

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Mahmoud Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 25/TS/2011

N° de série : 01/SN/2011

THESE

*En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences
Génétique et Biologie Moléculaire*

THEME

*ETUDE DE LA TOLERANCE AU GLUCOSE, INSULINE, CORTISOL, HOMOCYSTEINE ET DETERMINATION DU
POLYMORPHISME DES GENES APOE ET MTHFR DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER
ETUDE DE POPULATION : NORD CONSTANTINOIS*

Présentée par : *M^{er} OULDJAOUI AHMED*

Devant le jury:

Présidente :	D. SATTI	Prof. UNIVERSITE DE CONSTANTINE
Rapporteur :	N. ABADI	Prof. UNIVERSITE DE CONSTANTINE
Examineurs :	A. HAMRI	Prof. UNIVERSITE DE CONSTANTINE
	S. BENHARKAT	Prof. UNIVERSITE D'ANNABA
	D. BENDJEDDOU	Prof. UNIVERSITE DE GUELMA
	F. DJABI	Prof. UNIVERSITE DE SETIF

Année Universitaire: 2010-2011

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur Abadi Nouredine, mon directeur de thèse, directeur du laboratoire de Génétique et Biologie moléculaire au CHUC, pour m'avoir accueilli dans son équipe depuis quelques années. Par sa disponibilité, sa gentillesse et le degré d'humanisme dont il fait preuve, il s'est impliqué avec enthousiasme et esprit de responsabilité à tous les niveaux de conception des travaux de recherche qui ont abouti à la rédaction de cette thèse. Aussi, m'a-t-il prité pour un jeune frère en me faisant confiance durant des années et en m'ouvrant gracieusement toutes les portes du savoir. Jamais sans lui je n'aurais pu m'épanouir dans ces recherches. Viens trouver ici, Nouredine, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour toi.

Je ne peux m'empêcher de remercier tout particulièrement le Professeur Benlatrèche Cherifa médecin chef du service de biochimie et directrice de l'unité de recherche. Elle est la personne de l'ombre qui a permis de me lancer dans cette aventure. Qu'elle trouve ici l'aboutissement heureux de la confiance qu'elle porte à l'équipe du laboratoire de biologie et génétique moléculaire.

Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir acceptés d'être présidente et rapporteurs de ce mémoire, je tiens à remercier madame Satta Dalila Messieurs les Professeurs Hamri Abdelmadjid, Benharkat Sadek, Bendjedou D, et madame Djabi F. Je vous remercie pour tous les conseils forts utiles que vous m'avez prodigués pour la clarté du document final. Que vous ayez accepté de siéger dans le jury de cette thèse est pour moi un honneur. Trouvez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie chaleureusement les Docteurs Sifi Karima service de biochimie et Sifi Yamina service de neurologie pour leurs disponibilités, leurs gentillesse malgré leurs multiples tâches pour m'avoir accompagné tout au long de ces travaux dans la conduite et l'analyse des données. Elles se sont impliquées dans la validation des résultats et des techniques. Qu'elle trouve ici, l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également au Docteur Khodja Djamel et Mademoiselle Amari Hanane pour les précieux moments qu'ils ont consacrés pour m'aider dans la collette des échantillons des malades et dans la réalisation de certaines techniques pratiques. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Aux Docteurs Ramdane Said et Kouhil M, pour leurs collaborations et d'avoir voulu accepté le recrutement des patients Alzheimer au niveau de leurs cabinets, je les remercie infiniment.

Je tiens à remercier le personnel du laboratoire de biochimie du CHUC, et en particulier Boulakroune Zouheir, Brihmat Ahmed, Zoubida, Yasmina, Rami, Manel pour s'être impliqués dans ce travail. J'adresse un remerciement tout particulier à tout le personnel du secteur des analyses biochimiques et des dosages hormonaux.

Sommaire

ABBREVIATIONS

1. INTRODUCTION	1
2. REVUE DE LA LITTERATURE	4
2.1. La maladie d'Alzheimer	4
2.1.1. Historique	4
2.1.2. Épidémiologie, éco-épidémiologie	4
2.1.3. Épidémiologie prospective	5
2.1.4. Symptômes et évolution de la maladie	6
2.1.5. Anatomo-pathologie	7
2.1.5.1. L'atrophie corticale	7
2.1.5.2. Les plaques séniles (<i>ou plaques amyloïdes</i>)	8
2.1.5.3. Angiopathie amyloïde	10
2.1.5.4. Les dégénérescences neurofibrillaires	10
2.1.6. Le rôle central de l'APP dans la maladie d'Alzheimer	11
2.1.6.1. Les différentes isoformes de l'APP	12
2.1.6.2. Métabolisme de l'APP	14
2.1.6.3. Rôles de l'APP et de ses dérivés	16
2.1.6.3.1. Hypothèse de la cascade Amyloïde	17
2.1.6.3.2. Formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF)	19
2.1.6.3.3. Les protéines tau	21
2.1.6.3.4. Caractérisation des protéines tau pathologiques de la maladie d'Alzheimer	22
2.1.6.3.5. La protéine prion	24
2.1.7. Les neurotransmetteurs	24
2.2. APOLIPOPROTEINE E	25
2.2.1. Structure	25

2.2.2. Le gène de l'Apo E	26
2.2.3. Polymorphisme de l'Apo E	26
2.2.4. Fréquence des allèles de l'apo E dans le monde	28
2.2.5. La protéine apo E et ses modifications post-traductionnelles	28
2.2.6. Distribution tissulaire	29
2.2.7. Récepteurs de l'apo E	29
2.2.8. Rôle de l'apoE	29
2.2.9. Apolipoprotéine E et maladie d'Alzheimer	30
2.2.10. Apo E et peptide amyloïde	30
2.2.11. Apo E: élimination du peptide amyloïde	31
2.3. LIPIDES	32
2.3.1. Les triglycérides et acides gras	32
2.3.2. Cholestérol	33
2.3.3. Les lipides et la maladie d'Alzheimer	33
2.3.4. Les relations cholestérol / métabolisme de l'Aβ	34
2.4. DIABETE ET MALADIE D'ALZHEIMER	35
2.4.1. Obésité et maladie d'Alzheimer	35
2.4.2. Conséquences de l'hyperinsulinémie	36
2.4.3. L'hypothèse d'une contribution des glucides	37
2.4.4. La présence des produits terminaux de glycation	37
2.5. LE CORTISOL	40
2.5.1. Synthèse du cortisol	40
2.5.2. Transport du cortisol	40
2.5.3. Actions du cortisol	40

2.5.4. Cortisol et maladie d'Alzheimer	42
2.6. HOMOCYSTEINE	44
2.6.1. L'homocystéine et les vitamines du groupe B	44
2.6.2. Régulation du métabolisme de l'homocystéine	45
2.6.3. Homocystéine plasmatique	45
2.6.4. Homocystéine et maladie d'Alzheimer	47
2.7. MTHFR ET POLYMORPHISME GENETIQUE C677T	49
2.7.1. La protéine MTHFR	49
2.7.2. Rôle de la MTHFR	49
2.7.3. Gène de la MTHFR	51
2.7.4. Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR	53
2.7.5. Effets métaboliques de la mutation	53
2.7.5.1. Effet de la mutation sur l'homocystéine	53
2.7.5.2. Effet de la mutation sur les folates	54
2.7.6. Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR et MA	54
2.8. AUTRES FACTEURS DE RISQUE	56
2.8.1. Les maladies cardiovasculaires et la démence Alzheimer	56
2.8.2. Hypertension	56
2.8.3. L'inactivité physique	56
2.8.4. Facteurs hygiéno-diététiques	57
2.8.5. Le mercure comme cause possible pour les cas « non-familiaux » ?	57
2.8.6. L'aluminium	58
2.8.7. L'éducation, l'activité intellectuelle et l'optimisme	59

2.8.8. Les traumatismes crâniens	59
3. METHODOLOGIE	60
3.1. Recrutement	60
3.2. Critères diagnostics clinico-biologiques	60
3.3. Critères d'inclusion et d'exclusion	61
3.4. Questionnaire	62
3.5. Le prélèvement	62
3.6. Enregistrement	62
3.7. Méthodes de dosage des paramètres lipidiques	63
3.7.1. Dosage du cholestérol	63
3.7.2. Dosage des triglycérides	63
3.7.3. Le cholestérol HDL	64
3.7.4. Cholestérol LDL	64
3.7.5. Contrôle de qualité	64
3.7.6. Reproductibilité	65
3.8. Dosage de l'insuline	65
3.8.1. Principes biologiques de la procédure	65
3.8.2. Unité d'échantillonnage	66
3.9. Dosage du cortisol	67
3.9.1. Principes biologiques de la méthode	67
3.9.2. Unité d'échantillonnage	68
3.9.3. Unité de traitement	68
3.10. Dosage de l'homocysteine	69

3.10.1. Principe	69
3.10.2. Dosage	69
3.11. Extraction de l'ADN	70
3.11.1. Introduction	70
3.11.2.. Etape d'extraction d'ADN	71
3.12. Génotypage de l'apo E	73
3.12.1. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation (PCR)	74
3.12.2. Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR	74
3.12.3. Condition d'amplification	75
3.12.4. Contrôle de La taille des fragments amplifiés	76
3.12.5. La digestion du produit de PCR	76
3.12.6. Electrophorèse des fragments de restriction	78
3.13. Recherche de la mutation C677T du gène codant la MTHFR	80
3.13.1. Principe	80
3.13.2. Technique	80
3.14. Analyse statistique	83
3.14.1. Statistique descriptive	83
3.14.2. Tests de comparaison de variances	83
3.14.3. L'enquête analytique	84
3.14.4. Calcul de l'Odds ratio	84
3.14.5. Les intervalles de confiance	85
3.14.6. Choix de la "p value "	85
4. RESULTATS ET DISCUSSION	86

4.1. Répartition des sujets selon la pathologie et le sexe	86
4.2. Répartition par tranche d'âge	87
4.3. MMSE, évaluation du statut cognitif et du stade de la démence	89
4.4. Etude génétique de l'APOE	90
4.4.1. Les fréquences génotypiques de l'Apo E	90
4.4.2. Répartition des fréquences alléliques dans la population d'étude	93
4.4.3. Association génotypiques et alléliques et maladie d'Alzheimer	96
4.4.4. Répartition selon le nombre de copies	98
4.5. MTHFR et la mutation C677T	101
4.6. Etude des autres facteurs de risque	103
4.6.1. Le niveau d'étude	103
4.6.2. Les traumatismes crâniens	105
4.6.3. Dépression	106
4.6.4. Etude des autres facteurs de risque vasculaires dans la MA	107
4.6.4.1. Le tabagisme et l'alcool	108
4.6.4.1.1. Le tabagisme	109
4.6.4.1.2. Alcool	109
4.6.4.2. Le diabète	110
4.6.4.3. L'hypertension artérielle (HTA)	111
4.6.4.4. L'obésité	112
4.7. Etude du Profil lipidique	113
4.7.1. Le cholestérol	114

4.7.2. Le cholestérol HDL	117
4.7.3. Le cholestérol LDL	118
4.7.4. Les triglycérides	119
4.8. Insuline, Cortisol et Homocystéine	122
5. CONCLUSION	128
BIBLIOGRAPHIE	131
ANNEXES	173

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma comparant un cerveau sain (à droite) et un cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer	8
Figure 2: Les plaques senile	9
Figure 3: Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)	11
Figure 4: Séquences d'acides aminés constituant l'APP chez l'Homme et chez la Souris	13
Figure 5: Voies de dégradation de la protéine APP par les différentes sécrétases et production du peptide A β .	15
Figure 6: L'hypothèse de la cascade amyloïde	18
Figure 7: Le chemin séquentiel et hiérarchisé de la DNF	20
Figure 8: Les six isoformes de protéines tau (45 kDa - 65 kDa)	21
Figure 9: Le code barre des maladies neurodégénératives	22
Figure 10: Sous-populations neuronales vulnérables et isoformes de protéines tau	23
Figure 11 : Le modèle de l'apolipoprotéine E humaine	25
Figure 12 : Le gène de l'apoE et modifications post transcriptionnelles	26
Figure 13 : Apolipoprotéine E et son polymorphisme	27
Figure 14 : Réaction inflammatoire induite par la stimulation des récepteurs aux produits finaux de glycation (RAGE)	38
Figure 15 : Effets convergents de la glycation et de la lipoperoxydation sur la formation des plaques séniles par : réactions chimiques, signaux cellulaires, effets biologiques	39
Figure 16 : Schéma de l'axe hypothalamo-hypophysaire normal et pathologique : insuffisances surrénaliennes périphérique ou centrale. Les neurones hypothalamiques	41
Figure 17 : Schéma métabolique des hormones stéroïdes dans le cortex surrénalien	43
Figure 18 : Métabolisme de l'homocystéine	44

Figure 19 : Illustration de toutes les formes de l'Hcy présentes dans le plasma	46
Figure 20 : Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR	50
Figure 21 : Gène, protéine et polymorphisme de la MTHFR	52
Figure 22 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% des fragments amplifiés (292pb) par PCR du gène Apo E	76
Figure 23 : Digestion par Hha I des trois allèles	77
Figure 24 : Profil d'électrophorèse sur gel d'acrylamide des fragments issus par clivage de HhaI présentant différents génotypes d'apo E	79
Figure 25 : Profil électrophorétique des fragments digérés par l'enzyme HinfI sur gel d'agarose 3%	82
Figure 26 : répartition des malades selon le sexe	86
Figure 27 : Répartition des malades et témoins en tranche d'âge	88
Figure 28 : Evaluation du statut cognitif et du stade de la démence	90
Figure 29 : Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes	91
Figure 30 : Répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes	94
Figure 31 : répartition des malades selon leur niveau d'étude	104
Figure 32 : fréquences des autres facteurs de risque	107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Tableau exprimant les résultats du contrôle de qualité préalablement réalisé	65
Tableau II: Tailles des fragments de restriction en paire de base (Pb) correspondants aux six génotypes possibles (3 homozygotes et 3 hétérozygotes)	79
Tableau III : répartition des sujets selon la pathologie et le sexe	86
Tableau IV: Répartition des malades et témoins par tranche d'âge	87
Tableau V : Moyennes d'âge dans les groupes malades et témoins	88
Tableau VI: Evaluation du statut cognitif et du stade de la démence	90
Tableau VII: Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes	91
Tableau VIII : Fréquences alléliques de l'Apo E dans le groupe témoin et malade	93
Tableau IX : Fréquences alléliques de l'Apo E dans différentes études dans le monde	95
Tableau X : Calcul des Odds ratio des sujets malades ayant un allèle ϵ_4 , ϵ_2 , ϵ_3/ϵ_4 et ϵ_2/ϵ_3 par rapport aux témoins ayant un génotype 3/3	96
Tableau XI : Estimation de l'impact des différents génotypes du gène codant pour l'apoE en fonction de l'origine ethnique sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer	98
Tableau XII : répartition selon le nombre de copies de l'apoE	98
Tableau XIII : Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la MTHFR C677T chez les sujets témoins et les sujets MA	101

Tableau XIV: Distribution des allèles et des génotypes de la MTHFR C677T dans la MA	102
Tableau XV: représentant le nombre et le % des malades selon leur niveau d'étude	104
Tableau XVI: Fréquence des traumatismes crâniens chez les malades et les témoins	105
Tableau XVII: Fréquence de la dépression chez les malades et les témoins	106
Tableau XVIII : fréquence des fumeurs et alcooliques chez les malades et les témoins	108
Tableau XIX: fréquence du diabète chez les malades et les témoins	110
Tableau XX : fréquence de l'HTA chez les malades et les témoins	111
Tableau XXI : fréquence de l'obésité chez les malades et les témoins	113
Tableau XXII : Comparaison des Moyennes des paramètres lipidiques (mg/dl) dans l'Alzheimer et Chez les témoins	114
Tableau XXIII: Résumé de quelques études associant le profil lipidique et la MA	120
Tableau XXIV : Variations de l'insuline, cortisol, et homocystéine	122

ABBREVIATIONS

Aβ:	amyloid β peptid
ACAT:	Acyl-CoA Cholesterol acyl Transferase
ADAM:	a Disintegrin And Metalloprotease
AGL:	acides gras libres
AGNE :	acides gras non estérifiés
Apo:	apoprotéine
APP :	amyloid protein precursor
sAPP:	forme sécrétée de l'APP
APLP:	Amyloid Precursor Like Proteins
Arg:	Arginine
AVC:	accident Vasculaire Cérébral
BACE:	β -site APP Cleaving Enzyme
BBP:	Bleu de bromophénol
BET:	Bromure d'ethidium
bp :	paire de base
BHMT :	betaine-homocysteine methyltransferase
CBS :	cystathionine synthase
CE :	cholestérol estérifié
CETP :	Cholesteryl-ester transfer protein
CHOTHF:	10-formyltétrahydrofolate
CL :	cholestérol libre
CM :	chylomycron
CML :	cellule musculaire lisse
Cys :	Cystéine
DCB :	Dégénérescence Cortico-Basale
DGV :	dégénérescences granulo-vasculaires
DHF:	Dihydrofolate
DM 2:	Diabète mellitus de type 2
DNF :	dégénérescences neurofibrillaires
DO:	Densité optique
EC:	esters de cholestérol
EDTA:	Ethylene diamine tetra-acetic acid
EOAD:	early onset Alzheimer diseases
FAD:	flavin adenine dinucleotide
Hcy:	Homocystéine
Hhcy:	Hyperhomocysteinémie
HDL:	high density lipoprotein
HPA:	Hypothalamo-Pituitary-Adrenal axis
HSL:	Hormone Sensitive Lipase
HTA:	hypertension artérielle

IDE:	Insulin Degrading Enzyme
IDL:	intermediate density lipoprotein
IL-β:	Interleukine β
IL-6:	Interleukine 6
KPI:	Kuntz-like Protease Inhibitor
LCAT:	Lecithin cholesterol-acyltransferase
LDL:	low density lipoprotein
LOAD:	Late onset Alzheimer diseases
LRP:	low density related protein
LH:	lipase hépatique
Lp:	lipoprotéine
LPL:	lipoprotéine lipase
LRP :	LDL receptor-related protein
MA :	Maladie d'Alzheimer
MAP :	microtubule-associated proteins
MCI:	Mild Cognitive Impairment
MMSE:	Mini Mental state examination
MS:	Méthionine Synthase
MTHFR:	La 5, 10-méthylène tétrahydrofolate réductase
PbA :	La protéine β -amyloïde
PHF :	Paired helical filaments
PkC :	phospho-kinases à calcium
PrP:	protéine prion
PS :	plaques séniles
PSP :	Paralyse Supranucléaire Progressive
R-LDL :	récepteur des LDL
SAH:	S-adénosyl-L-homocystéine
SAHH:	S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase bovine
SAM:	S-adenosylhomocysteine
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
TACE:	Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme
Tau:	tubule associated unit
TG:	triglyceride
THF:	Tétrahydrofolate
TNFα:	Tumor Necrosis Factor α
TS:	Thymidylate Synthase
VLDL:	very low density lipoprotein

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

La maladie d'Alzheimer cause la plus fréquente des démences du sujet âgé, est une affection hétérogène tant sur le plan clinique que génétique dont l'expression clinique est le résultat de multiples facteurs génétiques et environnementaux.

L'évolution démographique et le vieillissement progressif de la population laissent supposer que la maladie d'Alzheimer va devenir, dans les vingt prochaines années, un problème majeur de santé publique et de société.

Le déclin cognitif représente un stade intermédiaire entre vieillissement normal et démence [1]. Savoir dépister une démence au stade initial est d'une importance capitale, pour une meilleure prise en charge des sujets atteints pouvant réduire le coût de prise en charge à la société de 50 % [2].

Le développement du dysfonctionnement mnésique et cognitif, ainsi que les lésions neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer semblent être sous l'influence de facteurs biologiques qui font l'objet de nombreuses recherches.

Ainsi :

- le polymorphisme de l'apolipoprotéine E qui influence la composition et l'homéostasie lipidique et lipoprotéique plasmatique [3]. Il augmente la probabilité de survenue, ainsi qu'il avance l'âge de début de l'affection [4, 5]. L'allèle ApoE4 est un facteur de risque majeur- ou gène de susceptibilité – associé à 40 à 65 % des cas sporadiques et familiaux de MA. Plusieurs études en recherche fondamentale de Biochimie, Biologie cellulaire et sur les animaux transgéniques ont suggérés des mécanismes potentiels pouvant expliquer la contribution de l'apoE4 à la pathogénie de la MA [6].

- le rythme circadien du cortisol plasmatique peut être affecté par l'âge, avec des niveaux trouvés plus élevés le soir et bas le matin, de même que la sensibilité au feedback négatif aux glucocorticoïdes avec le vieillissement chez l'homme. L'activité de l'axe HPA (Hypothalamo –Pituitary - Adrenal axis) maillon essentiel dans le processus de régulation de la réponse au stress en général [7], peut être altéré par l'exposition répéter chronique et soutenu au stress et très probablement par le processus du vieillissement lui-même [8]. Il est connu qu'une sécrétion excessive de glucocorticoïde durant le stress peut à la longue et en parallèle avec l'effet du vieillissement, entraîner au niveau du système nerveux des effets adverses et tout particulièrement au niveau des structures hippocampiques, relais important dans la régulation de la réponse au stress [9]. L'intérêt de l'exploration de l'axe HPA dans la maladie d'Alzheimer découle des constatations sur l'animal que l'élévation des niveaux du

cortisol plasmatique accélère la perte neuronale au niveau des structures hippocampiques. De plus les lésions de l'hippocampe ont tendance à augmenter l'activité de l'axe HPA (hypothèse de la cascade glucocorticoïde de SAPOLSKY et MCEWEN).

- l'homocystéine suscite un intérêt scientifique important. L'enthousiasme manifesté par différentes équipes de recherche de disciplines diverses au cours de la 2^e Conférence internationale sur le métabolisme de l'homocystéine (CIMH), organisée du 26 au 29 avril 1998 à Nimègue (Pays-Bas), en a été la démonstration. Initialement étudiée dans l'exploration des anomalies métaboliques congénitales des acides aminés soufrés, l'analyse de l'homocystéine s'est étendue à d'autres domaines cliniques dont la maladie d'Alzheimer [10-17]. Malgré ces différentes observations, la relation entre l'hyperhomocystéinémie et la pathologie est loin d'être évidente.

- la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) joue un rôle crucial dans le métabolisme des folates et de l'homocystéine [18]. Le rôle de la MTHFR dans certaines maladies a été rapporté par Mudd *et al.* [19]. La caractérisation de l'ADNc de *MTHFR* [20-22] a permis de répertorier plusieurs mutations de *MTHFR* chez des patients homocystinuriques, ainsi qu'un variant commun, 677C → T (A222V), qui correspond à la forme thermolabile de l'enzyme [21]. Ce polymorphisme génétique (une mutation communément observée dans la population normale) est la cause génétique la plus fréquente d'hyperhomocystéinémie.

- parmi les complications du diabète, déclin cognitif et démence sont largement rapportés dans la littérature. Les auteurs évoquent l'hypothèse d'un lien direct entre les processus responsables de la perte neuronale et les cellules B pancréatiques dans les deux affections DM2 et MA. Il y a peu d'études réalisées sur la maladie d'Alzheimer [23], bien que cette affection soit revenue à l'avant scène scientifique internationale que depuis un peu plus de deux décennies, elle bénéficie de budgets de recherche colossaux.

La revue thématique présentée en introduction à cette étude illustre bien, la complexité des interrelations, facteurs de risque génétique et environnementaux avec l'expression phénotypique de la MA.

Les études épidémiologiques concernant l'association : tolérance au glucose, insulino-résistance, diabète de type 2 et Maladie d'Alzheimer montrent cela; toutefois beaucoup de controverses restent à régler dans ce champs de recherche.

Les données épidémiologiques concernant la relation stress cumulé, processus de vieillissement et MA sont encore éparses. Enfin très peu (ou pas) d'investigateurs ont explorés l'interaction associée de ces deux conditions avec la maladie d'Alzheimer.

En 2009, la maladie d'Alzheimer touche plus de la moitié des cas de démence de la personne âgée dans les pays riches.

A partir de toutes ces données et devant le manque de travaux scientifiques sur la MA en Algérie, notre étude se propose d'en explorer les aspects suivants :

- Comparer le statut glycémique, insulinémique, cortisolémique et homocysteinémique; chez les sujets atteints de MA avec ceux des sujets sains témoins.
- Déterminer les facteurs vasculaires (Cholestérol, triglycérides, C-HDL, C-LDL, HTA, homocystéine etc...) présents chez les patients atteints de MA, et les comparer à ceux des sujets témoins.
- Déterminer les génotypes ApoE, MTHFR (C677T), les fréquences alléliques $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ et C, T du groupe de sujets atteints de MA et les comparer avec ceux du groupe de sujets témoins.
- Apprécier l'association entre ces différents facteurs et la maladie d'Alzheimer.

REVUE DE LA LITTERATURE

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. La maladie d'Alzheimer

2.1.1. Historique

Aloïs Alzheimer (1864-1915) est un médecin psychiatre et un neuropathologiste allemand du début du XX^e siècle qui étudia le cerveau des personnes atteintes de démences grâce à une nouvelle technique de coloration à l'aniline et des imprégnations argentiques.

En 1907, Aloïs Alzheimer décrit pour la première fois les altérations anatomiques observées sur le cerveau d'une patiente de 51 ans, atteinte de démence, elle présentait également des hallucinations visuelles et des troubles de l'orientation. En 1911, Alzheimer découvrait un autre cas identique.

Le psychiatre Emil Kraepelin proposa que la maladie porte le nom d'Alzheimer.

Autour des années 80, l'intérêt général pour la maladie d'Alzheimer grandit. En effet, elle est de plus en plus fréquente, les sujets à risque étant de plus en plus nombreux du fait de l'augmentation de l'espérance de vie. Avec l'avancée de la recherche, on connaît les protéines qui composent les plaques séniles, principales altérations du système nerveux centrales en lien avec la maladie d'Alzheimer.

2.1.2. Épidémiologie, éco-épidémiologie

La prévalence de la maladie d'Alzheimer augmente fortement avec l'âge, elle est liée au fait que nous vivons plus vieux, mais également à des causes environnementales : les japonais ont le plus bas taux de cette maladie, sauf quand ils vivent dans un autre pays. Aux USA les données statistiques 2000, recensent 4,5 millions de personnes atteintes de MA. Les estimations statistiques prévoient une multiplication par 3 de ce nombre en 2050 soit 13,5 millions de personnes [24].

Plus de 10 % des sujets âgés de plus de 65 ans développent une démence : la maladie d'Alzheimer (MA), à l'origine de plus de la moitié des cas de démence du sujet âgé, a une prévalence qui double tous les 5 ans, et ainsi sa prévalence passe de 1% à l'âge de 60 ans, à plus de 40 % chez les sujets âgés de 85 ans et plus [25].

Un nombre croissant de chercheurs estiment qu'il faut mieux comprendre ces facteurs environnementaux pour maîtriser cette pandémie [26].

La géographie de l'incidence de la maladie laisse supposer des causes environnementales aux formes sporadiques qui sont les plus fréquentes. En Effet :

- L'incidence - aux mêmes âges - est toujours plus forte dans les pays riches qu'ailleurs, le Japon est une exception pour les pays industrialisés et riches, la prévalence de la maladie y est presque 10 fois plus faible qu'en France.
- Ceci est vrai pour les populations urbