disease and a genomic region close to the *LRP* locus. The absence of linkage to this locus observed by Wu et al. [27] does not definitely exclude *LRP* as a candidate gene for late-onset AD [27]. Moreover, another silent polymorphism (C766T) located in exon *3* of *LRP* has been associated with late-onset AD in this population [28], and in many [17, 29–31], but not all [32], case-control studies. Considering only sporadic AD cases, the level of association between the *LRP CC* genotype and AD (OR 1.5–2.0 according to the different studies) was similar to the association reported here between the *91*-bp allele and AD (OR 1.6). However, both polymorphisms were in linkage equilibrium in this population, as already observed in Americans [17]. The association reported here suggests that the *LRP* gene may explain part of the genetic susceptibility to AD.

However, given the relatively low strength of the association (similar to that reported for the exon *3* polymorphism) and the apparent non-functionality of the polymorphism itself, a biologically active variant may exist elsewhere in the *LRP* gene itself or in another gene in the vicinity. This observation reinforces the hypothesis of a genetic susceptibility factor located on chromosome 12, a locus estimated to be involved in 10%–15% of AD cases. Genetic variation in the α_2-macroglobulin gene has been reported to be associated with a higher AD risk [33, 34]. However, other studies reporting strong association(s) due to potential functional changes in the protein, as suggested by Rosenthal and Schwartz [35], may further implicate this chro-

27. Wu WS, Holmans P, Wavrant-DeVrièze 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
28. Lambert JC, Wavrant-De Vrièze F, Amouyel P, Chartier-Harlin MC (1998) Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease. Lancet 351:1787–1788
29. Kang D, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen L, Thomas R, Thal L, 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
30. Hollenbach E, Ackermann S, Hyman B, Rebeck G (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
31. Baum L, Chen L, Ng HK, Chan YS, Mak YT, Woo J, Chiu HF, Pang CP (1998) Low density lipoprotein receptor related protein gene exon 3 polymorphism association with Alzheimer's disease in Chinese. Neurosci Lett 247:33–36
32. Woodward R, Singleton A, Gibson A, Edwardson J, Morris C (1998) LRP gene and late-onset Alzheimer's disease. Lancet 352:239–240
33. Liao A, Nitsch RM, Greenberg SM, Finckh U, Blacker D, Albert M, Rebeck GW, Gomez-Isla T, Clatworthy A, Binetti G, Hock C, Mueller-Thomsen T, Mann U, Zuchowski K, Beisiegel U, Staehelin H, Growdon JH, Tanzi RE, Hyman BT (1998) Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. Hum Mol Genet 7:1953–1956
34. 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
35. Rosenthal N, Schwartz RS (1998) In search of perverse polymorphisms. N Engl J Med 338:122–124

Hum Genet (1999) 104:432–434

SHORT REPORT

Fabienne Wavrant-DeVrièze · Jean-Charles Lambert
Lou Stas · Richard Crook · Dominique Cottel
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 candidate 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 α2 macroglobulin (α2M; 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 promotor 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. Cottel · 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)

	LRP tetranucleotide		
Sample	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	CACCAGAAGGGCACCGTT	18 mers
Exon 51S	TCTCTCCTGTCCTTCCCA	18 mers
Exon 52-53S	ACTCCACCCCACACACAGA	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	GGGAGACATTGAGGCTTGGCA	21 mers
Exon 60R	CAGTGTATGGCTCCCCTC	18 mers
Exon 66S	GGGAGATGACACGGAAGCAG	20 mers
Exon 61R	GTCTGAACCCTGCCTCTTTTAG	22 mers
Exon 68R	ATGGAGTGGGATGGGTGA	18 mers
Exon 69S	TGACCTCTCCCCAAACCCT	19 mers
Exon 74-75S	AGGGCATCCACTCTCTGT	18 mers
Exon 84R	AGGGCTCTCCATAGGTTG	18 mers
Exon 86-88S	GCTTCACCCAGGCATAG	17 mers
Exon 88R	TCCCCTATCTCGTCCTCAG	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 *Apa*I 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 *Apa*I 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-DeVrièze 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-DeVrièze 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-DeVrièze 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, Motuslsky 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-DeVrièze 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-DeVrièze 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

Impact du gène de l'α2-macroglobuline sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer.

Présentation du travail.

Les résultats obtenus sur le locus de l'APOE suggèrent donc que le métabolisme de l'APOE est un déterminant important de l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. Ainsi comme nous l'avons précédemment indiqué, des gènes impliqués dans ce métabolisme sont susceptibles d'être des gènes candidats intéressants pour la maladie d'Alzheimer.

Récemment Blacker *et al.* ont décrit qu'une délétion situé dans le site d'épissage en 5' de l'exon 18 de l'α2M, était associée à une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer dans une étude de paires de germains (629), résultats confortés par l'association d'un autre polymorphisme de l'*α2M* (Ile1000Val) avec la maladie d'Alzheimer dans une étude cas-témoins (630) (paragraphe 7.1.1.2.).

Présentation des résultats.

Nous avons testé ces deux polymorphismes dans notre population cas-témoins et regroupé ces données dans le cadre d'une étude collaboratrice regroupant les populations des équipes du Pr. John Hardy (Mayo Clinic, USA), du Pr. Alison Goate (Université de Washingthon, USA) et Pr. Mike Owen (Universté de Cardiff, Abgleterre). Ces deux polymorphismes ont été étudiés dans une population de paires de germains dont un certain nombre sont commun à l'étude de Blacker *et al.*

L'étude en population cas-témoins, comprenant plus de 1000 patients et témoins, ne permet pas de mettre en évidence une association des deux polymorphismes avec la maladie d'Alzheimer, malgré la puissance statistique de l'étude. Cependant l'étude des paires de germains permet de confirmer l'implication du locus de l'A2M dans les formes familiales tardives de la maladie d'Alzheimer, même si les effets mesurés sont moindres par rapport à

ceux décrit par Blacker *et al.* Toutefois, les deux études de paires de germains ne sont pas indépendantes.

Discussion.

Nos résultats semblent exclure l'implication du gène de l'*α2M* dans les formes sporadiques tardives de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, à ce jour, aucune étude y compris la nôtre, n'a pu montrer d'association entre la pathologie et la délétion de l'intron 17 (660-662). Aucune modification de l'épissage ou de la quantité de l'α2M n'a pu être corrélée à la présence de la délétion, ces résultats semblant exclure définitivement un impact de ce polymorphisme sur l'étiologie de la pathologie (661).

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′–TTCTCTCATAAGCTTTATCTGTATG–3′; AmaR, 5′–AAGTACTTTCGTACGGTCTCCG–3′). These gave products of 138 bp (wild-type) and 133 bp (deletion), which corresponded with alleles determined using the previous method[2].

We compared frequencies of carriers for at least one **2* allele with wild-type homozygotes[2] 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 study[2] (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 previously[2] 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 studies[2] 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. Dow[1], Nicola Lindsey[1], Nigel J. Cairns[2], Carol Brayne[3], Damian Robinson[3], Felicia A. Huppert[4], Eugene S. Paykel[4], John Xuereb[5], Gordon Wilcock[6], Joanne L. Whittaker[1] & David C. Rubinsztein[1,7]

[1]Department of Medical Genetics, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QQ, UK. [2]Medical Research Council Brain Bank, Department of Neuropathology, Institute of Psychiatry, London, De Crespigny Park, London, SE5 8AF, UK. [3]Institute of Public Health, University Forvie Site, Robinson Way, Cambridge, CB2 2SR, UK. Departments of [4]Psychiatry and [5]Pathology, Cambridge University, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QQ, UK. [6]Day Hospital Laboratory, Department of Care of the Elderly, University of Bristol, Frenchay Hospital, Bristol, BS16, 1LE, UK. [7]Department 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).

1. Heston, L.L in *The Genetic Basis of Common Diseases* (eds King, R.A. *et al.*) 792–800 (Oxford University Press, New York, 1992).
2. Blacker, D. *et al. Nature Genet.* **19**, 357–360 (1998).
3. Tysoe, C. *et al. Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **9**, 191–198 (1998).
4. The Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study *Psychol. Med.* **28**, 319–335 (1998).
5. 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*) *ε4* 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≥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 method[3] 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

© 1999 Nature America Inc. • http://genetics.nature.com

Table 1 • Association between *A2M* and AD

Research centre	Sample descriptions	Summary statistics			
		Whole samples **2/*2* and **1/*2* versus **1/*1*	*APOE*E4–* **2/*2* and **1/*2* versus **1/*1*	Whole sample allele **2/*1*	*APOE*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 colleagues[1] 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 evidence[5] 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 criterion[4] for suggestive linkage but was the second highest score obtained in our genome scan and was observed in 68 *APOE*E4*-negative families[6]. 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 *APOE*E4* status

	Whole sample			*E4+			*E4–		
UK: Cardiff	**1/*1*	**1/*2*	**2/*2*	**1/*1*	**1/*2*	**2/*2*	**1/*1*	**1/*2*	**2/*2*
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%)

© 1999 Nature America Inc. • http://genetics.nature.com

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 originally[1]. 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 Kehoe[1], Richard Crook[2], Philippe Amouyel[3], William Wu[4], Frances Rice[1], Jordi Pérez-Tur[2], Bernard Frigard[3], John C. Morris[4], Stephanie Carty[1], Ronald Petersen[5], Dominique Cottel[3], Nigel Tunstall[6], Peter Holmans[1,4], Simon Lovestone[6], Marie-Christine Chartier-Harlin[3], Alison Goate[4], John Hardy[2], Michael J. Owen[1] & Julie Williams[1]

[*]These authors contributed equally to this work.
[1]Department of Psychological Medicine, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff, CF14 4XN. [2]Birdsall Building, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, Florida 32084, USA. [3]CJF 95-05 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cedex, France. [4]Departments of Neurology, Psychiatry and Genetics, Washington University School of Medicine, 4940 Children's Place, St. Louis, Missouri 63110, USA. [5]Department of Neurology, Mayo Clinic Rochester, Rochester, Minnesota 55905, USA. [6]Section 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 test[1] (SDT) and sib transmission-disequilibrium test[5] (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 method[6]. 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" method[1] 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 set[1], but we investigated an overlapping set of 143 NIMH sibships that met the same selection criteria[1]. 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 splicing[8]. 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. 1*a*).

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

ELSEVIER

Neuroscience Letters 262 (1999) 137–139

Neuroscience Letters

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

Fabienne Wavrant-DeVrièze[a,1], Varuni Rudrasingham[b,1], Jean-Charles Lambert[c,1], Sumi Chakraverty[1d], 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,*]

[a]*Birdsall Building, Mayo Clinic Jacksonville, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL32084 USA*
[b]*Neuropsychiatric Genetics Unit, Tenovus Building, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff, CF4 4XN, UK*
[c]*CJF 95-05 INSERM, Institut Pasteur de Lille, 1, Rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cedex, France*
[d]*Departments of Neurology, Psychiatry and Genetics, Washington University School of Medicine, 4940 Children's Place, St. Louis, MO 63110, USA*
[e]*Section of Old Age Psychiatry, Institute of Psychiatry, De Crespigny Park, London, SE5 8AF, UK*
[f]*Department 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 α2-macroglobulin gene is a genetic risk factor for Alzheimer's disease. Here we have both tested a common polymorphism in the gene (000V) for association with the disease in a four-site case control study design, and tested the locus for linkage in a large seri s 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; α2-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 α2 macroglobulin (α2M) gene. LRP is the predominant receptor for ApoE in the brain [14] and α2M 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 α2M 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 α2M 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.

0304-3940/99/$ - see front matter © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.
PII: S0304-3940(99)00035-X

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 α2M locus is not a risk factor locus for AD. The two simplest explanations are that the original report of an involvement of α2M 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 α2 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 –		
A2M	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	1.78	0.01
	($P = 0.1$)	($P = 0.12$)	($P = 0.5$)
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 α2M is not a locus of major effect in AD, though it remains possible that there are protective alleles of α2M 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., Beisegel, U., Staehlin, H., Growdon, J.H., Tanzi, R.E. and Hyman, B.T., Genetic association of an α2-macroglobulin (Val1001le) 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., Klobeck, G. and Olek, K., Cloning of the alpha 2-macroglogulin 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-macroglogulin (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., Serneels, L., Overbergh, L., Torrekens, S., Moechars, D., De Stomner, 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.

CONCLUSION GENERALE.

CONCLUSION GENERALE.

La génétique de la maladie d'Alzheimer commence à être bien comprise pour les formes familiales précoces de cette affection. En revanche, les données concernant les formes sporadiques de la maladie sont encore très ambiguës, nécessitant la prise en compte de nouveau facteurs environnementaux et/ou génétiques. Ainsi, plus d'une dizaine de gènes ont été proposés comme influençant le développement de la maladie, la plupart de ces locus étant controversé. Seul le gène de l'APOE a été admis dans toutes les études comme un facteur de risque majeur des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer. Cependant, un certain nombre d'arguments pourrait remettre en question l'impact réel de l'allèle ε4 : (i) Le fait de posséder une copie de l'allèle ε4 n'est pas suffisant pour développer la maladie. (ii) La maladie d'Alzheimer est développée fréquemment chez les individus non porteurs de l'allèle ε4. (iii) Il n'y a aucune preuve directe que les populations avec une forte fréquence de l'allèle ε4, présentent une plus forte incidence de la pathologie. (iv) L'impact de cet allèle varie en fonction des ethnies étudiées. (v) Les expériences *in vitro* tendant à déterminer un impact sur l'étiologie de la maladie, sont multiples et ambiguës.

En fait, ces différents points semblent soutenir la nécéssité d'une réévaluation de l'impact de l'allèle ε4 et du locus de l'APOE dans la maladie d'Alzheimer : Cet effet peut-il être surestimé ? En effet, la découverte de plusieurs polymorphismes en déséquilibre de liaison important ou total avec l'allèle ε4, pourrait suggérer qu'une partie (ou peut-être la totalité) de l'association de l'allèle ε4 avec la maladie d'Alzheimer serait due à ces déséquilibres de liaison. Cette hypothèse permettrait entre autre de comprendre les différences observées entre les ethnies, les haplotypes obtenus en utilisant ces polymoprhismes pouvant être très différents. La combinaison des allèles APOC1-2 et ε4 dans une population caucasienne est systématique, tandis que cette combinaison ne représente que 45% des

haplotypes dans une population de Pygmés africains (663),. Le facteur de risque pourrait ne pas être le gène de l'APOE, mais un déterminant inconnu dont on observe l'existence par l'intermédiaire des déséquilibres de liaisons. Par exemple, un certain pourcentage des chromosomes présentant l'haplotype ε4/APOC1-2 possédrait le vrai facteur de risque, diluant ainsi l'association observée avec l'allèle ε4 en fonction de la fréquence de cet haplotype. De même, les individus sans allèle ε4 peuvent aussi posséder ce facteur de risque, expliquant l'incidence de la maladie chez ces individus. En conséquence, dans certaines populations, l'allèle ε4 ne serait pas associé à la maladie d'Alzheimer.

Même s'il peut être envisagé qu'un autre gène du locus de l'APOE puisse être responsable de la pathologie, nos résultats semblent plutôt suggérer que l'impact de l'allèle ε4 est modulé en fonction de polymorphismes contrôlant son expression. Ces données permettraient ainsi d'expliquer la variabilité de l'association de l'allèle ε4 avec la maladie d'Alzheimer, en fonction des ethnies. L'impact de cet allèle dépendra alors des différents haplotypes regroupant les polymorphismes susceptibles de moduler l'expression du gène. Par ailleurs, le niveau d'expression de l'APOE pourrait être un déterminant indépendant des isoformes de l'APOE. Nous avons ainsi, pu observer que dans notre population de sujets portant le génotype ε3/ε3, la distribution des haplotypes estimés à partir des polymorphismes Th1/E47cs et 1E1 était significativement différent entre les populations de malades et de témoins. De plus, l'analyse combinée de ces polymorphismes par régression logistique multivariée dans cette sous population ε3/ε3 montre que l'allèle T de Th1/E47cs et l'allèle C de 1E1 sont associés, respectivement, à une augmentation et une diminution du risque de développer la maladie d'Alzheimer (données non présentées).

Ainsi, ces différents résultats permettent de poser une nouvelle hypothèse selon laquelle le niveau d'expression de l'APOE serait le déterminant responsable du développement de la pathologie. Cet impact accentuerait alors les propriétés des différentes isoformes de l'APOE,

en favorisant l'expression d'un allèle par rapport à un autre en fonction des différentes combinaisons haplotypiques possibles. Mais, en raison des importants déséquilibres de liaison existant entre les polymorphismes du locus de l'*APOE*, seule la connaissance des haplotypes permettra de mieux comprendre le rôle de l'expression de l'*APOE* dans le developpement de la maladie. De plus, le fait que l'impact de l'allèle ε4 serait surestimé mais que celui de l'APOE, à travers son expression, serait sous-estimé, pourrait permettre de redéfinir l'importance du rôle de l'APOE.

Dans cette optique, il est intéressant de voir que les deux gènes jusqu'à présent proposés comme gène candidat sur le chromosome 12: le *LRP* et l'*α2M*, sont directement impliqués dans le métabolisme de l'APOE. Ainsi, même si nos résulats semblent exclure l'implication de l'*α2M* pour la maladie d'Alzheimer, le gène du LRP pourrait être un déterminant génétique mineur de la pathologie.

Bien que l'existence d'un gène situé sur le chromosome 12, ne semble plus remise en cause, celui-ci n'a pas encore été découvert et de nombreux travaux semblent donc nécessaires. Cependant, il est intéressant de remarquer que nous avons pu détecter une interaction significative (p=0,002) entre l'allèle 91 du polymorphisme de répétition de 4 nucléotides situé en amont du gène du *LRP* et l'allèle T du polymorphisme Th1/E47cs. Un gène à proximité du gène du *LRP*, pourrait alors être impliqué dans le développement de la maladie d'Alzheimer, en modulant l'expression du gène de l'APOE. Si cette hypothèse s'avérait juste, le niveau d'expression du gène de l'APOE apparaitrait alors comme un déterminant essentiel du développement de la maladie d'Alzheimer, ouvrant donc sur de très nombreuses perspectives de recherches.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

1. Launer LJ, Brayne C, Breteler MM. Epidemiologic approach to the study of dementing diseases: a nested case-control study in European incidence studies of dementia. *Neuroepidemiology.* 1992; **11 Suppl 1:114-8**: 114-118.

2. Hofman A, Rocca WA, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Cooper B, Copeland JR, Dartigues JF, da Silva D, Hagnell O. The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980- 1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group. *Int. J. Epidemiol.* 1991; **20**: 736-748.

3. Breteler MM, Claus JJ, van Duijn CM, Launer LJ, Hofman A. Epidemiology of Alzheimer's disease. *Epidemiol. Rev.* 1992; **14:59-82**: 59-82.

4. Ritchie K and Kildea D. Is senile dementia "age-related" or "ageing-related"?--evidence from meta-analysis of dementia prevalence in the oldest old. *Lancet* 1995; **346**: 931-934.

5. Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JC. *APOE* genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 1998; **19**: 321-322.

6. Breitner JC, Welsh KA, Gau BA, McDonald WM, Steffens DC, Saunders AM, Magruder KM, Helms MJ, Plassman BL, Folstein MF. Alzheimer's disease in the National Academy of Sciences-National Research Council Registry of Aging Twin Veterans. III. Detection of cases, longitudinal results, and observations on twin concordance. *Arch. Neurol.* 1995; **52**: 763-771.

7. Nee LE, Eldridge R, Sunderland T, Thomas CB, Katz D, Thompson KE, Weingartner H, Weiss H, Julian C, Cohen R. Dementia of the Alzheimer type: clinical and family study of 22 twin pairs. *Neurology* 1987; **37**: 359-363.

8. Gatz M, Pedersen NL, Berg S, Johansson B, Johansson K, Mortimer JA, Posner SF, Viitanen M, Winblad B, Ahlbom A. Heritability for Alzheimer's disease: the study of dementia in Swedish twins. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 1997; **52**: M117-M125

9. Bergem AL. Heredity in dementia of the Alzheimer type. *Clin. Genet.* 1994; **46**: 144-149.

10. Raiha I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. Alzheimer's disease in Finnish twins. *Lancet* 1996; **347**: 573-578.

11. Hunter R, Dayan AD, Wilson J. Alzheimer's disease in one monozygotic twin. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1972; **35**: 707-710.

12. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; **34**: 939-944.

13. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975; **12**: 189-198.

14. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br. J. Psychiatry* 1968; **114**: 797-811.

15. Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T. The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am. J. Psychiatry* 1982; **139**: 1136-1139.

16. Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du BG, McAllister VL, Marshall J, Russell RW, Symon L. Cerebral blood flow in dementia. *Arch. Neurol.* 1975; **32**: 632-637.

17. Moroney JT, Bagiella E, Desmond DW, Hachinski VC, Molsa PK, Gustafson L, Brun A, Fischer P, Erkinjuntti T, Rosen W, Paik MC, Tatemichi TK. Meta-analysis of the Hachinski Ischemic Score in pathologically verified dementias. *Neurology* 1997; **49**: 1096-1105.

18. Hof PR, Bouras C, Perl DP, Sparks DL, Mehta N, Morrison JH. Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with Down's syndrome. Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 1995; **52**: 379-391.

19. Hof PR, Charpiot A, Delacourte A, Buee L, Purohit D, Perl DP, Bouras C. Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci. Lett.* 1992; **139**: 10-14.

20. Vermersch P, David JP, Frigard B, Fallet-Bianco C, Wattez A, Petit H, Delacourte A. Cortical mapping of Alzheimer pathology in brains of aged non-demented subjects. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1995; **19**: 1035-1047.

21. Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 1981; **10**: 184-192.

22. Mountjoy CQ, Tomlinson BE, Gibson PH. Amyloid and senile plaques and cerebral blood vessels. A semi- quantitative investigation of a possible relationship. *J. Neurol. Sci.* 1982; **57**: 89-103.

23. Masliah E, Hansen L, Albright T, Mallory M, Terry RD. Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1991; **81**: 428-433.

24. Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA. Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 1991; **138** : 235-246.

25. Mandybur TI and Chuirazzi CC. Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. *Neurology* 1990; **40**: 635-639.

26. David JP, Fallet-Bianco C, Vermersch P, Frigard B, Di Menza C, Delacourte A. Normal cerebral aging: study of glial reaction. *C. R. Acad. Sci. III.* 1994; **317**: 749-753.

27. Kalaria RN. Microglia and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Hematol.* 1999; **6**: 15-24.

28. Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1997; **94**: 1-5.

29. Sasaki A, Yamaguchi H, Ogawa A, Sugihara S, Nakazato Y. Microglial activation in early stages of amyloid beta protein deposition. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1997; **94**: 316-322.

30. Uchihara T, Duyckaerts C, He Y, Kobayashi K, Seilhean D, Amouyel P, Hauw JJ. ApoE immunoreactivity and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Neurosci. Lett.* 1995; **195**: 5-8.

31. Tomimoto H, Akiguchi I, Suenaga T, Nishimura M, Wakita H, Nakamura S, Kimura J. Alterations of the blood-brain barrier and glial cells in white-matter lesions in cerebrovascular and Alzheimer's disease patients [see comments]. *Stroke* 1996; **27**: 2069-2074.

32. Rossor MN, Iversen LL, Johnson AJ, Mountjoy CQ, Roth M. Cholinergic deficit in frontal cerebral cortex in Alzheimer's disease is age dependent [letter]. *Lancet* 1981; **2**: 1422

33. Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, Perl DP, Schmeidler J, Kanof P, Davis KL. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J. Neurochem.* 1995; **64**: 749-760.

34. Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M. Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia. *Neurology* 1982; **32**: 164-168.

35. Mann DM and Yates PO. Patterns of sleep and the noradrenergic neurotransmitter system in the elderly and the demented [letter]. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1983; **31**: 450-451.

36. Herregodts P, Bruyland M, De Keyser J, Solheid C, Michotte Y, Ebinger G. Monoaminergic neurotransmitters in Alzheimer's disease. An HPLC study comparing presenile familial and sporadic senile cases. *J. Neurol. Sci.* 1989; **92**: 101-116.

37. Cross AJ, Crow TJ, Johnson JA, Joseph MH, Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Monoamine metabolism in senile dementia of Alzheimer type. *J. Neurol. Sci.* 1983; **60**: 383-392.

38. Arai H, Kosaka K, Iizuka R. Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. *J. Neurochem.* 1984; **43**: 388-393.

39. Ebinger G, Bruyland M, Martin JJ, Herregodts P, Cras P, Michotte Y, Gomme L. Distribution of biogenic amines and their catabolites in brains from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 1987; **77**: 267-283.

40. Olney JW. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* 1989; **26**: 505-525.

41. Procter AW, Lowe SL, Palmer AM, Francis PT, Esiri MM, Stratmann GC, Najlerahim A, Patel AJ, Hunt A, Bowen DM. Topographical distribution of neurochemical changes in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 1988; **84**: 125-140.

42. Pomara N, Singh R, Deptula D, Chou JC, Schwartz MB, LeWitt PA. Glutamate and other CSF amino acids in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 1992; **149**: 251-254.

43. Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M, Meregalli S, Piolti R, Tamma F, Frattola L. Cerebrospinal fluid levels of diazepam-binding inhibitor in neurodegenerative disorders with dementia. *Neurology* 1990; **40**: 632-635.

44. Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 1963; **197**: 192-193.

45. Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 1985; **17**: 89-96.

46. Delacourte A and Defossez A. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 1986; **76**: 173-186.

47. Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Fried VA, Smith HT, Wisniewski HM. Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Res.* 1991; **539**: 11-18.

48. Kosik KS, Duffy LK, Dowling MM, Abraham C, McCluskey A, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984; **81**: 7941-7945.

49. Vickers JC, Riederer BM, Marugg RA, Buee-Scherrer V, Buee L, Delacourte A, Morrison JH. Alterations in neurofilament protein immunoreactivity in human hippocampal neurons related to normal aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1994; **62**: 1-13.

50. Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 1991; **541**: 163-166.

51. Arnold S, Hyman B, Flory J, Damasio A, Van Hoesen G. The topological and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral cortex* 1991; **1**: 103-116.

52. Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH. Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J. Neurosci.* 1987; **7**: 1799-1808.

53. Hof PR, Cox K, Morrison JH. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J. Comp. Neurol.* 1990; **301**: 44-54.

54. Hof PR and Morrison JH. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. Primary and secondary visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 1990; **301**: 55-64.

55. Braak H and Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1991; **82**: 239-259.

56. Bouras C, Hof PR, Morrison JH. Neurofibrillary tangle densities in the hippocampal formation in a non- demented population define subgroups of patients with differential early pathologic changes. *Neurosci. Lett.* 1993; **153**: 131-135.

57. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. 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.* 1986; **387**: 271-280.

58. Georgieff IS, Liem RK, Mellado W, Nunez J, Shelanski ML. High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system. *J. Cell Sci.* 1991; **100**: 55-60.

59. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; **3**: 519-526.

60. Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992; **31**: 10626-10633.

61. Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 1989; **2**: 1389-1397.

62. Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Soling HD, Drechsel D, Kirschner MW. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca2(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *EMBO J.* 1990; **9**: 3539-3544.

63. Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. 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.* 1988; **85**: 4051-4055.

64. Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y. Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J. Cell Biol.* 1996; **132**: 667-679.

65. Chene P, Mazarguil H, Wright M. Microtubule assembly protects the region 28-38 of the beta-tubulin subunit. *Cell Motil. Cytoskeleton* 1992; **22**: 25-37.

66. Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 1994; **13**: 989-1002.

67. Garver TD, Harris KA, Lehman RA, Lee VM, Trojanowski JQ, Billingsley ML. Tau phosphorylation in human, primate, and rat brain: evidence that a pool of tau is highly phosphorylated in vivo and is rapidly dephosphorylated in vitro. *J. Neurochem.* 1994; **63**: 2279-2287.

68. Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DY, Lee M, Hart GW. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O- linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 28741-28744.

69. Haltiwanger RS, Busby S, Grove K, Li S, Mason D, Medina L, Moloney D, Philipsberg G, Scartozzi R. O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; **231**: 237-242.

70. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1975; **72**: 1858-1862.

71. Butner KA and Kirschner MW. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.* 1991; **115**: 717-730.

72. Lee G and Rook SL. Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J. Cell Sci.* 1992; **102**: 227-237.

73. Goode BL and Feinstein SC. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J. Cell Biol.* 1994; **124**: 769-782.

74. Drubin D, Kobayashi S, Kirschner M. Association of tau protein with microtubules in living cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986; **466:257-68**: 257-268.

75. Mori A, Aizawa H, Saido TC, Kawasaki H, Mizuno K, Murofushi H, Suzuki K, Sakai H. Site-specific phosphorylation by protein kinase C inhibits assembly- promoting activity of microtubule-associated protein 4. *Biochemistry* 1991; **30**: 9341-9346.

76. Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* 1992; **11**: 2131-2138.

77. Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992; **89**: 1983-1987.

78. Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule- associated protein tau. *FEBS Lett.* 1992; **314**: 315-321.

79. Singh TJ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Non-proline-dependent protein kinases phosphorylate several sites found in tau from Alzheimer disease brain. *Mol. Cell Biochem.* 1996; **154**: 143-151.

80. Yamamoto H, Saitoh Y, Yasugawa S, Miyamoto E. Dephosphorylation of tau factor by protein phosphatase 2A in synaptosomal cytosol fractions, and inhibition by aluminum. *J. Neurochem.* 1990; **55**: 683-690.

81. Billingsley ML and Kincaid RL. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem. J.* 1997; **323**: 577-591.

82. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986; **83**: 4913-4917.

83. Flament S and Delacourte A. Abnormal tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS Lett.* 1989; **247**: 213-216.

84. Sergeant N, David JP, Goedert M, Jakes R, Vermersch P, Buee L, Lefranc D, Wattez A, Delacourte A. Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. *J. Neurochem.* 1997; **69**: 834-844.

85. Sergeant N, Bussiere T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A. Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport.* 1995; **6**: 2217-2220.

86. Hoffmann R, Lee VY, Leight S, Varga I, Otvos LJ. Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* 1997; **36**: 8114-8124.

87. Jakes R, Novak M, Davison M, Wischik CM. Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J.* 1991; **10**: 2725-2729.

88. Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule- associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; **92**: 8463-8467.

89. Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P. Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat. Med.* 1995; **1**: 693-699.

90. Ledesma MD, Perez M, Colaco C, Avila J. Tau glycation is involved in aggregation of the protein but not in the formation of filaments. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le. -grand.)* 1998; **44**: 1111-1116.

91. Ko L, Ko EC, Nacharaju P, Liu WK, Chang E, Kenessey A, Yen SH. An immunochemical study on tau glycation in paired helical filaments [In Process Citation]. *Brain Res.* 1999; **830**: 301-313.

92. Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, Gauvreau D, Robitaille Y. Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann. Neurol.* 1998; **43**: 193-204.

93. Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 1995; **14**: 879-888.

94. Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci. Lett.* 1996; **203**: 33-36.

95. Glenner GG and Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; **120**: 885-890.

96. Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.* 1984; **2**: 357-369.

97. Benzinger TL, Gregory DM, Burkoth TS, Miller-Auer H, Lynn DG, Botto RE, Meredith SC. Propagating structure of Alzheimer's beta-amyloid(10-35) is parallel beta-sheet with residues in exact register. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; **95**: 13407-13412.

98. Fraser PE, Levesque L, McLachlan DR. Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. *Clin. Biochem.* 1993; **26**: 339-349.

99. Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, DeMaster E, Allen CJ, Stimson ER, Maggio JE. Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J. Neurochem.* 1993; **61**: 1171-1174.

100. Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, Paradis M, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE. Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc [see comments]. *Science* 1994; **265**: 1464-1467.

101. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993; **90**: 1977-1981.

102. Wyss-Coray T, Masliah E, Mallory M, McConlogue L, Johnson-Wood K, Lin C, Mucke L. Amyloidogenic role of cytokine TGF-beta1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease. *Nature* 1997; **389**: 603-606.

103. Ma J, Yee A, Brewer HBJ, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments [see comments]. *Nature* 1994; **372**: 92-94.

104. Tagliavini F, Giaccone G, Frangione B, Bugiani O. Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci. Lett.* 1988; **93**: 191-196.

105. Davies CA and Mann DM. Is the "preamyloid" of diffuse plaques in Alzheimer's disease really nonfibrillar? [see comments]. *Am. J. Pathol.* 1993; **143**: 1594-1605.

106. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end- specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 1994; **13**: 45-53.

107. Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol. Dis.* 1996; **3**: 16-32.

108. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 1987; **235**: 880-884.

109. Lemaire HG, Salbaum JM, Multhaup G, Kang J, Bayney RM, Unterbeck A, Beyreuther K, Muller-Hill B. The PreA4(695) precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic. Acids. Res.* 1989; **17**: 517-522.

110. Jacobsen JS, Muenkel HA, Blume AJ, Vitek MP. A novel species-specific RNA related to alternatively spliced amyloid precursor protein mRNAs. *Neurobiol. Aging* 1991; **12**: 575-583.

111. Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 1988; **331**: 530-532.

112. Konig G, Monning U, Czech C, Prior R, Banati R, Schreiter-Gasser U, Bauer J, Masters CL, Beyreuther K. 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.* 1992; **267**: 10804-10809.

113. Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992; **89**: 10758-10762.

114. Sprecher CA, Grant FJ, Grimm G, O'Hara PJ, Norris F, Norris K, Foster DC. Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* 1993; **32**: 4481-4486.

115. Bahmanyar S, Higgins GA, Goldgaber D, Lewis DA, Morrison JH, Wilson MC, Shankar SK, Gajdusek DC. Localization of amyloid beta protein messenger RNA in brains from patients with Alzheimer's disease. *Science* 1987; **237**: 77-80.

116. Schmechel DE, Goldgaber D, Burkhart DS, Gilbert JR, Gajdusek DC, Roses AD. Cellular localization of messenger RNA encoding amyloid-beta-protein in normal tissue and in Alzheimer disease. *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.* 1988; **2**: 96-111.

117. Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 1510-1517.

118. Konig G, Salbaum JM, Wiestler O, Lang W, Schmitt HP, Masters CL, Beyreuther K. Alternative splicing of the beta A4 amyloid gene of Alzheimer's disease in cortex of control and Alzheimer's disease patients. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1991; **9**: 259-262.

119. Schubert D, LaCorbiere M, Saitoh T, Cole G. Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989; **86**: 2066-2069.

120. Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989; **57**: 115-126.

121. Oltersdorf T, Ward PJ, Henriksson T, Beattie EC, Neve R, Lieberburg I, Fritz LC. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 4492-4497.

122. Saito F, Yanagisawa K, Miyatake T. Soluble derivatives of beta/A4 amyloid protein precursor in human cerebrospinal fluid are both N- and O-glycosylated. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1993; **19**: 171-174.

123. Yazaki M, Tagawa K, Maruyama K, Sorimachi H, Tsuchiya T, Ishiura S, Suzuki K. Mutation of potential N-linked glycosylation sites in the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP). *Neurosci. Lett.* 1996; **221**: 57-60.

124. Sambamurti K, Refolo LM, Shioi J, Pappolla MA, Robakis NK. The Alzheimer's amyloid

precursor is cleaved intracellularly in the trans-Golgi network or in a post-Golgi compartment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992; **674:118-28**: 118-128.

125. Ikezu T, Trapp BD, Song KS, Schlegel A, Lisanti MP, Okamoto T. Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 10485-10495.

126. Sisodia SS. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992; **89**: 6075-6079.

127. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 3021-3024.

128. Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 1995; **14**: 661-670.

129. Paganetti PA, Lis M, Klafki HW, Staufenbiel M. Amyloid precursor protein truncated at any of the gamma-secretase sites is not cleaved to beta-amyloid. *J. Neurosci. Res.* 1996; **46**: 283-293.

130. Anderson AJ, Pike CJ, Cotman CW. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by beta-amyloid (A beta): association of c-Jun with A beta- induced apoptosis. *J. Neurochem.* 1995; **65**: 1487-1498.

131. Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 1992; **357**: 500-503.

132. Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 1992; **258**: 126-129.

133. Peraus GC, Masters CL, Beyreuther K. Late compartments of amyloid precursor protein transport in SY5Y cells are involved in beta-amyloid secretion. *J. Neurosci.* 1997; **17**: 7714-7724.

134. Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* 1997; **3**: 1016-1020.

135. Tomita S, Kirino Y, Suzuki T. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 6277-6284.

136. Estus S, Golde TE, Kunishita T, Blades D, Lowery D, Eisen M, Usiak M, Qu XM, Tabira T, Greenberg BD. Potentially amyloidogenic, carboxyl-terminal derivatives of the amyloid protein precursor [see comments]. *Science* 1992; **255**: 726-728.

137. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids [see comments]. *Nature* 1992; **359**: 325-327.

138. Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993; **90**: 10836-10840.

139. Iwatsubo T, Mann DM, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. Amyloid beta protein (A beta) deposition:

A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome [see comments]. *Ann. Neurol.* 1995; **37**: 294-299.

140. Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 1995; **14**: 457-466.

141. Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; **301**: 41-52.

142. Tischer E and Cordell B. Beta-amyloid precursor protein. Location of transmembrane domain and specificity of gamma-secretase cleavage. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 21914-21919.

143. Higaki J, Quon D, Zhong Z, Cordell B. Inhibition of beta-amyloid formation identifies proteolytic precursors and subcellular site of catabolism. *Neuron* 1995; **14**: 651-659.

144. Citron M, Diehl TS, Gordon G, Biere AL, Seubert P, Selkoe DJ. 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.* 1996; **93**: 13170-13175.

145. Figueiredo-Pereira ME, Efthimiopoulos S, Tezapsidis N, Buku A, Ghiso J, Mehta P, Robakis NK. Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1- 42, respectively. *J. Neurochem.* 1999; **72**: 1417-1422.

146. Lichtenthaler SF, Wang R, Grimm H, Uljon SN, Masters CL, Beyreuther K. 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.* 1999; **96**: 3053-3058.

147. Tjernberg LO, Naslund J, Thyberg J, Gandy SE, Terenius L, Nordstedt C. Generation of Alzheimer amyloid beta peptide through nonspecific proteolysis. *J. Biol. Chem.* 1997; **272** : 1870-1875.

148. Nitsch RM, Slack BE, Farber SA, Schulz JG, Deng M, Kim C, Borghesani PR, Korver W, Wurtman RJ, Growdon JH. Regulation of proteolytic processing of the amyloid beta-protein precursor of Alzheimer's disease in transfected cell lines and in brain slices. *J. Neural Transm. Suppl.* 1994; **44:21-7**: 21-27.

149. Checler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1995; **65**: 1431-1444.

150. Dyrks T, Monning U, Beyreuther K, Turner J. Amyloid precursor protein secretion and beta A4 amyloid generation are not mutually exclusive. *FEBS Lett.* 1994; **349**: 210-214.

151. Buxbaum JD, Ruefli AA, Parker CA, Cypess AM, Greengard P. Calcium regulates processing of the Alzheimer amyloid protein precursor in a protein kinase C-independent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; **91**: 4489-4493.

152. Lee RK, Wurtman RJ, Cox AJ, Nitsch RM. Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; **92**: 8083-8087.

153. Jolly-Tornetta C, Gao ZY, Lee VM, Wolf BA. Regulation of amyloid precursor protein secretion by glutamate receptors in human Ntera 2 neurons. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 14015-14021.

154. Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE, Greengard P.

Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992; **89**: 10075-10078.

155. Hung AY, Haass C, Nitsch RM, Qiu WQ, Citron M, Wurtman RJ, Growdon JH, Selkoe DJ. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 22959-22962.

156. Mori F, Lai CC, Fusi F, Giacobini E. Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport.* 1995; **6**: 633-636.

157. Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 1992; **258**: 304-307.

158. Nitsch RM, Deng A, Wurtman RJ, Growdon JH. Metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1alpha stimulates the secretion of the amyloid beta-protein precursor ectodomain. *J. Neurochem.* 1997; **69**: 704-712.

159. Racchi M, Ianna P, Binetti G, Trabucchi M, Govoni S. Bradykinin-induced amyloid precursor protein secretion: a protein kinase C-independent mechanism that is not altered in fibroblasts from patients with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem. J.* 1998; **330**: 1271-1275.

160. Jaffe AB, Toran-Allerand CD, Greengard P, Gandy SE. Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 13065-13068.

161. Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzarelli L, Fried G, Jovanovic JN, Seeger M, Relkin NR, Liao F, Checler F, Buxbaum JD, Chait BT, Thinakaran G, Sisodia SS, Wang R, Greengard P, Gandy S. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nat. Med.* 1998; **4**: 447-451.

162. Racchi M, Baetta R, Salvietti N, Ianna P, Franceschini G, Paoletti R, Fumagalli R, Govoni S, Trabucchi M, Soma M. Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content. *Biochem. J.* 1997; **322**: 893-898.

163. Bodovitz S and Klein WL. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 4436-4440.

164. Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, Reaume AG, Lang DM, Hirsch JD, Maeda N, Siman R, Greenberg BD, Scott RW, Flood DG. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta- peptide in brain by cholesterol. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 16576-16582.

165. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; **95**: 6460-6464.

166. Yan L, Wang S, Rafferty SP, Wesley RA, Danner RL. Endogenously produced nitric oxide increases tumor necrosis factor- alpha production in transfected human U937 cells. *Blood* 1997; **90**: 1160-1167.

167. LeBlanc A. Increased production of 4 kDa amyloid beta peptide in serum deprived human primary neuron cultures: possible involvement of apoptosis. *J. Neurosci.* 1995; **15**: 7837-7846.

168. Gasparini L, Racchi M, Benussi L, Curti D, Binetti G, Bianchetti A, Trabucchi M, Govoni S. Effect of energy shortage and oxidative stress on amyloid precursor protein metabolism in COS cells. *Neurosci. Lett.* 1997; **231**: 113-117.

169. Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 1995; **81**: 525-531.

170. Muller U, Cristina N, Li ZW, Wolfer DP, Lipp HP, Rulicke T, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell* 1994; **79**: 755-765.

171. von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, Van der Ploeg LH, Price DL, Sisodia SS. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* 1997; **18**: 661-669.

172. Miyazaki K, Hasegawa M, Funahashi K, Umeda M. A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor [see comments]. *Nature* 1993; **362**: 839-841.

173. Breen KC, Bruce M, Anderton BH. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell- surface adhesion. *J. Neurosci. Res.* 1991; **28**: 90-100.

174. Schubert W, Prior R, Weidemann A, Dircksen H, Multhaup G, Masters CL, Beyreuther K. Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* 1991; **563**: 184-194.

175. Shimokawa M, Yanagisawa K, Nishiye H, Miyatake T. Identification of amyloid precursor protein in synaptic plasma membrane [published erratum appears in Biochem Biophys Res Commun 1994 Jan 14;198(1):409]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; **196**: 240-244.

176. Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, Currie J, Ames D, Weidemann A, Fischer P. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 15977-15983.

177. Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L. Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1997; **23**: 47-61.

178. Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP. Activation of K+ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 1996; **379**: 74-78.

179. Barger SW and Mattson MP. Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1996; **40**: 116-126.

180. Li QX, Whyte S, Tanner JE, Evin G, Beyreuther K, Masters CL. Secretion of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptide by activated human platelets. *Lab. Invest.* 1998; **78**: 461-469.

181. Yankner BA, Caceres A, Duffy LK. Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990; **87**: 9020-9023.

182. Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 1996; **16**: 921-932.

183. Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J. beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; **200**: 710-715.

184. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 1994; **77**: 817-827.

185. Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; **186**: 944-950.

186. Goodman Y and Mattson MP. Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.* 1994; **128**: 1-12.

187. Goodman Y, Steiner MR, Steiner SM, Mattson MP. Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res.* 1994; **654**: 171-176.

188. Selkoe DJ. Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1993; **16**: 403-409.

189. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; **91**: 3270-3274.

190. Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 1999; **38**: 7609-7616.

191. Arispe N, Pollard HB, Rojas E. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993; **90**: 10573-10577.

192. Velazquez P, Cribbs DH, Poulos TL, Tenner AJ. Aspartate residue 7 in amyloid beta-protein is critical for classical complement pathway activation: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Nat. Med.* 1997; **3**: 77-79.

193. Murphy GMJ, Yang L, Cordell B. Macrophage colony-stimulating factor augments beta-amyloid-induced interleukin-1, interleukin-6, and nitric oxide production by microglial cells. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 20967-20971.

194. Cotter RL, Burke WJ, Thomas VS, Potter JF, Zheng J, Gendelman HE. Insights into the neurodegenerative process of Alzheimer's disease: a role for mononuclear phagocyte-associated inflammation and neurotoxicity. *J. Leukoc. Biol.* 1999; **65**: 416-427.

195. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 1992; **12**: 376-389.

196. Mark RJ, Ashford JW, Goodman Y, Mattson MP. Anticonvulsants attenuate amyloid beta-peptide neurotoxicity, Ca2+ deregulation, and cytoskeletal pathology. *Neurobiol. Aging* 1995; **16**: 187-198.

197. Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, Mattson MP. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca2+ homeostasis and cell death. *J. Neurosci.* 1995; **15**: 6239-6249.

198. Harris ME, Carney JM, Cole PS, Hensley K, Howard BJ, Martin L, Bummer P, Wang Y, Pedigo NWJ, Butterfield DA. beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1995; **6**: 1875-1879.

199. Keller JN, Mark RJ, Bruce AJ, Blanc E, Rothstein JD, Uchida K, Waeg G, Mattson MP. 4-

Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* 1997; **80**: 685-696.

200. Mark RJ, Keller JN, Kruman I, Mattson MP. Basic FGF attenuates amyloid beta-peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na+/K+-ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res.* 1997; **756**: 205-214.

201. Barger SW and Mattson MP. The secreted form of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein stimulates a membrane-associated guanylate cyclase. *Biochem. J.* 1995; **311**: 45-47.

202. Barger SW and Mattson MP. Isoform-specific modulation by apolipoprotein E of the activities of secreted beta-amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 1997; **69**: 60-67.

203. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, 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 [see comments]. *Nat. Med.* 1996; **2**: 864-870.

204. Nakamura T, Shoji M, Harigaya Y, Watanabe M, Hosoda K, Cheung TT, Shaffer LM, Golde TE, Younkin LH, Younkin SG. Amyloid beta protein levels in cerebrospinal fluid are elevated in early-onset Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1994; **36**: 903-911.

205. Pirttila T, Kim KS, Mehta PD, Frey H, Wisniewski HM. Soluble amyloid beta-protein in the cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and controls. *J. Neurol. Sci.* 1994; **127**: 90-95.

206. Tabaton M, Nunzi MG, Xue R, Usiak M, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; **200**: 1598-1603.

207. Nitsch RM, Rebeck GW, Deng M, Richardson UI, Tennis M, Schenk DB, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Wurtman RJ, Hyman BT. Cerebrospinal fluid levels of amyloid beta-protein in Alzheimer's disease: inverse correlation with severity of dementia and effect of apolipoprotein E genotype. *Ann. Neurol.* 1995; **37**: 512-518.

208. Lannfelt L, Basun H, Vigo-Pelfrey C, Wahlund LO, Winblad B, Lieberburg I, Schenk D. Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer amyloid precursor protein mutation. *Neurosci. Lett.* 1995; **199**: 203-206.

209. Southwick PC, Yamagata SK, Echols CLJ, Higson GJ, Neynaber SA, Parson RE, Munroe WA. Assessment of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1996; **66**: 259-265.

210. Tamaoka A, Sawamura N, Fukushima T, Shoji S, Matsubara E, Shoji M, Hirai S, Furiya Y, Endoh R, Mori H. Amyloid beta protein 42(43) in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 1997; **148**: 41-45.

211. Kanai M, Matsubara E, Isoe K, Urakami K, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Abe K, Iwatsubo T, Kosaka T, Watanabe M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Mizushima K, Nakamura T, Igeta Y, Ikeda Y, Amari M, Kawarabayashi T, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K, Okamoto K, Hirai S, Shoji M. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan [see comments]. *Ann. Neurol.* 1998; **44**: 17-26.

212. Galasko D. Cerebrospinal fluid levels of A beta 42 and tau: potential markers of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 1998; **53:209-21**: 209-221.

213. Jensen M, Schroder J, Blomberg M, Engvall B, Pantel J, Ida N, Basun H, Wahlund LO, Werle E, Jauss M, Beyreuther K, Lannfelt L, Hartmann T. Cerebrospinal fluid A beta42 is increased early in sporadic Alzheimer's disease and declines with disease progression. *Ann. Neurol.* 1999; **45**: 504-511.

214. Rasmusson DX, Brandt J, Martin DB, Folstein MF. Head injury as a risk factor in Alzheimer's disease. *Brain Inj.* 1995; **9**: 213-219.

215. Schofield PW, Tang M, Marder K, Bell K, Dooneief G, Chun M, Sano M, Stern Y, Mayeux R. Alzheimer's disease after remote head injury: an incidence study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1997; **62**: 119-124.

216. Salib E and Hillier V. Head injury and the risk of Alzheimer's disease: a case control study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 1997; **12**: 363-368.

217. O'Meara ES, Kukull WA, Sheppard L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Pfanschmidt M, Thompson JD, Schellenberg GD, Larson EB. Head injury and risk of Alzheimer's disease by apolipoprotein E genotype. *Am. J. Epidemiol.* 1997; **146**: 373-384.

218. Abuelo DN, Walsh A, Seltzer W, Anath U, Ott BR, Geffroy G. Premature Alzheimer disease was not due to trauma: molecular biology revises diagnosis 15 years after patient's autopsy [letter]. *Arch. Neurol.* 1998; **55**: 1155

219. Nemetz PN, Leibson C, Naessens JM, Beard M, Kokmen E, Annegers JF, Kurland LT. Traumatic brain injury and time to onset of Alzheimer's disease: a population-based study. *Am. J. Epidemiol.* 1999; **149**: 32-40.

220. Gentleman SM, Greenberg BD, Savage MJ, Noori M, Newman SJ, Roberts GW, Griffin WS, Graham DI. A beta 42 is the predominant form of amyloid beta-protein in the brains of short-term survivors of head injury. *Neuroreport.* 1997; **8**: 1519-1522.

221. Raby CA, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Stahel PF, Watson MD, Evans LM, Mehta PD, Spiegel K, Kuo YM, Roher AE, Emmerling MR. Traumatic brain injury increases beta-amyloid peptide 1-42 in cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 1998; **71**: 2505-2509.

222. Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 1998; **279**: 688-695.

223. Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; **216**: 473-482.

224. Pike CJ. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1999; **72**: 1552-1563.

225. Giubilei F, D'Antona R, Antonini R, Lenzi GL, Ricci G, Fieschi C. Serum lipoprotein pattern variations in dementia and ischemic stroke. *Acta Neurol. Scand.* 1990; **81**: 84-86.

226. Jarvik GP, Wijsman EM, Kukull WA, Schellenberg GD, Yu C, Larson EB. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 1995; **45**: 1092-1096.

227. Wieringa GE, Burlinson S, Rafferty JA, Gowland E, Burns A. Apolipoprotein E genotypes and serum lipid levels in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 1997; **12**: 359-362.

228. Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease.

Neuroepidemiology. 1998; **17**: 14-20.

229. Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease [see comments]. *Neurology* 1992; **42**: 1681-1688.

230. Swaab DF and Salehi A. The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis [letter; comment]. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997; **56**: 216

231. Iqbal K and Grundke-Iqbal I. Mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration and the formation of tangles [news]. *Mol. Psychiatry* 1997; **2**: 178-180.

232. Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, Michel JP, Morrison JH. Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cereb. Cortex* 1994; **4**: 138-150.

233. Neve RL and Robakis NK. Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.* 1998; **21**: 15-19.

234. St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 1987; **235**: 885-890.

235. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease [see comments]. *Nature* 1991; **349**: 704-706.

236. Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991; **353**: 844-846.

237. Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 1991; **254**: 97-99.

238. Reid DJ, Conrad SA, Hendricks SM. Tracking nutrition trends, 1989-1994: an update on Canadians' attitudes, knowledge and reported actions. *Can. J. Public Health* 1996; **87**: 113-118.

239. Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Campion D, Frebourg T, Checler F. 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. U. S. A.* 1999; **96**: 4119-4124.

240. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-Tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, Refolo LM, Prada CM, Younkin SG, Hutton M, Hardy J. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum. Mol. Genet.* 1997; **6**: 2087-2089.

241. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein [see comments]. *Nature* 1995; **373**: 523-527.

242. Chen KS, Masliah E, Grajeda H, Guido T, Huang J, Khan K, Motter R, Soriano F, Games D. Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V-->F transgenic mice. *Prog. Brain Res.* 1998; **117:327-34**: 327-334.

243. Johnson-Wood K, Lee M, Motter R, Hu K, Gordon G, Barbour R, Khan K, Gordon M, Tan H,

Games D, Lieberburg I, Schenk D, Seubert P, McConlogue L. Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; **94**: 1550-1555.

244. Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 6483-6492.

245. Lamb BT, Call LM, Slunt HH, Bardel KA, Lawler AM, Eckman CB, Younkin SG, Holtz G, Wagner SL, Price DL, Sisodia SS, Gearhart JD. Altered metabolism of familial Alzheimer's disease-linked amyloid precursor protein variants in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 1997; **6**: 1535-1541.

246. Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; **96**: 3228-3233.

247. Malherbe P, Richards JG, Martin JR, Bluethmann H, Maggio J, Huber G. Lack of beta-amyloidosis in transgenic mice expressing low levels of familial Alzheimer's disease missense mutations. *Neurobiol. Aging* 1996; **17**: 205-214.

248. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; **94**: 13287-13292.

249. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos LJ, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994; **264**: 1336-1340.

250. Maruyama K, Tomita T, Shinozaki K, Kume H, Asada H, Saido TC, Ishiura S, Iwatsubo T, Obata K. Familial Alzheimer's disease-linked mutations at Val717 of amyloid precursor protein are specific for the increased secretion of A beta 42(43). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; **227**: 730-735.

251. Kosaka T, Imagawa M, Seki K, Arai H, Sasaki H, Tsuji S, Asami-Odaka A, Fukushima T, Imai K, Iwatsubo T. The beta APP717 Alzheimer mutation increases the percentage of plasma amyloid-beta protein ending at A beta42(43). *Neurology* 1997; **48**: 741-745.

252. Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ. Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; **91**: 11993-11997.

253. Johnston JA, Cowburn RF, Norgren S, Wiehager B, Venizelos N, Winblad B, Vigo-Pelfrey C, Schenk D, Lannfelt L, O'Neill C. Increased beta-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer's disease APP670/671 mutation. *FEBS Lett.* 1994; **354**: 274-278.

254. McPhie DL, Lee RK, Eckman CB, Olstein DH, Durham SP, Yager D, Younkin SG, Wurtman RJ, Neve RL. Neuronal expression of beta-amyloid precursor protein Alzheimer mutations causes intracellular accumulation of a C-terminal fragment containing both the amyloid beta and cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 24743-24746.

255. Li HL, Roch JM, Sundsmo M, Otero D, Sisodia S, Thomas R, Saitoh T. Defective neurite

extension is caused by a mutation in amyloid beta/A4 (A beta) protein precursor found in familial Alzheimer's disease. *J. Neurobiol.* 1997; **32**: 469-480.

256. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Moore DK, Boehnke M, Bryant EM, Lampe TH, Nochlin D, Sumi SM, Deeb SS. Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease. *Science* 1988; **241**: 1507-1510.

257. St George-Hyslop PH, Haines JL, Farrer LA, Polinsky R, Van Broeckhoven C, Goate A, McLachlan DR, Orr H, Bruni AC, Sorbi S. Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder. FAD Collaborative Study Group [see comments]. *Nature* 1990; **347**: 194-197.

258. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992; **258**: 668-671.

259. Schellenberg GD, Payami H, Wijsman EM, Orr HT, Goddard KA, Anderson L, Nemens E, White JA, Alonso ME, Ball MJ. Chromosome 14 and late-onset familial Alzheimer disease (FAD). *Am. J. Hum. Genet.* 1993; **53**: 619-628.

260. Cruts M, Backhovens H, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Genetic analysis of the cellular oncogene fos in patients with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1994; **174**: 97-100.

261. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease [see comments]. *Nature* 1995; **375**: 754-760.

262. Page K, Hollister R, Tanzi RE, Hyman BT. In situ hybridization analysis of presenilin 1 mRNA in Alzheimer disease and in lesioned rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; **93**: 14020-14024.

263. Elder GA, Tezapsidis N, Carter J, Shioi J, Bouras C, Li HC, Johnston JM, Efthimiopoulos S, Friedrich VLJ, Robakis NK. Identification and neuron specific expression of the S182/presenilin I protein in human and rodent brains. *J. Neurosci. Res.* 1996; **45**: 308-320.

264. Li X and Greenwald I. Membrane topology of the C. elegans SEL-12 presenilin. *Neuron* 1996; **17**: 1015-1021.

265. Doan A, Thinakaran G, Borchelt DR, Slunt HH, Ratovitsky T, Podlisny M, Selkoe DJ, Seeger M, Gandy SE, Price DL, Sisodia SS. Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 1996; **17** : 1023-1030.

266. Higuchi M, Kiyama H, Hayakawa T, Hamada Y, Tsujimoto Y. Differential expression of Notch1 and Notch2 in developing and adult mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1995; **29** : 263-272.

267. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch [see comments]. *Nature* 1995; **377**: 355-358.

268. Ray WJ, Yao M, Nowotny P, Mumm J, Zhang W, Wu JY, Kopan R, Goate AM. Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; **96**: 3263-3268.

269. Berezovska O, Frosch M, McLean P, Knowles R, Koo E, Kang D, Shen J, Lu FM, Lux SE, Tonegawa S, Hyman BT. The Alzheimer-related gene presenilin 1 facilitates notch 1 in primary mammalian neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999; **69**: 273-280.

270. Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsinghji DJ, Trumbauer ME, Chen HY, Price

DL, Van der Ploeg LH, Sisodia SS. Presenilin 1 is required for Notch1 and DII1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 1997; **387**: 288-292.

271. Conlon RA, Reaume AG, Rossant J. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 1995; **121**: 1533-1545.

272. Struhl G and Greenwald I. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila [see comments]. *Nature* 1999; **398**: 522-525.

273. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain [see comments]. *Nature* 1999; **398**: 518-522.

274. Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain [see comments]. *Nature* 1998; **393**: 382-386.

275. Li J, Xu M, Zhou H, Ma J, Potter H. Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell* 1997; **90**: 917-927.

276. Mercken M, Takahashi H, Honda T, Sato K, Murayama M, Nakazato Y, Noguchi K, Imahori K, Takashima A. Characterization of human presenilin 1 using N-terminal specific monoclonal antibodies: Evidence that Alzheimer mutations affect proteolytic processing. *FEBS Lett.* 1996; **389**: 297-303.

277. Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 1996; **17**: 181-190.

278. Hartmann H, Busciglio J, Baumann KH, Staufenbiel M, Yankner BA. Developmental regulation of presenilin-1 processing in the brain suggests a role in neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 14505-14508.

279. Mattson MP, Guo Q, Furukawa K, Pedersen WA. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1998; **70**: 1-14.

280. Zhou J, Liyanage U, Medina M, Ho C, Simmons AD, Lovett M, Kosik KS. Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport.* 1997; **8**: 1489-1494.

281. Yu G, Chen F, Levesque G, Nishimura M, Zhang DM, Levesque L, Rogaeva E, Xu D, Liang Y, Duthie M, St George-Hyslop PH, Fraser PE. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 16470-16475.

282. Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997; **9**: 683-690.

283. Axelrod JD, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Perrimon N. Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled [see comments]. *Science* 1996; **271**: 1826-1832.

284. Roperch JP, Alvaro V, Prieur S, Tuynder M, Nemani M, Lethrosne F, Piouffre L, Gendron MC, Israeli D, Dausset J, Oren M, Amson R, Telerman A. Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression. *Nat. Med.* 1998; **4**: 835-838.

285. Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M. The catenin/cadherin adhesion

system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.* 1996; **135**: 767-779.

286. Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, van de Wetering M, Clevers H, Saftig P, De Strooper B, He X, Yankner BA. Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 1998; **395**: 698-702.

287. Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 1997; **22**: 388-393.

288. Tesco G, Kim TW, Diehlmann A, Beyreuther K, Tanzi RE. Abrogation of the presenilin 1/beta-catenin interaction and preservation of the heterodimeric presenilin 1 complex following caspase activation. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 33909-33914.

289. Selkoe DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 1998; **8**: 447-453.

290. Perez-Tur J, Froelich S, Prihar G, Crook R, Baker M, Duff K, Wragg M, Busfield F, Lendon C, Clark RF. A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport.* 1995; **7**: 297-301.

291. Crook R, Verkkoniemi A, Perez-Tur J, Mehta N, Baker M, Houlden H, Farrer M, Hutton M, Lincoln S, Hardy J, Gwinn K, Somer M, Paetau A, Kalimo H, Ylikoski R, Poyhonen M, Kucera S, Haltia M. A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1 [see comments]. *Nat. Med.* 1998; **4**: 452-455.

292. Sandbrink R, Zhang D, Schaeffer S, Masters CL, Bauer J, Forstl H, Beyreuther K. Missense mutations of the PS-1/S182 gene in German early-onset Alzheimer's disease patients [letter]. *Ann. Neurol.* 1996; **40**: 265-266.

293. Dermaut B, Cruts M, Slooter AJ, Van Gestel S, De Jonghe C, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Breteler MM, Hofman A, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. The Glu318Gly substitution in presenilin 1 is not causally related to Alzheimer disease [letter]. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; **64**: 290-292.

294. Davis JA, Naruse S, Chen H, Eckman C, Younkin S, Price DL, Borchelt DR, Sisodia SS, Wong PC. An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos. *Neuron* 1998; **20**: 603-609.

295. Qian S, Jiang P, Guan XM, Singh G, Trumbauer ME, Yu H, Chen HY, Van de Ploeg LH, Zheng H. Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression. *Neuron* 1998; **20**: 611-617.

296. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat. Med.* 1996; **2**: 1146-1150.

297. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; **391**: 387-390.

298. Xia W, Zhang J, Perez R, Koo EH, Selkoe DJ. Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; **94**: 8208-8213.

299. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity [see comments]. *Nature* 1999; **398**: 513-517.

300. Naruse S, Thinakaran G, Luo JJ, Kusiak JW, Tomita T, Iwatsubo T, Qian X, Ginty DD, Price DL, Borchelt DR, Wong PC, Sisodia SS. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 1998; **21**: 1213-1221.

301. Nishimura M, Yu G, Levesque G, Zhang DM, Ruel L, Chen F, Milman P, Holmes E, Liang Y, Kawarai T, Jo E, Supala A, Rogaeva E, Xu DM, Janus C, Levesque L, Bi Q, Duthie M, Rozmahel R, Mattila K, Lannfelt L, Westaway D, Mount HT, Woodgett J, St George-Hyslop P. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of beta-catenin, a component of the presenilin protein complex [see comments]. *Nat. Med.* 1999; **5**: 164-169.

302. Wolozin B, Alexander P, Palacino J. Regulation of apoptosis by presenilin 1. *Neurobiol. Aging* 1998; **19**: S23-S27

303. Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1 [see comments]. *Science* 1995; **269**: 970-973.

304. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus [see comments]. *Science* 1995; **269**: 973-977.

305. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat. Med.* 1996; **2**: 224-229.

306. Levitan D and Greenwald I. Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a Caenorhabditis elegans S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 1995; **377**: 351-354.

307. Kim TW and Tanzi RE. Presenilins and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1997; **7**: 683-688.

308. Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA, Levesque G, Rogaev EI, Lin C, Liang Y, Ikeda M, Mar L, Brice A, Agid Y, Percy ME, Clerget-Darpoux F, Piacentini S, Marcon G, Nacmias B, Amaducci L, Frebourg T, Lannfelt L, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum. Mol. Genet.* 1996; **5**: 985-988.

309. Vidal R, Ghiso J, Wisniewski T, Frangione B. Alzheimer's presenilin 1 gene expression in platelets and megakaryocytes. Identification of a novel splice variant. *FEBS Lett.* 1996; **393**: 19-23.

310. Grunberg J, Walter J, Eckman C, Capell A, Schindzielorz A, Younkin S, Mehta N, Hardy J, Haass C. Truncated presenilin 2 derived from differentially spliced mRNA does not affect the ratio of amyloid beta-peptide 1-42/1-40. *Neuroreport.* 1998; **9**: 3293-3299.

311. Sato N, Hori O, Yamaguchi A, Lambert JC, Chartier-Harlin MC, Robinson PA, Delacourte A, Schmidt AM, Furuyama T, Imaizumi K, Tohyama M, Takagi T. A novel presenilin-2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue. *J. Neurochem.* 1999; **72**: 2498-2505.

312. Weidemann A, Paliga K, Durrwang U, Czech C, Evin G, Masters CL, Beyreuther K. Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein. *Nat. Med.* 1997; **3**: 328-332.

313. Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B, Kusiak JW, Wasco W, D'Adamio L. Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 1996; **274**: 1710-1713.

314. Hutton M and Hardy J. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1997; **6**: 1639-1646.

315. Amouyel P, Brousseau T, Fruchart JC, Dallongeville J. Apolipoprotein E-epsilon 4 allele and Alzheimer's disease [letter]. *Lancet* 1993; **342**: 1309

316. Schellenberg GD, Deeb SS, Boehnke M, Bryant EM, Martin GM, Lampe TH, Bird TD. Association of an apolipoprotein CII allele with familial dementia of the Alzheimer type. *J. Neurogenet.* 1987; **4**: 97-108.

317. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PCJ, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; **48**: 1034-1050.

318. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993; **90**: 1977-1981.

319. Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985; **82**: 203-207.

320. Lin-Lee YC, Kao FT, Cheung P, Chan L. Apolipoprotein E gene mapping and expression: localization of the structural gene to human chromosome 19 and expression of ApoE mRNA in lipoprotein- and non-lipoprotein-producing tissues. *Biochemistry* 1985; **24**: 3751-3756.

321. Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 1985; **76**: 1501-1513.

322. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E- containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1987; **917**: 148-161.

323. Soulie C, Mitchell V, Dupont-Wallois L, Chartier-Harlin MC, Beauvillain JC, Delacourte A, Caillet-Boudin ML. Synthesis of apolipoprotein E (ApoE) mRNA by human neuronal-type SK N SH-SY 5Y cells and its regulation by nerve growth factor and ApoE. *Neurosci. Lett.* 1999; **265**: 147-150.

324. Xu PT, Gilbert JR, Qiu HL, Ervin J, Rothrock-Christian TR, Hulette C, Schmechel DE. Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am. J. Pathol.* 1999; **154**: 601-611.

325. Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Walker MD, Taxman E, Taylor JM. Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 13340-13349.

326. Jo DW, Leren TP, Yang ZY, Chung YH, Taylor JM, Paik YK. Characterization of an upstream regulatory element of the human apolipoprotein E gene, and purification of its binding protein from the human placenta. *J. Biochem. (Tokyo.)* 1995; **117**: 915-922.

327. Allan CM, Taylor S, Taylor JM. Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 29113-29119.

328. Schachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat. Genet.* 1994; **6**: 29-32.

329. Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, Taylor JM. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 8651-8654.

330. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 1991; **252**: 1817-1822.

331. Wernette-Hammond ME, Lauer SJ, Corsini A, Walker D, Taylor JM, Rall SCJ. Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 9094-9101.

332. Rall SCJ, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 1982; **257**: 4171-4178.

333. Gianturco SH, Gotto AMJ, Hwang SL, Karlin JB, Lin AH, Prasad SC, Bradley WA. Apolipoprotein E mediates uptake of Sf 100-400 hypertriglyceridemic very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor pathway in normal human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1983; **258**: 4526-4533.

334. Aggerbeck LP, Wetterau JR, Weisgraber KH, Wu CS, Lindgren FT. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 6249-6258.

335. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; **240**: 622-630.

336. Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 1983; **309**: 288-296.

337. Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 1994; **264**: 850-852.

338. Gordon I, Ben-Eliyahu S, Rosenne E, Sehayek E, Michaelson DM. Derangement in stress response of apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 1996; **206**: 212-214.

339. Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp. Neurol.* 1995; **136**: 107-122.

340. Genis I, Gordon I, Sehayek E, Michaelson DM. Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 1995; **199**: 5-8.

341. Gordon I, Grauer E, Genis I, Sehayek E, Michaelson DM. Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E- deficient mice. *Neurosci. Lett.* 1995; **199**: 1-4.

342. Fagan AM, Murphy BA, Patel SN, Kilbridge JF, Mobley WC, Bu G, Holtzman DM. Evidence for normal aging of the septo-hippocampal cholinergic system in apoE (-/-) mice but impaired clearance of axonal degeneration products following injury. *Exp. Neurol.* 1998; **151**: 314-325.

343. Masliah E, Mallory M, Veinbergs I, Miller A, Samuel W. Alterations in apolipoprotein E expression during aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 1996; **50**: 493-503.

344. Han SH, Hulette C, Saunders AM, Einstein G, Pericak-Vance M, Strittmatter WJ, Roses AD, Schmechel DE. Apolipoprotein E is present in hippocampal neurons without neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and in age-matched controls. *Exp. Neurol.* 1994; **128**: 13-26.

345. Han SH, Einstein G, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Saunders AM, Pericak-Vance M, Roses AD, Schmechel DE. Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: a light and electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1994; **53**: 535-544.

346. Huang DY, Goedert M, Jakes R, Weisgraber KH, Garner CC, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Schmechel DE, Roses AD, Strittmatter WJ. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with the microtubule- associated protein MAP2c: implications for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1994; **182**: 55-58.

347. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule- associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; **91**: 11183-11186.

348. Hartmann H, Eckert A, Muller WE. Apolipoprotein E and cholesterol affect neuronal calcium signalling: the possible relationship to beta-amyloid neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; **200**: 1185-1192.

349. Huang DY, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Matthew WD. Interaction of apolipoprotein E with laminin increases neuronal adhesion and alters neurite morphology. *Exp. Neurol.* 1995; **136**: 251-257.

350. Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 1993; **55**: 81-90.

351. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends. Neurosci.* 1994; **17**: 525-530.

352. Boyles JK, Notterpek LM, Anderson LJ. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 17805-17815.

353. Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J. Lipid Res.* 1992; **33**: 1677-1688.

354. Pluta R, Kida E, Lossinsky AS, Golabek AA, Mossakowski MJ, Wisniewski HM. Complete cerebral ischemia with short-term survival in rats induced by cardiac arrest. I. Extracellular accumulation of Alzheimer's beta- amyloid protein precursor in the brain. *Brain Res.* 1994; **649**: 323-328.

355. Pluta R, Barcikowska M, Debicki G, Ryba M, Januszewski S. Changes in amyloid precursor protein and apolipoprotein E immunoreactivity following ischemic brain injury in rat with long-term survival: influence of idebenone treatment. *Neurosci. Lett.* 1997; **232**: 95-98.

356. Popko B, Goodrum JF, Bouldin TW, Zhang SH, Maeda N. Nerve regeneration occurs in the absence of apolipoprotein E in mice. *J. Neurochem.* 1993; **60**: 1155-1158.

357. Vance JE, Pan D, Campenot RB, Bussiere M, Vance DE. Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 1994; **62**: 329-337.

358. Zuckerman SH, Evans GF, O'Neal L. Cytokine regulation of macrophage apo E secretion: opposing effects of GM-CSF and TGF-beta. *Atherosclerosis* 1992; **96**: 203-214.

359. Zuckerman SH, Evans GF, O'Neal L. Exogenous glucocorticoids increase macrophage secretion of apo E by cholesterol-independent pathways. *Atherosclerosis* 1993; **103**: 43-54.

360. Baskin F, Smith GM, Fosmire JA, Rosenberg RN. Altered apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocyte cultures. *J. Neurol. Sci.* 1997; **148**: 15-18.

361. Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Felber BK, Pavlakis G, Zannis VI. The molecular basis of a familial apoE deficiency. An acceptor splice site mutation in the third intron of the deficient apoE gene. *J. Biol. Chem.* 1987; **262**: 2310-2315.

362. Hanlon CS and Rubinsztein DC. Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis* 1995; **112**: 85-90.

363. Zekraoui L, Lagarde JP, Raisonnier A, Gerard N, Aouizerate A, Lucotte G. High frequency of the apolipoprotein E *4 allele in African pygmies and most of the African populations in sub-Saharan Africa. *Hum. Biol.* 1997; **69**: 575-581.

364. Lohse P, Mann WA, Stein EA, Brewer HBJ. Apolipoprotein E-4Philadelphia (Glu13----Lys,Arg145----Cys). Homozygosity for two rare point mutations in the apolipoprotein E gene combined with severe type III hyperlipoproteinemia. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 10479-10484.

365. Feussner G, Feussner V, Hoffmann MM, Lohrmann J, Wieland H, Marz W. Molecular basis of type III hyperlipoproteinemia in Germany. *Hum. Mutat.* 1998; **11**: 417-423.

366. Kamboh MI, Aston CE, Perez-Tur J, Kokmen E, Ferrell RE, Hardy J, DeKosky ST. A novel mutation in the apolipoprotein E gene (APOE*4 Pittsburgh) is associated with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1999; **263**: 129-132.

367. Feussner G, Funke H, Weng W, Assmann G, Lackner KJ, Ziegler R. Severe type III hyperlipoproteinemia associated with unusual apolipoprotein E1 phenotype and epsilon 1/'null' genotype. *Eur. J. Clin. Invest.* 1992; **22**: 599-608.

368. Smit M, de Knijff P, van der Kooij-Meijs E, Groenendijk C, van den Maagdenberg AM, Gevers LJ, Stalenhoef AF, Stuyt PM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia. The E2(lys146- ---gln) variant results in a dominant mode of inheritance. *J. Lipid Res.* 1990; **31**: 45-53.

369. Iron A, Richard P, de Zulueta MP, Thomas G, Thomas M. Genotyping of a patient homozygous for a rare apolipoprotein E1 [Gly127- ->Asp; Arg158-->Cys] (Weisgraber allele). *J. Inherit. Metab. Dis.* 1995; **18**: 723-726.

370. Minnich A, Weisgraber KH, Newhouse Y, Dong LM, Fortin LJ, Tremblay M, Davignon J. Identification and characterization of a novel apolipoprotein E variant, apolipoprotein E3' (Arg136-->His): association with mild dyslipidemia and double pre-beta very low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 1995; **36**: 57-66.

371. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 1988; **3**: 373-379.

372. Walden CC, Huff MW, Leiter LA, Connelly PW, Hegele RA. Detection of a new apolipoprotein-E mutation in type III hyperlipidemia using deoxyribonucleic acid restriction isotyping. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; **78**: 699-704.

373. Richard P, de Zulueta MP, Beucler I, De Gennes JL, Cassaigne A, Iron A. Identification of a new apolipoprotein E variant (E2 Arg142-->Leu) in type III hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1995; **112**: 19-28.

374. Rall SCJ, Newhouse YM, Clarke HR, Weisgraber KH, McCarthy BJ, Mahley RW, Bersot TP. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E phenotype E3/3. Structure and

genetics of an apolipoprotein E3 variant. *J. Clin. Invest.* 1989; **83**: 1095-1101.

375. Mann WA, Gregg RE, Sprecher DL, Brewer HBJ. Apolipoprotein E-1Harrisburg: a new variant of apolipoprotein E dominantly associated with type III hyperlipoproteinemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; **1005**: 239-244.

376. Funke H, Rust S, Assmann G. Detection of apolipoprotein E variants by an oligonucleotide "melting" procedure. *Clin. Chem.* 1986; **32**: 1285-1289.

377. Okubo M, Aoyama Y, Harada K, Fukawa M, Tsukada T, Mokuno H, Yamada N, Murase T. A novel apolipoprotein E2 variant, E2Toranomon (Q187E), identified in a type III hyperlipoproteinemia patient with coronary atherosclerosis [letter]. *Atherosclerosis* 1998; **140**: 187-190.

378. Feussner G, Dobmeyer J, Grone HJ, Lohmer S, Wohlfeil S. A 10-bp deletion in the apolipoprotein epsilon gene causing apolipoprotein E deficiency and severe type III hyperlipoproteinemia. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; **58**: 281-291.

379. Lohse P, Brewer HB, Meng MS, Skarlatos SI, LaRosa JC, Brewer HBJ. Familial apolipoprotein E deficiency and type III hyperlipoproteinemia due to a premature stop codon in the apolipoprotein E gene. *J. Lipid Res.* 1992; **33**: 1583-1590.

380. Wardell MR, Rall SCJ, Brennan SO, Nye ER, George PM, Janus ED, Weisgraber KH. Apolipoprotein E2-Dunedin (228 Arg replaced by Cys): an apolipoprotein E2 variant with normal receptor-binding activity. *J. Lipid Res.* 1990; **31**: 535-543.

381. Tajima S, Yamamura T, Menju M, Yamamoto A. Analysis of apolipoprotein E7 (apolipoprotein E-Suita) gene from a patient with hyperlipoproteinemia. *J. Biochem. (Tokyo.)* 1989; **105**: 249-253.

382. Utermann G, Pruin N, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin. Genet.* 1979; **15**: 63-72.

383. Bouthillier D, Sing CF, Davignon J. Apolipoprotein E phenotyping with a single gel method: application to the study of informative matings. *J. Lipid Res.* 1983; **24**: 1060-1069.

384. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta- analysis. *J. Lipid Res.* 1992; **33**: 447-454.

385. Weisgraber KH, Innerarity TL, Harder KJ, Mahley RW, Milne RW, Marcel YL, Sparrow JT. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. *J. Biol. Chem.* 1983; **258**: 12348-12354.

386. Chung BH and Segrest JP. Resistance of a very low density lipoprotein subpopulation from familial dysbetalipoproteinemia to in vitro lipolytic conversion to the low density lipoprotein density fraction. *J. Lipid Res.* 1983; **24**: 1148-1159.

387. Gregg RE, zech LA, Brewer HB. abnormal lipoprotein and apolipoprotein metabolism in a normolipidemic apolipoprotein E2 homozygote. *Clin. Res.* 1983; **31**: 387

388. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium [see comments]. *JAMA* 1997; **278**: 1349-1356.

389. Brousseau T, Legrain S, Berr C, Gourlet V, Vidal O, Amouyel P. Confirmation of the epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease [see comments]. *Neurology* 1994; **44**: 342-344.

390. van Duijn CM, de Knijff P, Cruts M, Wehnert A, Havekes LM, Hofman A, Van Broeckhoven C. Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 1994; **7**: 74-78.

391. Okuizumi K, Onodera O, Tanaka H, Kobayashi H, Tsuji S, Takahashi H, Oyanagi K, Seki K, Tanaka M, Naruse S. ApoE-epsilon 4 and early-onset Alzheimer's. *Nat. Genet.* 1994; **7**: 10-11.

392. Dai XY, Nanko S, Hattori M, Fukuda R, Nagata K, Isse K, Ueki A, Kazamatsuri H. Association of apolipoprotein E4 with sporadic Alzheimer's disease is more pronounced in early onset type. *Neurosci. Lett.* 1994; **175**: 74-76.

393. Perez-Tur J, Campion D, Martinez M, Brice A, Tardieu S, Hannequin D, Agid Y, Delacourte A, Clerget-Darpoux F, Chartier-Harlin MC. Evidence for apolipoprotein E epsilon 4 association in early-onset Alzheimer's patients with late-onset relatives. *Am. J. Med. Genet.* 1995; **60**: 550-553.

394. Lannfelt L, Lilius L, Nastase M, Viitanen M, Fratiglioni L, Eggertsen G, Berglund L, Angelin B, Linder J, Winblad B. Lack of association between apolipoprotein E allele epsilon 4 and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1994; **169**: 175-178.

395. Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Perez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V. 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.* 1994; **3**: 569-574.

396. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PCJ, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 1994; **7**: 180-184.

397. Talbot C, Lendon C, Craddock N, Shears S, Morris JC, Goate A. Protection against Alzheimer's disease with apoE epsilon 2 [letter] [see comments]. *Lancet* 1994; **343**: 1432-1433.

398. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families [see comments]. *Science* 1993; **261**: 921-923.

399. van Duijn CM, de Knijff P, Wehnert A, De Voecht J, Bronzova JB, Havekes LM, Hofman A, Van Broeckhoven C. The apolipoprotein E epsilon 2 allele is associated with an increased risk of early-onset Alzheimer's disease and a reduced survival. *Ann. Neurol.* 1995; **37**: 605-610.

400. Basun H, Grut M, Winblad B, Lannfelt L. Apolipoprotein epsilon 4 allele and disease progression in patients with late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1995; **183**: 32-34.

401. Stern Y, Brandt J, Albert M, Jacobs DM, Liu X, Bell K, Marder K, Sano M, Albert S, Del-Castillo C, Bylsma F, Tycko B, Mayeux R. The absence of an apolipoprotein epsilon4 allele is associated with a more aggressive form of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1997; **41**: 615-620.

402. Frisoni GB, Govoni S, Geroldi C, Bianchetti A, Calabresi L, Franceschini G, Trabucchi M. Gene dose of the epsilon 4 allele of apolipoprotein E and disease progression in sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1995; **37**: 596-604.

403. Olichney JM, Sabbagh MN, Hofstetter CR, Galasko D, Grundman M, Katzman R, Thal LJ. The impact of apolipoprotein E4 on cause of death in Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; **49**: 76-81.

404. Slooter AJ, Houwing-Duistermaat JJ, van Harskamp F, Cruts M, Van Broeckhoven C, Breteler MM, Hofman A, Stijnen T, van Duijn CM. Apolipoprotein E genotype and progression of Alzheimer's disease: the Rotterdam Study [In Process Citation]. *J. Neurol.* 1999; **246**: 304-308.

405. Frisoni GB, Bianchetti A, Govoni S, Trabucchi M. Clinical correlates of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1996; **40**: 688-689.

406. Holmes C, Levy R, McLoughlin DM, Powell JF, Lovestone S. Apolipoprotein E: non-cognitive symptoms and cognitive decline in late onset Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1996; **61**: 580-583.

407. Ballard C, Massey H, Lamb H, Morris C. Apolipoprotein E: non-cognitive symptoms and cognitive decline in late onset Alzheimer's disease [letter; comment]. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1997; **63**: 273-274.

408. Jonker C, Schmand B, Lindeboom J, Havekes LM, Launer LJ. Association between apolipoprotein E epsilon4 and the rate of cognitive decline in community-dwelling elderly individuals with and without dementia [see comments]. *Arch. Neurol.* 1998; **55**: 1065-1069.

409. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993; **11**: 575-580.

410. Mann DM, Iwatsubo T, Cairns NJ, Lantos PL, Nochlin D, Sumi SM, Bird TD, Poorkaj P, Hardy J, Hutton M, Prihar G, Crook R, Rossor MN, Haltia M. Amyloid beta protein (Abeta) deposition in chromosome 14-linked Alzheimer's disease: predominance of Abeta42(43). *Ann. Neurol.* 1996; **40**: 149-156.

411. Berr C, Hauw JJ, Delaere P, Duyckaerts C, Amouyel P. Apolipoprotein E allele epsilon 4 is linked to increased deposition of the amyloid beta-peptide (A-beta) in cases with or without Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1994; **178**: 221-224.

412. Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, Johnston C, Litchfield S, Sim E, Smith AD. Influence of the apolipoprotein E genotype on amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1995; **69**: 757-761.

413. Landen M, Thorsell A, Wallin A, Blennow K. The apolipoprotein E allele epsilon 4 does not correlate with the number of senile plaques or neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1996; **61**: 352-356.

414. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. 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.* 1993; **90**: 9649-9653.

415. Kalaria RN, Cohen DL, Premkumar DR. Apolipoprotein E alleles and brain vascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996; **777:266-70**: 266-270.

416. Warzok RW, Kessler C, Apel G, Schwarz A, Egensperger R, Schreiber D, Herbst EW, Wolf E, Walther R, Walker LC. Apolipoprotein E4 promotes incipient Alzheimer pathology in the elderly. *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.* 1998; **12**: 33-39.

417. Richey PL, Siedlak SL, Smith MA, Perry G. Apolipoprotein E interaction with the neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer disease: implications for disease pathogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; **208**: 657-663.

418. Ghebremedhin E, Schultz C, Braak E, Braak H. High frequency of apolipoprotein E epsilon4 allele in young individuals with very mild Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Exp. Neurol.* 1998; **153**: 152-155.

419. Mukaetova-Ladinska EB, Harrington CR, Roth M, Wischik CM. Presence of the apolipoprotein

E type epsilon 4 allele is not associated with neurofibrillary pathology or biochemical changes to tau protein. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 1997; **8**: 288-295.

420. Bickeboller H, Campion D, Brice A, Amouyel P, Hannequin D, Didierjean O, Penet C, Martin C, Perez-Tur J, Michon A, Dubois B, Ledoze F, Thomas-Anterion C, Pasquier F, Puel M, Demonet JF, Moreaud O, Babron MC, Meulien D, Guez D, Chartier-Harlin MC, Frebourg T, Agid Y, Martinez M, Clerget-Darpoux F. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; **60**: 439-446.

421. Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JC. APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease [letter] [see comments]. *Nat. Genet.* 1998; **19**: 321-322.

422. Sobel E, Louhija J, Sulkava R, Davanipour Z, Kontula K, Miettinen H, Tikkanen M, Kainulainen K, Tilvis R. Lack of association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late- onset Alzheimer's disease among Finnish centenarians. *Neurology* 1995; **45**: 903-907.

423. Silverman JM, Smith CJ, Marin DB, Birstein S, Mare M, Mohs RC, Davis KL. Identifying families with likely genetic protective factors against Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; **64**: 832-838.

424. Rao VS, Cupples A, van Duijn CM, Kurz A, Green RC, Chui H, Duara R, Auerbach SA, Volicer L, Wells J, Van Broeckhoven C, Growdon JH, Haines JL, Farrer LA. Evidence for major gene inheritance of Alzheimer disease in families of patients with and without apolipoprotein E epsilon 4. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; **59**: 664-675.

425. Luc G, Bard JM, Arveiler D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, Amouyel P, Schaffer P, Ruidavets JB, Cambien F. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler. Thromb.* 1994; **14**: 1412-1419.

426. Lucotte G, Loirat F, Hazout S. Pattern of gradient of apolipoprotein E allele *4 frequencies in western Europe. *Hum. Biol.* 1997; **69**: 253-262.

427. Maestre G, Ottman R, Stern Y, Gurland B, Chun M, Tang MX, Shelanski M, Tycko B, Mayeux R. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: ethnic variation in genotypic risks. *Ann. Neurol.* 1995; **37**: 254-259.

428. Tang MX, Stern Y, Marder K, Bell K, Gurland B, Lantigua R, Andrews H, Feng L, Tycko B, Mayeux R. The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics [see comments]. *JAMA* 1998; **279**: 751-755.

429. Ott A, Slooter AJ, Hofman A, van Harskamp F, Witteman JC, Van Broeckhoven C, van Duijn CM, Breteler MM. Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population- based cohort study: the Rotterdam Study [In Process Citation]. *Lancet* 1998; **351** : 1840-1843.

430. van Duijn CM, Havekes LM, Van Broeckhoven C, de Knijff P, Hofman A. Apolipoprotein E genotype and association between smoking and early onset Alzheimer's disease. *BMJ.* 1995; **310**: 627-631.

431. Plassman BL, Helms MJ, Welsh KA, Saunders AM, Breitner JC. Smoking, Alzheimer's disease, and confounding with genes [letter] [see comments]. *Lancet* 1995; **345**: 387

432. Carmelli D, Swan GE, Reed T, Schellenberg GD, Christian JC. The effect of apolipoprotein E epsilon4 in the relationships of smoking and drinking to cognitive function. *Neuroepidemiology.* 1999; **18**: 125-133.

433. Mayeux R, Ottman R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H, Chun M, Tycko B, Shelanski M. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; **45**: 555-557.

434. Friedman G, Froom P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, Babaey S, Yehuda B, Groswasser Z. Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury. *Neurology* 1999; **52**: 244-248.

435. Saunders AM, Schmader K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N. Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 1993; **342**: 710-711.

436. Pickering-Brown SM, Mann DM, Bourke JP, Roberts DA, Balderson D, Burns A, Byrne J, Owen F. Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease pathology in Lewy body disease and in other beta-amyloid-forming diseases [letter] [see comments]. *Lancet* 1994; **343**: 1155

437. Hardy J, Crook R, Perry R, Raghavan R, Roberts G. ApoE genotype and Down's syndrome [letter]. *Lancet* 1994; **343**: 979-980.

438. Royston MC, Mann D, Pickering-Brown S, Owen F, Perry R, Raghavan R, Khin-Nu C, Tyrer S, Day K, Crook R. Apolipoprotein E epsilon 2 allele promotes longevity and protects patients with Down's syndrome from dementia. *Neuroreport.* 1994; **5**: 2583-2585.

439. Lambert JC, Perez-Tur J, Dupire MJ, Delacourte A, Frigard B, Chartier-Harlin MC. Analysis of the APOE alleles impact in Down's syndrome. *Neurosci. Lett.* 1996; **220**: 57-60.

440. Alexander GE, Saunders AM, Szczepanik J, Strassburger TL, Pietrini P, Dani A, Furey ML, Mentis MJ, Roses AD, Rapoport SI, Schapiro MB. Relation of age and apolipoprotein E to cognitive function in Down syndrome adults. *Neuroreport.* 1997; **8**: 1835-1840.

441. Del Bo R, Comi GP, Bresolin N, Castelli E, Conti E, Degiuli A, Ausenda CD, Scarlato G. The apolipoprotein E epsilon4 allele causes a faster decline of cognitive performances in Down's syndrome subjects. *J. Neurol. Sci.* 1997; **145**: 87-91.

442. Wisniewski T, Morelli L, Wegiel J, Levy E, Wisniewski HM, Frangione B. The influence of apolipoprotein E isotypes on Alzheimer's disease pathology in 40 cases of Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 1995; **37**: 136-138.

443. van Gool WA, Evenhuis HM, van Duijn CM. A case-control study of apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease associated with Down's syndrome. Dutch Study Group on Down's Syndrome and Ageing. *Ann. Neurol.* 1995; **38**: 225-230.

444. Holder JL, Habbak RA, Pearlson GD, Aylward EA, Pulsifer M, Warren AC. Reduced survival of apolipoprotein E4 homozygotes in Down's syndrome? *Neuroreport.* 1996; **7**: 2455-2456.

445. Edland SD, Wijsman EM, Schoder-Ehri GL, Leverenz JB. Little evidence of reduced survival to adulthood of apoE epsilon4 homozygotes in Down's syndrome. *Neuroreport.* 1997; **8**: 3463-3465.

446. Tyrrell J, Cosgrave M, Hawi Z, McPherson J, O'Brien C, McCalvert J, McLaughlin M, Lawlor B, Gill M. A protective effect of apolipoprotein E e2 allele on dementia in Down's syndrome. *Biol. Psychiatry* 1998; **43**: 397-400.

447. Lai F, Kammann E, Rebeck GW, Anderson A, Chen Y, Nixon RA. APOE genotype and gender effects on Alzheimer disease in 100 adults with Down syndrome [In Process Citation]. *Neurology* 1999; **53**: 331-336.

448. Van Broeckhoven C, Backhovens H, Cruts M, Martin JJ, Crook R, Houlden H, Hardy J. APOE genotype does not modulate age of onset in families with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1994; **169**: 179-180.

449. Lendon CL, Martinez A, Behrens IM, Kosik KS, Madrigal L, Norton J, Neuman R, Myers A, Busfield F, Wragg M, Arcos M, Arango VJ, Ossa J, Ruiz A, Goate AM, Lopera F. E280A PS-1 mutation causes Alzheimer's disease but age of onset is not modified by ApoE alleles. *Hum. Mutat.* 1997; **10**: 186-195.

450. St Clair D, Norrman J, Perry R, Yates C, Wilcock G, Brookes A. Apolipoprotein E epsilon 4 allele frequency in patients with Lewy body dementia, Alzheimer's disease and age-matched controls. *Neurosci. Lett.* 1994; **176**: 45-46.

451. Betard C, Robitaille Y, Gee M, Tiberghien D, Larrivee D, Roy P, Mortimer JA, Gauvreau D. Apo E allele frequencies in Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Alzheimer's disease with cerebrovascular disease and vascular dementia. *Neuroreport.* 1994; **5**: 1893-1896.

452. Harrington CR, Louwagie J, Rossau R, Vanmechelen E, Perry RH, Perry EK, Xuereb JH, Roth M, Wischik CM. Influence of apolipoprotein E genotype on senile dementia of the Alzheimer and Lewy body types. Significance for etiological theories of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 1994; **145**: 1472-1484.

453. Olichney JM, Hansen LA, Galasko D, Saitoh T, Hofstetter CR, Katzman R, Thal LJ. The apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with increased neuritic plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and Lewy body variant. *Neurology* 1996; **47**: 190-196.

454. Lippa CF, Smith TW, Saunders AM, Crook R, Pulaski-Salo D, Davies P, Hardy J, Roses AD, Dickson D. Apolipoprotein E genotype and Lewy body disease. *Neurology* 1995; **45**: 97-103.

455. Amouyel P, Vidal O, Launay JM, Laplanche JL. The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease. The French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies [see comments]. *Lancet* 1994; **344**: 1315-1318.

456. Pickering-Brown SM, Mann DM, Owen F, Ironside JW, de Silva R, Roberts DA, Balderson DJ, Cooper PN. Allelic variations in apolipoprotein E and prion protein genotype related to plaque formation and age of onset in sporadic Creutzfeldt- Jakob disease. *Neurosci. Lett.* 1995; **187**: 127-129.

457. Nakagawa Y, Kitamoto T, Furukawa H, Ogomori K, Tateishi J. Apolipoprotein E in Creutzfeldt-Jakob disease [letter; comment]. *Lancet* 1995; **345**: 68

458. Zerr I, Helmhold M, Armstrong VW, Weber T. Apolipoprotein E in Creutzfeldt-Jakob disease [letter; comment] [published erratum appears in Lancet 1995 Jan 28;345(8944):266]. *Lancet* 1995; **345**: 68-69.

459. Roses AD, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Hyman B. Apolipoprotein E in Creutzfeldt-Jacob disease [letter; comment] [see comments]. *Lancet* 1995; **345**: 69

460. Tabaton M, Rolleri M, Masturzo P, Cammarata S, Angelini G, Hansen LA, Saitoh T, Petersen RB, Perry G, Richey P. Apolipoprotein E epsilon 4 allele frequency is not increased in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1995; **45**: 1764-1765.

461. Anouti A, Schmidt K, Lyons KE, Hubble JP, Schellenberg G, Golbe LI, Lang AE, Galvez-Jimenez N, Hershey L, Koller WC. Normal distribution of apolipoprotein E alleles in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1996; **46**: 1156-1157.

462. Arai H, Higuchi S, Muramatsu T, Matsushita S, Itabashi S, Sasaki H. Lack of association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with progressive supranuclear palsy [letter]. *Neurodegeneration.* 1996; **5**: 194-195.

463. Bachus R, Bader S, Gessner R, Ludolph AC. Lack of association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with bulbar- onset motor neuron disease [letter]. *Ann. Neurol.* 1997; **41**: 417

464. Buee L, Perez-Tur J, Leveugle B, Buee-Scherrer V, Mufson EJ, Loerzel AJ, Chartier-Harlin MC, Perl DP, Delacourte A, Hof PR. Apolipoprotein E in Guamanian amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex: genotype analysis and relationships to neuropathological changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1996; **91**: 247-253.

465. Houlden H, Rizzu P, Stevens M, de Knijff P, van Duijn CM, van Swieten JC, Heutink P, Perez-Tur J, Thomas V, Baker M, Morris H, Rossor M, Jannsen JC, Petersen RC, Dodd P, Dark F, Boeve B, Dickson D, Davies P, Pickering-Brown S, Mann D, Adamson J, Lynch T, Payami H, Hardy J. Apolipoprotein E genotype does not affect the age of onset of dementia in families with defined tau mutations. *Neurosci. Lett.* 1999; **260**: 193-195.

466. Benjamin R, Leake A, Edwardson JA, McKeith IG, Ince PG, Perry RH, Morris CM. Apolipoprotein E genes in Lewy body and Parkinson's disease. *Lancet* 1994; **343**: 1565

467. Rubinsztein DC, Hanlon CS, Irving RM, Goodburn S, Evans DG, Kellar-Wood H, Xuereb JH, Bandmann O, Harding AE. Apo E genotypes in multiple sclerosis, Parkinson's disease, schwannomas and late-onset Alzheimer's disease. *Mol. Cell Probes.* 1994; **8**: 519-525.

468. Gearing M, Schneider JA, Rebeck GW, Hyman BT, Mirra SS. Alzheimer's disease with and without coexisting Parkinson's disease changes: apolipoprotein E genotype and neuropathologic correlates. *Neurology* 1995; **45**: 1985-1990.

469. Zareparsi S, Kaye J, Camicioli R, Grimslid H, Oken B, Litt M, Nutt J, Bird T, Schellenberg G, Payami H. Modulation of the age at onset of Parkinson's disease by apolipoprotein E genotypes [see comments]. *Ann. Neurol.* 1997; **42**: 655-658.

470. Wakabayashi K, Kakita A, Hayashi S, Okuizumi K, Onodera O, Tanaka H, Ishikawa A, Tsuji S, Takahashi H. Apolipoprotein E epsilon4 allele and progression of cortical Lewy body pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1998; **95**: 450-454.

471. Mattila PM, Koskela T, Roytta M, Lehtimaki T, Pirttila TA, Ilveskoski E, Karhunen P, Rinne JO. Apolipoprotein E epsilon4 allele frequency is increased in Parkinson's disease only with co-existing Alzheimer pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1998; **96** : 417-420.

472. Marder K, Maestre G, Cote L, Mejia H, Alfaro B, Halim A, Tang M, Tycko B, Mayeux R. The apolipoprotein epsilon 4 allele in Parkinson's disease with and without dementia [see comments]. *Neurology* 1994; **44**: 1330-1331.

473. Inzelberg R, Chapman J, Treves TA, Asherov A, Kipervasser S, Hilkewicz O, Verchovsky R, Klimowitzky S, Korczyn AD. Apolipoprotein E4 in Parkinson disease and dementia: new data and meta- analysis of published studies. *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.* 1998; **12**: 45-48.

474. Kruger R, Vieira-Saecker AM, Kuhn W, Berg D, Muller T, Kuhnl N, Fuchs GA, Storch A, Hungs M, Woitalla D, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Ann. Neurol.* 1999; **45**: 611-617.

475. Ibarreta D, Gomez-Isla T, Portera-Sanchez A, Parrilla R, Ayuso MS. Apolipoprotein E genotype in Spanish patients of Alzheimer's or Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 1995; **134**: 146-149.

476. Nicoll JA, Roberts GW, Graham DI. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury. *Nat. Med.* 1995; **1**: 135-137.

477. Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A, Schmechel D, Wisniewski T, Frangione B, Roses AD. 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.* 1994; **94**: 860-869.

478. Castano EM, Prelli F, Wisniewski T, Golabek A, Kumar RA, Soto C, Frangione B. Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem. J.* 1995; **306**: 599-604.

479. Chan W, Fornwald J, Brawner M, Wetzel R. Native complex formation between apolipoprotein E isoforms and the Alzheimer's disease peptide A beta. *Biochemistry* 1996; **35**: 7123-7130.

480. Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition [letter] [see comments]. *Nat. Genet.* 1997; **17**: 263-264.

481. Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W, Haase AT. Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J. Virol.* 1991; **65**: 4759-4768.

482. Yamada T, Kondo A, Takamatsu J, Tateishi J, Goto I. Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 1995; **129**: 56-61.

483. Evans KC, Berger EP, Cho CG, Weisgraber KH, Lansbury PTJ. Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; **92**: 763-767.

484. Beffert U, Aumont N, Dea D, Lussier-Cacan S, Davignon J, Poirier J. Beta-amyloid peptides increase the binding and internalization of apolipoprotein E to hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 1998; **70**: 1458-1466.

485. Pillot T, Goethals M, Vanloo B, Lins L, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M. Specific modulation of the fusogenic properties of the Alzheimer beta- amyloid peptide by apolipoprotein E isoforms. *Eur. J. Biochem.* 1997; **243**: 650-659.

486. Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, Hyman BT, Maggio JE, Selkoe DJ. Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 32916-32922.

487. Koudinov AR, Berezov TT, Kumar A, Koudinova NV. Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clin. Chim. Acta* 1998; **270**: 75-84.

488. Aleshkov S, Abraham CR, Zannis VI. Interaction of nascent ApoE2, ApoE3, and ApoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide beta (1-40). Relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1997; **36**: 10571-10580.

489. Russo C, Angelini G, Dapino D, Piccini A, Piombo G, Schettini G, Chen S, Teller JK, Zaccheo D, Gambetti P, Tabaton M. Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; **95**: 15598-15602.

490. Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, Chang LK, Sun Y, Paul SM. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 1999; **103**: R15-R21

491. LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 23403-23406.

492. Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* 1997; **42**: 776-782.

493. Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; **252**: 711-715.

494. Slooter AJ, de Knijff P, Hofman A, Cruts M, Breteler MM, Van Broeckhoven C, Havekes LM, van Duijn CM. Serum apolipoprotein E level is not increased in Alzheimer's disease: the Rotterdam study [In Process Citation]. *Neurosci. Lett.* 1998; **248**: 21-24.

495. Matsubara E, Ghiso J, Frangione B, Amari M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M. Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 1999; **45**: 537-541.

496. Mulder M, Ravid R, Swaab DF, de Kloet ER, Haasdijk ED, Julk J, van der Boom JJ, Havekes LM. Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E4. *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.* 1998; **12**: 198-203.

497. Czech C, Forstl H, Hentschel F, Monning U, Besthorn C, Geiger-Kabisch C, Sattel H, Masters C, Beyreuther K. Apolipoprotein E-4 gene dose in clinically diagnosed Alzheimer's disease: prevalence, plasma cholesterol levels and cerebrovascular change. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 1994; **243**: 291-292.

498. Lemeshow S, Letenneur L, Dartigues JF, Lafont S, Orgogozo JM, Commenges D. Illustration of analysis taking into account complex survey considerations: the association between wine consumption and dementia in the PAQUID study. Personnes Ages Quid [In Process Citation]. *Am. J. Epidemiol.* 1998; **148**: 298-306.

499. Mason RP, Shoemaker WJ, Shajenko L, Chambers TE, Herbette LG. Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol. Aging* 1992; **13**: 413-419.

500. Svennerholm L, Bostrom K, Jungbjer B, Olsson L. Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J. Neurochem.* 1994; **63**: 1802-1811.

501. Svennerholm L and Gottfries CG. Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *J. Neurochem.* 1994; **62**: 1039-1047.

502. Klunk WE, Panchalingam K, McClure RJ, Stanley JA, Pettegrew JW. Metabolic alterations in postmortem Alzheimer's disease brain are exaggerated by Apo-E4. *Neurobiol. Aging* 1998; **19**: 511-515.

503. Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, Schwartz AL. 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.* 1995; **92**: 9480-9484.

504. Bellosta S, Nathan BP, Orth M, Dong LM, Mahley RW, Pitas RE. Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 27063-27071.

505. Sun Y, Wu S, Bu G, Onifade MK, Patel SN, LaDu MJ, Fagan AM, Holtzman DM. Glial fibrillary acidic protein-apolipoprotein E (apoE) transgenic mice: astrocyte-specific expression and differing biological effects of astrocyte-secreted apoE3 and apoE4 lipoproteins. *J. Neurosci.* 1998; **18**: 3261-3272.

506. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 10771-10779.

507. Soininen H, Kosunen O, Helisalmi S, Mannermaa A, Paljarvi L, Talasniemi S, Ryynanen M, Riekkinen PS. A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neurosci. Lett.* 1995; **187**: 79-82.

508. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J. Neurol. Sci.* 1977; **34**: 247-265.

509. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 1981; **10**: 122-126.

510. Corder EH, Robertson K, Lannfelt L, Bogdanovic N, Eggertsen G, Wilkins J, Hall C. HIV-infected subjects with the E4 allele for APOE have excess dementia and peripheral neuropathy [see comments]. *Nat. Med.* 1998; **4**: 1182-1184.

511. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease [see comments]. *Lancet* 1997; **349**: 241-244.

512. Saitoh T, Kang D, Mallory M, DeTeresa R, Masliah E. Glial cells in Alzheimer's disease: preferential effect of APOE risk on scattered microglia. *Gerontology* 1997; **43**: 109-118.

513. Egensperger R, Kosel S, von Eitzen U, Graeber MB. Microglial activation in Alzheimer disease: Association with APOE genotype. *Brain Pathol.* 1998; **8**: 439-447.

514. Lombardi VR, Garcia M, Cacabelos R. Microglial activation induced by factor(s) contained in sera from Alzheimer-related ApoE genotypes. *J. Neurosci. Res.* 1998; **54**: 539-553.

515. Vitek MP, Snell J, Dawson H, Colton CA. Modulation of nitric oxide production in human macrophages by apolipoprotein-E and amyloid-beta peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; **240**: 391-394.

516. Laskowitz DT, Matthew WD, Bennett ER, Schmechel D, Herbstreith MH, Goel S, McMillian MK. Endogenous apolipoprotein E suppresses LPS-stimulated microglial nitric oxide production. *Neuroreport.* 1998; **9**: 615-618.

517. McGeer EG and McGeer PL. The role of the immune system in neurodegenerative disorders. *Mov. Disord.* 1997; **12**: 855-858.

518. Hayek T, Oiknine J, Brook JG, Aviram M. Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; **201**: 1567-1574.

519. Lomnitski L, Chapman S, Hochman A, Kohen R, Shohami E, Chen Y, Trembovler V, Michaelson DM. Antioxidant mechanisms in apolipoprotein E deficient mice prior to and following closed head injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1453**: 359-368.

520. Miyata M and Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat. Genet.* 1996; **14** : 55-61.

521. Genis I, Fisher A, Michaelson DM. Site-specific dephosphorylation of tau of apolipoprotein E-deficient and control mice by M1 muscarinic agonist treatment. *J. Neurochem.* 1999; **72**: 206-213.

522. Mercken L and Brion JP. Phosphorylation of tau protein is not affected in mice lacking apolipoprotein E. *Neuroreport.* 1995; **6**: 2381-2384.

523. Wang X, Luebbe P, Gruenstein E, Zemlan F. Apolipoprotein E (ApoE) peptide regulates tau phosphorylation via two different signaling pathways. *J. Neurosci. Res.* 1998; **51**: 658-665.

524. Flaherty D, Lu Q, Soria J, Wood JG. Regulation of tau phosphorylation in microtubule fractions by apolipoprotein E. *J. Neurosci. Res.* 1999; **56**: 271-274.

525. Caillet-Boudin ML, Dupont-Wallois L, Soulie C, Delacourte A. Apolipoprotein E and Tau phosphorylation in human neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.* 1998; **250**: 83-86.

526. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, Dong LM, Jakes R, Alberts MJ, Gilbert JR. Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp. Neurol.* 1994; **125**: 163-171.

527. Huang DY, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Roses AD, Strittmatter WJ. ApoE3 binding to tau tandem repeat I is abolished by tau serine262 phosphorylation. *Neurosci. Lett.* 1995; **192**: 209-212.

528. DeMattos RB, Thorngate FE, Williams DL. 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.* 1999; **19**: 2464-2473.

529. Crutcher KA, Clay MA, Scott SA, Tian X, Tolar M, Harmony JA. Neurite degeneration elicited by apolipoprotein E peptides. *Exp. Neurol.* 1994; **130**: 120-126.

530. Marques MA, Tolar M, Harmony JA, Crutcher KA. A thrombin cleavage fragment of apolipoprotein E exhibits isoform- specific neurotoxicity. *Neuroreport.* 1996; **7**: 2529-2532.

531. Tolar M, Marques MA, Harmony JK, Crutcher KA. Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein E and related synthetic peptides is receptor-mediated. *J. Neurosci.* 1997; **17**: 5678-5686.

532. Tolar M, Keller JN, Chan S, Mattson MP, Marques MA, Crutcher KA. Truncated apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate ApoE neurotoxicity [In Process Citation]. *J. Neurosci.* 1999; **19**: 7100-7110.

533. Sulkava R, Koskimies S, Wikstrom J, Palo J. HLA antigens in Alzheimer's disease. *Tissue Antigens.* 1980; **16**: 191-194.

534. Majsky A and Vojtechovsky M. Non-relationship between the HLA system and the senile form of Alzheimer's disease. *Arch. Psychiatr Nervenkr.* 1983; **233**: 381-383.

535. Small GW and Matsuyama SS. HLA-A2 as a possible marker for early-onset Alzheimer disease in men. *Neurobiol. Aging* 1986; **7**: 211-214.

536. Payami H, Kaye J, Becker W, Norman D, Wetzsteon P. HLA-A2, or a closely linked gene, confers susceptibility to early-onset sporadic Alzheimer's disease in men. *Neurology* 1991; **41**: 1544-1548.

537. Small GW, Ebeling SC, Matsuyama SS, Heyman A, Reisner EG, Renvoize EB, Sulkava R. Variable association of HLA-A2 in men with early-onset Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 1991; **12**: 375-377.

538. Middleton D, Mawhinney H, Curran MD, Edwardson JA, Perry R, McKeith I, Morris C, Ince PG, Neill D. Frequency of HLA-A and B alleles in early and late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1999; **262**: 140-142.

539. Payami H, Schellenberg GD, Zareparsi S, Kaye J, Sexton GJ, Head MA, Matsuyama SS, Jarvik LF, Miller B, McManus DQ, Bird TD, Katzman R, Heston L, Norman D, Small GW. Evidence for association of HLA-A2 allele with onset age of Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; **49**: 512-518.

540. Combarros O, Escribano J, Sanchez-Velasco P, Leyva-Cobian F, Oterino A, Leno C, Berciano J. Association of the HLA-A2 allele with an earlier age of onset of Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 1998; **98**: 140-141.

541. Ballerini C, Nacmias B, Rombola G, Marcon G, Massacesi L, Sorbi S. HLA A2 allele is associated with age at onset of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1999; **45**: 397-400.

542. Chung H, Roberts CT, Greenberg S, Rebeck GW, Christie R, Wallace R, Jacob HJ, Hyman BT. Lack of association of trinucleotide repeat polymorphisms in very-low- density lipoprotein receptor gene with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1996; **39**: 800-803.

543. Okuizumi K, Onodera O, Seki K, Tanaka H, Namba Y, Ikeda K, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Tsuji S. Lack of association of very low density lipoprotein receptor gene polymorphism with Caucasian Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1996; **40**: 251-254.

544. Pritchard ML, Saunders AM, Gaskell PC, Small GW, Conneally PM, Rosi B, Yamaoka LH, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. No association between very low density lipoprotein receptor (VLDL-R) and Alzheimer disease in American Caucasians. *Neurosci. Lett.* 1996; **209**: 105-108.

545. Lendon CL, Talbot CJ, Craddock NJ, Han SW, Wragg M, Morris JC, Goate AM. Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neurosci. Lett.* 1997; **222**: 187-190.

546. Fallin D, Gauntlett AC, Scibelli P, Cai X, Duara R, Gold M, Crawford F, Mullan M. 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.* 1997; **14**: 299-305.

547. Helbecque N, Dallongeville J, Codron V, Arveiler D, Ruidavets JB, Evans A, Cambien F, Fruchart JC, Amouyel P. The role of a triplet repeat sequence of the very low density lipoprotein receptor gene in plasma lipid and lipoprotein level variability in humans [In Process Citation]. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; **17**: 2759-2764.

548. McIlroy SP, Vahidassr MD, Savage DA, Patterson CC, Lawson JT, Passmore AP. Risk of Alzheimer's disease is associated with a very low-density lipoprotein receptor genotype in Northern Ireland. *Am. J. Med. Genet.* 1999; **88**: 140-144.

549. Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang CC, Gearing M, Salvo R. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 1993; **17**: 171-184.

550. Egensperger R, Kosel S, Schnopp NM, Mehraein P, Graeber MB. Association of the mitochondrial tRNA(A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuropathol.*

Appl. Neurobiol. 1997; **23**: 315-321.

551. Davis RE, Miller S, Herrnstadt C, Ghosh SS, Fahy E, Shinobu LA, Galasko D, Thal LJ, Beal MF, Howell N, Parker WDJ. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; **94**: 4526-4531.

552. Tanno Y, Okuizumi K, Tsuji S. mtDNA polymorphisms in Japanese sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 1998; **19**: S47-S51

553. Janetzky B, Schmid C, Bischof F, Frolich L, Gsell W, Kalaria RN, Riederer P, Reichmann H. Investigations on the point mutations at nt 5460 of the mtDNA in different neurodegenerative and neuromuscular diseases. *Eur. Neurol.* 1996; **36**: 149-153.

554. Zsurka G, Kalman J, Csaszar A, Rasko I, Janka Z, Venetianer P. No mitochondrial haplotype was found to increase risk for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 1998; **44**: 371-373.

555. Hirano M, Shtilbans A, Mayeux R, Davidson MM, DiMauro S, Knowles JA, Schon EA. Apparent mtDNA heteroplasmy in Alzheimer's disease patients and in normals due to PCR amplification of nucleus-embedded mtDNA pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; **94**: 14894-14899.

556. Davis JN and Parker WDJ. Evidence that two reports of mtDNA cytochrome c oxidase "mutations" in Alzheimer's disease are based on nDNA pseudogenes of recent evolutionary origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; **244**: 877-883.

557. Sheu KF, Cooper AJ, Koike K, Koike M, Lindsay JG, Blass JP. Abnormality of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in fibroblasts from familial Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1994; **35**: 312-318.

558. Mastrogiacomo F, Bergeron C, Kish SJ. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1993; **61**: 2007-2014.

559. Gibson GE, Sheu KF, Blass JP. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J. Neural Transm.* 1998; **105**: 855-870.

560. Nakano K, Ohta S, Nishimaki K, Miki T, Matuda S. Alzheimer's disease and DLST genotype [letter]. *Lancet* 1997; **350**: 1367-1368.

561. Sheu KF, Brown AM, Haroutunian V, Kristal BS, Thaler H, Lesser M, Kalaria RN, Relkin NR, Mohs RC, Lilius L, Lannfelt L, Blass JP. Modulation by DLST of the genetic risk of Alzheimer's disease in a very elderly population. *Ann. Neurol.* 1999; **45**: 48-53.

562. Sheu KF, Brown AM, Kristal BS, Kalaria RN, Lilius L, Lannfelt L, Blass JP. A DLST genotype associated with reduced risk for Alzheimer's disease. *Neurology* 1999; **52**: 1505-1507.

563. Kunugi H, Nanko S, Ueki A, Isse K, Hirasawa H. DLST gene and Alzheimer's disease [letter]. *Lancet* 1998; **351**: 1584-1585.

564. Abraham CR, Shirahama T, Potter H. Alpha 1-antichymotrypsin is associated solely with amyloid deposits containing the beta-protein. Amyloid and cell localization of alpha 1-antichymotrypsin. *Neurobiol. Aging* 1990; **11**: 123-129.

565. Rozemuller JM, Abbink JJ, Kamp AM, Stam FC, Hack CE, Eikelenboom P. Distribution pattern and functional state of alpha 1-antichymotrypsin in plaques and vascular amyloid in Alzheimer's disease. A immunohistochemical study with monoclonal antibodies against native and inactivated alpha 1-antichymotrypsin. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1991; **82**: 200-207.

566. Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. 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.* 1995; **10**: 486-488.

567. Thome J, Baumer A, Kornhuber J, Rosler M, Riederer P. Alpha-1-antichymotrypsin bi-allele polymorphism, apolipoprotein-E tri- allele polymorphism and genetic risk of Alzheimer's syndrome. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 1995; **10**: 207-212.

568. Yoshiiwa A, Kamino K, Yamamoto H, Kobayashi T, Imagawa M, Nonomura Y, Yoneda H, Sakai T, Nishiwaki Y, Sato N, Rakugi H, Miki T, Ogihara T. alpha 1-Antichymotrypsin as a risk modifier for late-onset Alzheimer's disease in Japanese apolipoprotein E epsilon 4 allele carriers. *Ann. Neurol.* 1997; **42**: 115-117.

569. Morgan K, Morgan L, Carpenter K, Lowe J, Lam L, Cave S, Xuereb J, Wischik C, Harrington C, Kalsheker NA. Microsatellite polymorphism of the alpha 1-antichymotrypsin gene locus associated with sporadic Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 1997; **99**: 27-31.

570. Nacmias B, Tedde A, Latorraca S, Piacentini S, Bracco L, Amaducci L, Guarnieri BM, Petruzzi C, Ortenzi L, Sorbi S. Apolipoprotein E and alpha1-antichymotrypsin polymorphism in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1996; **40**: 678-680.

571. Didierjean O, Martinez M, Campion D, Hannequin D, Dubois B, Martin C, Puel M, Thomas AC, Pasquier F, Moreau O, Babron MC, Penet C, Agid Y, Clerget-Darpoux F, Frebourg T, Brice A. No effect of the alpha1-antichymotrypsin A allele in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1997; **63**: 103-105.

572. Talbot C, Houlden H, Craddock N, Crook R, Hutton M, Lendon C, Prihar G, Morris JC, Hardy J, Goate A. Polymorphism in AACT gene may lower age of onset of Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1996; **7**: 534-536.

573. Haines JL, Pritchard ML, Saunders AM, Schildkraut JM, Growdon JH, Gaskell PC, Farrer LA, Auerbach SA, Gusella JF, Locke PA, Rosi BL, Yamaoka L, Small GW, Conneally PM, Roses AD, Pericak-Vance M. No association between alpha 1-antichymotrypsin and familial Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996; **802:35-41**: 35-41.

574. Itabashi S, Arai H, Matsui T, Matsushita S, Muramatsu T, Higuchi S, Trojanowski JQ, Sasaki H. Absence of association of alpha1-antichymotrypsin polymorphisms with Alzheimer's disease: a report on autopsy-confirmed cases. *Exp. Neurol.* 1998; **151**: 237-240.

575. Bass MP, Yamaoka LH, Scott WK, Gaskell PC, Welsh-Bohmer KA, Roses AD, Saunders AM, Haines JL, Pericak-Vance MA. No association of alpha1-antichymotrypsin flanking region polymorphism and Alzheimer disease risk in early- and late-onset Alzheimer disease patients. *Neurosci. Lett.* 1998; **250**: 79-82.

576. Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H. Lack of Genetic Associations of Alpha-1-Antichymotrypsin Polymorphism with Alzheimer-Type Neuropathological Changes or Sporadic Alzheimer's Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 1999; **10**: 221-225.

577. Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, van der Spek AF, Rubinstein HM, Lubrano T, La Du BN. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; **50**: 1086-1103.

578. Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1997; **6**:

1933-1936.

579. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1978; **4**: 273-277.

580. Carson KA, Geula C, Mesulam MM. Electron microscopic localization of cholinesterase activity in Alzheimer brain tissue. *Brain Res.* 1991; **540**: 204-208.

581. Gomez-Ramos P, Bouras C, Moran MA. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase on neurofibrillary degeneration sites in the brains of aged and Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* 1994; **640**: 17-24.

582. Brindle N, Song Y, Rogaeva E, Premkumar S, Levesque G, Yu G, Ikeda M, Nishimura M, Paterson A, Sorbi S, Duara R, Farrer L, St George-Hyslop P. Analysis of the butyrylcholinesterase gene and nearby chromosome 3 markers in Alzheimer disease. *Hum. Mol. Genet.* 1998; **7**: 933-935.

583. Crawford F, Fallin D, Suo Z, Abdullah L, Gold M, Gauntlett A, Duara R, Mullan M. The butyrylcholinesterase gene is neither independently nor synergistically associated with late-onset AD in clinic- and community- based populations. *Neurosci. Lett.* 1998; **249**: 115-118.

584. Hiltunen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Koivisto A, Lehtovirta M, Ryynanen M, Riekkinen PS, Soininen H. Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 genes do not act in synergy in Finnish late-onset Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* 1998; **250**: 69-71.

585. Russ C, Powell J, Lovestone S, Holmes C. K variant of butyrycholinesterase and late-onset Alzheimer's disease [letter] [see comments]. *Lancet* 1998; **351**: 881

586. Singleton AB, Smith G, Gibson AM, Woodward R, Perry RH, Ince PG, Edwardson JA, Morris CM. No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1998; **7**: 937-939.

587. Helbecque N, Cottel D, hermant X, Guez D, Amouyel P. The butyrylcholinesterase K variant is not associated with Alzheimer's disease. *Alzheimer Res.* 1998; **1**: 309-313.

588. Wragg M, Hutton M, Talbot C. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Collaborative Group [see comments]. *Lancet* 1996; **347**: 509-512.

589. Kehoe P, Williams J, Holmans P, Liddell M, Lovestone S, Holmes C, Powell J, Neal J, Wilcock G, Owen MJ. Association between a PS-1 intronic polymorphism and late onset Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1996; **7**: 2155-2158.

590. Higuchi S, Muramatsu T, Matsushita S, Arai H, Sasaki H. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease [letter; comment] [see comments]. *Lancet* 1996; **347**: 1186

591. Scott WK, Yamaoka LH, Locke PA, Rosi BL, Gaskell PC, Saunders AM, Conneally PM, Small GW, Farrer LA, Growdon JH, Roses AD, Pericak-Vance MA, Haines JL. No association or linkage between an intronic polymorphism of presenilin-1 and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease. *Genet. Epidemiol.* 1997; **14**: 307-315.

592. Perez-Tur J, Wavrant-De VF, Lambert JC, Chartier-Harlin MC. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. The Alzheimer's Study Group [letter; comment]. *Lancet* 1996; **347**: 1560-1561.

593. Lendon CL, Myers A, Cumming A, Goate AM, St. A polymorphism in the presenilin 1 gene does not modify risk for Alzheimer's disease in a cohort with sporadic early onset. *Neurosci. Lett.* 1997; **228**: 212-214.

594. Tysoe C, Whittaker J, Cairns NJ, Atkinson PF, Harrington CR, Xuereb J, Wilcock G, Rubinsztein DC. Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy- confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1997; **222**: 68-69.

595. Cai X, Stanton J, Fallin D, Hoyne J, Duara R, Gold M, Sevush S, Scibelli P, Crawford F, Mullan M. No association between the intronic presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease in clinic and population-based samples. *Am. J. Med. Genet.* 1997; **74**: 202-203.

596. Wu X, Jiang S, Lin S, Tang G, Feng G, Qian Y, Wang D, Ren D, Gu N. No association between the intronic presenilin 1 polymorphism and Alzheimer's disease in the Chinese population. *Am. J. Med. Genet.* 1999; **88**: 1-3.

597. Mann DM, Pickering-Brown SM, Bayatti NN, Wright AE, Owen F, Iwatsubo T, Saido TC. An intronic polymorphism in the presenilin-1 gene does not influence the amount or molecular form of the amyloid beta protein deposited in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1997; **222**: 57-60.

598. Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, Heun R. A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1999; **45**: 666-668.

599. Baum L, Chen L, Masliah E, Chan YS, Ng HK, Pang CP. Lipoprotein lipase mutations and Alzheimer's disease. *Am. J. Med. Genet.* 1999; **88**: 136-139.

600. Papassotiropoulos A, Bagli M, Feder O, Jessen F, Maier W, Rao ML, Ludwig M, Schwab SG, Heun R. Genetic polymorphism of cathepsin D is strongly associated with the risk for developing sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1999; **262**: 171-174.

601. Hu Q, Kukull WA, Bressler SL, Gray MD, Cam JA, Larson EB, Martin GM, Deeb SS. The human FE65 gene: genomic structure and an intronic biallelic polymorphism associated with sporadic dementia of the Alzheimer type. *Hum. Genet.* 1998; **103**: 295-303.

602. Csaszar A, Kalman J, Szalai C, Janka Z, Romics L. Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1997; **230**: 151-154.

603. Montoya SE, Aston CE, DeKosky ST, Kamboh MI, Lazo JS, Ferrell RE. Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease [letter] [published erratum appears in Nat Genet 1998 Aug;19(4):404]. *Nat. Genet.* 1998; **18**: 211-212.

604. Kehoe PG, Russ C, McIlory S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R, Dynan K, Williams N, Neal J, Cairns NJ, Wilcock G, Passmore P, Lovestone S, Williams J, Owen MJ. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease [letter]. *Nat. Genet.* 1999; **21**: 71-72.

605. Kehoe P, Wavrant-De VF, Crook R, Wu WS, Holmans P, Fenton I, Spurlock G, Norton N, Williams H, Williams N, Lovestone S, Perez-Tur J, Hutton M, Chartier-Harlin MC, Shears S, Roehl K, Booth J, Van Voorst W, Ramic D, Williams J, Goate A, Hardy J, Owen MJ. A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1999; **8**: 237-245.

606. 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. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12 [see comments]. *JAMA* 1997; **278**: 1237-1241.

607. Wu WS, Holmans P, Wavrant-DeVrieze F, Shears S, Kehoe P, Crook R, Booth J, Williams N, Perez-Tur J, Roehl K, Fenton I, Chartier-Harlin MC, Lovestone S, Williams J, Hutton M, Hardy J, Owen MJ, Goate A. Genetic studies on chromosome 12 in late-onset Alzheimer disease [see

comments]. *JAMA* 1998; **280**: 619-622.

608. 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. Evidence for an Alzheimer disease susceptibility locus on chromosome 12 and for further locus heterogeneity [see comments]. *JAMA* 1998; **280**: 614-618.

609. Zubenko GS, Hughes HB, Stiffler JS, Hurtt MR, Kaplan BB. A genome survey for novel Alzheimer disease risk loci: results at 10-cM resolution. *Genomics* 1998; **50**: 121-128.

610. Zubenko GS, Hughes HB, Stiffler JS. Neurobiological correlates of a putative risk allele for Alzheimer's disease on chromosome 12q. *Neurology* 1999; **52**: 725-732.

611. Van Leuven F, Cassiman JJ, Van Den Berghe H. Primary amines inhibit recycling of alpha 2M receptors in fibroblasts. *Cell* 1980; **20**: 37-43.

612. Narita M, Bu G, Holtzman DM, Schwartz AL. The low-density lipoprotein receptor-related protein, a multifunctional apolipoprotein E receptor, modulates hippocampal neurite development. *J. Neurochem.* 1997; **68**: 587-595.

613. Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 1995; **82**: 331-340.

614. Knauer MF, Orlando RA, Glabe CG. Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res.* 1996; **740**: 6-14.

615. Williams KR, Saunders AM, Roses AD, Armati PJ. Uptake and internalization of exogenous apolipoprotein E3 by cultured human central nervous system neurons. *Neurobiol. Dis.* 1998; **5**: 271-279.

616. Fagan AM, Bu G, Sun Y, Daugherty A, Holtzman DM. Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor- related protein. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 30121-30125.

617. Muller W, Meske V, Berlin K, Scharnagl H, Marz W, Ohm TG. Apolipoprotein E isoforms increase intracellular Ca2+ differentially through a omega-agatoxin IVa-sensitive Ca2+-channel. *Brain Pathol.* 1998; **8**: 641-653.

618. Zuliani G and Hobbs HH. Tetranucleotide lenght polymorphism 5' of the alpha2-macroglobulin receptor (A2MR)/LDL receptor-related protein (LRP) gene. *Hum. Mol. Genet.* 1994; **1994**: 215-215.

619. Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Thomas RG, Thal LJ, Katzman R. 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.

620. Matthijs G, Devriendt K, Cassiman JJ, Van Den Berghe H, Marynen P. Structure of the human alpha-2 macroglobulin gene and its promotor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; **184**: 596-603.

621. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 11539-11542.

622. Van Gool D, De Strooper B, Van Leuven F, Triau E, Dom R. alpha 2-Macroglobulin expression in neuritic-type plaques in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 1993; **14**: 233-237.

623. Rebeck GW, Harr SD, Strickland DK, Hyman BT. 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.* 1995; **37**: 211-217.

624. Du Y, Ni B, Glinn M, Dodel RC, Bales KR, Zhang Z, Hyslop PA, Paul SM. alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein. *J. Neurochem.* 1997; **69**: 299-305.

625. Qiu WQ, Borth W, Ye Z, Haass C, Teplow DB, Selkoe DJ. Degradation of amyloid beta-protein by a serine protease-alpha2- macroglobulin complex. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 8443-8451.

626. Hughes SR, Khorkova O, Goyal S, Knaeblein J, Heroux J, Riedel NG, Sahasrabudhe S. Alpha2-macroglobulin associates with beta-amyloid peptide and prevents fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; **95**: 3275-3280.

627. Matthijs G and Marynen P. A deletion polymorphism in the human alpha-2-macroglobulin (A2M) gene. *Nucleic. Acids. Res.* 1991; **19**: 5102

628. Poller W, Faber JP, Klobeck G, Olek K. 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.* 1992; **88**: 313-319.

629. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson BJ, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease [see comments]. *Nat. Genet.* 1998; **19**: 357-360.

630. Liao A, Nitsch RM, Greenberg SM, Finckh U, Blacker D, Albert M, Rebeck GW, Gomez-Isla T, Clatworthy A, Binetti G, Hock C, Mueller-Thomsen T, Mann U, Zuchowski K, Beisiegel U, Staehelin H, Growdon JH, Tanzi RE, Hyman BT. Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1998; **7**: 1953-1956.

631. Guillaume D, Bertrand P, Dea D, Davignon J, Poirier J. Apolipoprotein E and low-density lipoprotein binding and internalization in primary cultures of rat astrocytes: isoform-specific alterations. *J. Neurochem.* 1996; **66**: 2410-2418.

632. Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM. Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1995; **33**: 174-178.

633. Growdon WB, Cheung BS, Hyman B, Rebeck GW. Lack of allelic imbalance in APOE e3/e4 brain mRNA expression in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1999; **272**: 83-86.

634. Mui S, Briggs M, Chung H, Wallace RB, Gomez-Isla T, Rebeck GW, Hyman BT. 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* 1996; **47**: 196-201.

635. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, Garcia MA, Aldudo J, Vazquez J, Valdivieso F. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene [In Process Citation]. *FEBS Lett.* 1998; **421**: 105-108.

636. Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat. Genet.* 1998; **18**: 69-71.

637. Town T, Paris D, Fallin D, Duara R, Barker W, Gold M, Crawford F, Mullan M. The -491A/T apolipoprotein E promoter polymorphism association with Alzheimer's disease: independent risk and linkage disequilibrium with the known APOE polymorphism. *Neurosci. Lett.* 1998; **252**: 95-98.

638. Ahmed AR, MacGowan SH, Culpan D, Jones RW, Wilcock GK. The -491A/T polymorphism of the Apolipoprotein E gene is associated with the ApoEepsilon4 allele and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1999; **263**: 217-219.

639. Laws SM, Taddei K, Martins G, Paton A, Fisher C, Clarnette R, Hallmayer J, Brooks WS, Gandy SE, Martins RN. The -491AA polymorphism in the APOE gene is associated with increased plasma apoE levels in Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1999; **10**: 879-882.

640. Song YQ, Rogaeva E, Premkumar S, Brindle N, Kawarai T, Orlacchio A, Yu G, Levesque G, Nishimura M, Ikeda M, Pei Y, O'Toole C, Duara R, Barker W, Sorbi S, Freedman M, Farrer L, St. Absence of association between Alzheimer disease and the -491 regulatory region polymorphism of APOE. *Neurosci. Lett.* 1998; **250**: 189-192.

641. Roks G, Cruts M, Bullido MJ, Backhovens H, Artiga MJ, Hofman A, Valdivieso F, Van Broeckhoven C, van Duijn CM. The -491 A/T polymorphism in the regulatory region of the apolipoprotein E gene and early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1998; **258** : 65-68.

642. Toji H, Maruyama H, Sasaki K, Nakamura S, Kawakami H. Apolipoprotein E promoter polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci. Lett.* 1999; **259**: 56-58.

643. Brayne C, Gill C, Huppert FA, Barkley C, Gehlhaar E, Girling DM, O'Connor DW, Paykel ES. Vascular risks and incident dementia: results from a cohort study of the very old. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 1998; **9**: 175-180.

644. Sparks DL, Liu H, Scheff SW, Coyne CM, Hunsaker JC. Temporal sequence of plaque formation in the cerebral cortex of non- demented individuals. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1993; **52**: 135-142.

645. Sparks DL, Scheff SW, Liu H, Landers TM, Coyne CM, Hunsaker JC. Increased incidence of neurofibrillary tangles (NFT) in non-demented individuals with hypertension. *J. Neurol. Sci.* 1995; **131**: 162-169.

646. Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slooter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study [see comments]. *Lancet* 1997; **349** : 151-154.

647. Ong WY, He Y, Suresh S, Patel SC. Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* 1997; **79**: 359-367.

648. Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1996; **66**: 2429-2435.

649. Lehtimaki T, Pirttila T, Mehta PD, Wisniewski HM, Frey H, Nikkari T. Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 1995; **95**: 39-42.

650. Lefranc D, Vermersch P, Dallongeville J, Daems-Monpeurt C, Petit H, Delacourte A. Relevance of the quantification of apolipoprotein E in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1996; **212**: 91-94.

651. Merched A, Blain H, Visvikis S, Herbeth B, Jeandel C, Siest G. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late-onset Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 1997; **145**: 33-39.

652. Xu Y, Berglund L, Ramakrishnan R, Mayeux R, Ngai C, Holleran S, Tycko B, Leff T, Shachter NS. A common Hpa I RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. *J. Lipid Res.*

1999; **40**: 50-58.

653. Lai E, Riley J, Purvis I, Roses A. A 4-Mb high-density single nucleotide polymorphism-based map around human APOE. *Genomics* 1998; **54**: 31-38.

654. Poduslo SE, Neal M, Herring K, Shelly J. The apolipoprotein CI A allele as a risk factor for Alzheimer's disease [In Process Citation]. *Neurochem. Res.* 1998; **23**: 361-367.

655. Wavrant-DeVrieze F, Perez-Tur J, Lambert JC, Frigard B, Pasquier F, Delacourte A, Amouyel P, Hardy J, Chartier-Harlin MC. Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1997; **227**: 68-70.

656. Fallin D, Kundtz A, Town T, Gauntlett AC, Duara R, Barker W, Crawford F, Mullan M. 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.* 1997; **233**: 145-147.

657. Kamboh MI, Ferrell RE, DeKosky ST. Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. *Neurosci. Lett.* 1998; **244**: 65-68.

658. 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**: 1289-1292.

659. Beffert U, Arguin C, Poirier J. The polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor- related protein gene is weakly associated with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1999; **259**: 29-32.

660. Singleton AB, Gibson AM, McKeith IG, Ballard CA, Perry RH, Ince PG, Edwardson JA, Morris CM. Alpha2-macroglobulin polymorphisms in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies [In Process Citation]. *Neuroreport.* 1999; **10**: 1507-1510.

661. Rogaeva EA, Premkumar S, Grubber J, Serneels L, Scott WK, Kawarai T, Song Y, Hill DL, Abou-Donia SM, Martin ER, Vance JJ, Yu G, Orlacchio A, Pei Y, Nishimura M, Supala A, Roberge B, Saunders AM, Roses AD, Schmechel D, Crane-Gatherum A, Sorbi S, Bruni A, Small GW, Pericak-Vance MA. An alpha-2-macroglobulin insertion-deletion polymorphism in Alzheimer disease [letter] [see comments]. *Nat. Genet.* 1999; **22**: 19-22.

662. Dow DJ, Lindsey N, Cairns NJ, Brayne C, Robinson D, Huppert FA, Paykel ES, Xuereb J, Wilcock G, Whittaker JL, Rubinsztein DC. Alpha-2 macroglobulin polymorphism and Alzheimer disease risk in the UK [letter] [see comments]. *Nat. Genet.* 1999; **22**: 16-17.

663. de Knijff P and van Duijn CM. Role of APOE in Dementia:A Critical Reappraisal. *Haemostasis* 1998; **28**: 195-201.

ANNEXE

Critères de Mac Khan et al. (mckhan).

1-Les critères pour le diagnostic clinique de "maladie d'Alzheimer probable" incluse :

-une démence diagnostiquée sur les données de la clinique et documentée par une échelle de type "mini mental status", échelle de démence de Blessed ou autre confirmée ultérieurement par des tests neuropsychologiques appropriés,
-des altérations portant sur au moins deux fonctions cognitives,
-une diminution progressive de la mémoire et d'uatres fonctions cognitives,
-l'absence de troubles de la conscience,
-un début entre 40 et 90 ans, le plus souvent après 65 ans, et une absence d'affections systémiques ou cérébrales qui pourraient, directement ou indirectement, être responsables d'altérations mnésiques ou de troubles cognitifs.

2-Le diagnostic de "maladie d'Alzheimer probable" est basé sur :

-la présence d'une aphasie, d'une apraxie, d'une agnosie,
-une réduction des activités quotidiennes et des perturbations comportementales,
-des antécédants familaiux de troubles similaires, surtout si une conformation histologique a été apportée,
-les résultats des examens paracliniques :
. pas d'anomalies du LCR à l'examen usuel;
. EEG normal ou présentant des altérations non spécifiques (ondes lentes);
. mise en évidence d'une atrophie cérébrale au scanner X, atrophie progressant sur plusieurs examens consécutifs.

3-D'autres manifestations cliniques sont compatibles avec le diagnostic de "maladie d'Alzheimer probable", après exclusion des autres causes de démence :

-présence de plateaux dans la progression de la maladie,
-symptômes associés de dépressions, insomnie, incontinence, délire, illusions, hallucinations, exacerbation brutale de manifestations verbales, émotionnelles ou physiques, troubles sexuels, amaigrissement, anomalies neurologiques notamment lorsque la maladie est à un stade avancé (hypertonie, myoclonie, troubles de la marche...),
-crise comitiales possibles à un âge avancé,
-scanner X normal pour l'âge.

4-Elements qui plaident contre le diagnostic de "maladie d'Alzheimer probable" :

-début soudain,
-signes neurologiques focaux (hémiparésie, déficit sensitif, déficit du champ visuel), troubles de la coordination survenant précocement en cours d'évolution.
-crise d'épilepsie ou torubles de la marche dés le début de la maladie.

5-Le diagnostic de "maladie d'Alzheimer probable" peut être porté :

-sur la base d'un syndrome démentiel, en l'absence d'autres étiologies reconnues de démence (affections neurologiques, psychiatriques ou maladie générale) et en présence de formes atypiques dans leur mode de début, leur présentation clinique ou leur évolution,
-en présence d'une seconde affection générale ou neurologique, qui pourrait causer la démence mais qui n'est pas considérée comme actuellement et dans le cas considéré responsable de cette démence,
-dans le cadre de la recherche clinique, ce diagnostic doit être retenu lorsqu'un déficit cognitif est isolé et s'aggrave progressivement en l'absence d'autre cause identifiable.

6-Les critères pour le diagnostic de "maladie d'Alzheimer certaine" sont :

-les critères cliniques pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable,
-la mise en évidence d'altérations histopathologiques caractéristiques obtenues par biopsie ou autopsie.

Mini mental test (MMSE)

Test (score de 0 à 30)

Orientation

1. Quel jour de la semaine sommes-nous ?
2. Quelle est la date aujourd'hui ?
3. En quel mois sommes-nous ?
4. En quelle saison sommes-nous ?
5. En quelle année sommes-nous ?
6. Où sommes nous ici ? (quel hôpital, quelle maison de retraite ?)
7. A quel étage sommes-nous ?
8. Dans quelle ville sommes-nous ?
9. Dans quelle département (province) sommes-nous ?
10. Dans quel pays sommes-nous ?

Enregistrement des données

11. Répétez les mots suivants : "citron, clé, ballon".
12. (l'examinateur doit prononcer ces mots au rythme de un par seconde). chaque réponse correcte=1.
13. En cas de difficulté, recommencer jusqu'à 5 fois.

Attention et calcul mental

14. soustraire 7 de 100
15. et ainsi de suite.
16. (chaque soustraction =1)
17. Maximum 5 réponses
18. correctes.

Mémoire

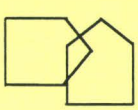
19. Vous souvenez vous
20. des trois mots que vous avez répétés
21. tout à l'heure ?

Langage

22. Qu'est ce que c'est que cela ? (montrer un crayon)
22. Qu'est ce que c'est que cela ? (montrer une montre)
23. Répétez : "pas de si ni de mais (chaque réponse correcte=1)
25. Faire exécuter au sujet les 3 ordres successifs suivants :
26. "Prenez cette feuille de papier, pliez la par le milieu, et posez-la par terre"
27. (maximum 3 points)
28. Lisez et faites ce qu'il y a sur cette feuille de papier ("fermez vos yeux").
29. Ecrivez une phrase de votre choix sur cette feuille.

Activité motrice

30. Copiez ce dessin sur cette feuille.



Echelle de Blessed A. Interrogatoire de l'entourage.

Les informations sont à obtenir auprès de l'entourage du malade, de préférence entourage immédiat, en contact étroit ou permanent avec lui. L'interrogatoire s'efforcera de préciser les modifications de l'autonomie, du mode de vie et de la personnalité, pendant les six derniers mois précédent l'examen. Pour les items 1,4,5,9,10,11 : préciser s'il existe une affection somatique associée susceptible de modifier l'évaluation.

NOM : Prénom :
Lien de Parenté avec le malade : Degré de connaissance du malade par l'entourage :
1 bon; 2 moyen; 3 mauvais
Cotation : 1 (oui ou incapacité totale)
1/2 (atteinte partielle, variable ou intermittente)
0 (non ou fonction intacte)

A. Changement dans les capacités pour les activités quotidiennes

1. Impossibilité de réaliser les tâches ménagères	1	1/2	0
(si pathologie associée génant l'appréciation, cocher et préciser en clair :			
2. Impossibilité de se débrouiller avec de petites sommes d'argent	1	1/2	0
3. Impossibilité de se rappeler de petites listes de choses par exemple pour les courses	1	1/2	0
4. Impossibilité de se répérer à l'intérieur du domicile	1	1/2	0
5. Impossibilité de se repérer à l'extérieur dans un quartier familier	1	1/2	0
6. Impossibilité d'interpréter les informations de l'environnement	1	1/2	0
7. Impossibilité de se remémorer les événements récents	1	1/2	0
8. Tendance à vivre dans le passé	1	1/2	0

B. Changement dans les habitudes

9. Nourriture:	proprement avec couverts appropriés	0
	salement avec cuillère seulement	1
	mange seulement des solides simples	2
	doit être nourri par un tiers	3
10. Habillement:	sans aide	0
	occasionnellement boutons mal placés	1
	ordre d'habillement défectueux, éléments couramment oubliés	2
	incapable de s'habiller	3
11. Contrôle sphinctérien:	complet	0
	lit souillé occasionnellement	1
	lit souillé fréquemment	2
	double incontinence	3

C. Changement dans la personnalité, les pôles d'intérêt, le comportement

12. Diminution de la souplesse d'esprit	1	0
13. Augmentation de l'égoïsme	1	0
14. Diminution de l'intérêt porté aux autres	1	0
15. Apparition d'une grossièreté	1	0
16. Augmentation de l'irritabilité et des mouvements d'humeurs	1	0
17. Rire dans des situations inappropriées	1	0
18. Indifférence	1	0
19. Délit sexuel (sans antécédent identique à l'âge adulte)	1	0
20. Renoncement à ce que le sujet aimait antérieurement	1	0
21. Initiative diminué	1	0
22. Hyperactivité sans motif	1	0

Total 28

Echelle de Blessed B. *Interrogatoire du patient*

A. Information

1. Quel est votre nom ?..... 1
2. Quel est votre âge ?..... 1
3. Quelle heure est-il ? (à 1/2 heure près)..... 1
4. Quelle partie de la journée sommes-nous ?..... 1
5. Quel jour de la semaine sommes-nous ?..... 1
6. Quelle date dans le mois ?..... 1
7. Quel mois sommes nous ?..... 1
8. En quelle saison sommes-nous ?..... 1
9. En quelle année sommes-nous ?..... 1
10. Où sommes-nous ?..... 1
11. Quel est le nom de l'hôpital ?..... 1
12. Dans quelle rue est-il ?..... 1
13. Dans quelle ville est-il ?..... 1
14. Qui est-ce ? (lui montrer deux personnes présentes)..... 2
    Donner ici le l'information du test de mémorisation D :
    Claude Moine, 64 rue de Sèvres, Paris

B. Mémoire des événements personnels

15. Quelle est votre date de naissance ?..... 1
16. Où êtes-vous né(e) ?..... 1
17. Où avez-vous été à l'école ?..... 1
18. Quel métier exerciez vous ?..... 1
19. En fonction de l'interrogatoire préalable de la famille, précisant s'il était marié ou s'il avait des frères et sœurs, pu s'il a connu ses parents;
    Quel est le nom de votre conjoint, concubin ou frère..... 1
20. Citez une des villes où vous avez travaillé..... 1
21. Nom de votre employeur..... 1

C. Mémoire des événements généraux

22. Date du début de la 1re guerre modiale..... 1/2 1
23. Date du début de la 2e guerre mondiale..... 1/2 1
24. Nom du président de la république..... 1
25. Nom du premier ministre..... 1

D. Mémorisation

26. Une adresse a été donée au patient 5 min plus tôt ,
    le malade s'en souvient-il ?..... 5

E. Concentration

27. Réciter les mois de l'année à l'envers en commençant par décembre.... 2 1 0
28. Compter de 1 à 20..... 2 1 0
29. Compter de 20 à 1..... 2 1 0

Score de Hachinski.

1-Début brutal..... 2

2-Aggravation par à-coups..... 1

3-Evolution fluctuante..... 1

4-Confusion nocturne..... 1

5-relative préservation de la personnalité..... 1

6-Dépression..... 1

7-Plaintes somatiques..... 1

8-Labilité émotionnelle..... 1

9-Antécédents d'HTA..... 1

10-Antécédents d'accidents vasculaires cérébraux..... 2

11-signes d'athérosclérose systémique..... 1

12-Signes neurologiques focaux..... 2

13-Symptômes neurologiques focaux..... 2

Score maximum de 18.

Score>7 : en faveur d'une démence artériopathique

Score<4 : en faveur d'une démence dégénérative primaire.

La loi de Hardy-Weinberg

C'est en 1908 que Hardy et Weinberg définirent la loi qui porte leur nom. Cette loi constitue la base de la génétique des populations. Elle suppose que les fréquences alléliques et génotypiques restent constantes au fil des générations dans une très grande population dans laquelle les mariages entre individus se font au hasard (panmixie), sans migration, ni sélection naturelle. De plus, la loi de Hardy-Weinberg permet de prévoir les fréquences alléliques à partir de la connaissance des fréquences génotypiques et inversement. Selon cette loi, si A_1 et A_2 sont les allèles d'un locus autosomique bi-allélique de fréquence respective p et q (avec q=1-p), les fréquences des trois génotypes possibles A_1A_1, A_1A_2 et A_2A_2, sont respectivement p^2, 2pq et q^2. Une population qui répond à cette distribution est dite en équilibre de Hardy-Weinberg pour le locus considéré. Si les fréquences observées sont différentes des fréquences attendues (test de χ^2), la population n'est pas en équilibre de Hardy-Weinberg. Pour qu'une conclusion puisse être donnée dans une étude génétique, il faut au préalable vérifier que les données suivent la loi de Hardy-Weinberg.

Le déséquilibre de liaison

Considérons deux locus bi-alléliques A et B d'allèles respectifs (A_1,A_2) et (B_1,B_2). La répartition des deux allèles sur un chromosome peut être (A_1,B_1), (A_1,B_2), (A_2,B_1) ou (A_2,B_2).

Appelons $P(A_1B_1)$ la fréquence avec laquelle on rencontre le chromosome porteur de A_1 et de B_1 dans la population, de même pour $P(A_1B_2)$, $P(A_2B_1)$ $P(A_2B_2)$.

Appelons $P(A_1)$, $P(A_2)$, $P(B_1)$, $P(B_2)$ les fréquences alléliques.

Si l'on suppose que les allèles de chaque locus sont distribués au hasard, on aura les relations suivantes :

$$P(A_1B_1) = P(A_1) \times P(B_1)$$

$$P(A_1B_2) = P(A_1) \times P(B_2)$$

$$P(A_2B_1) = P(A_2) \times P(B_1)$$

$$P(A_2B_2) = P(A_2) \times P(B_2)$$

On dit dans ce cas qu'il y a équilibre de liaison.

Cependant, il peut exister une différence entre les fréquences chromosomiques observées et les fréquences à l'équilibre. On définit alors le déséquilibre de liaison D comme la différence entre les fréquences chromosomiques observées et les fréquences théoriques à l'équilibre (égales au produit des fréquences alléliques).

☞ Si D est nul, les locus A et B sont indépendants. On parle d'équilibre entre les deux locus.

☞ Si D n'est pas nul, il y a déséquilibre de liaison entre les deux locus A et B.

⇨ Si $D>0$, les allèles rares des deux locus sont préférentiellement associés ensemble.

⇨ Si $D<0$, l'allèle rare de l'un des locus est préférentiellement associé à l'allèle fréquent de l'autre locus.

Informativité des polymoprhismes

L'informativité correspond à la probabilité d'un individu d'être hétérozygite au locus considéré, c'est à dire de porter à la fois deux allèles différents.

Cette probabilité dépend de la fréquence des allèles dans la popualtion et du nombre d'allèles pour la variation génomique considérée. Un marqueur multiallélique est beaucoup plus informatif qu'un marqueur biallélique car il comporte un grand nombre d'allèles et présente donc un degré d'hétérozygotie élevé (nombre de génotypes hétérozygotes/nombre de génotype totaux).

Le calcul de l'informativité ou PIC (polymorphism Information Content) d'un polymorphisme repose sur la loi de Hardy-Weinberg. Le pourcentage maximum d'hétérozygotie est de 2pq.

$$PIC = 1 - \left(p_A^2 + 2p_A q_a + q_a^2\right)$$

Cette formule peut être généralisée pour un locus polymorphe à x allèles de fréquence pi pour l'allèle Ai :

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^{x} p_i^2\right) - \sum_{i=1}^{x-1} \sum_{j=1+i}^{x} 2p_i^2 p_j^2$$

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE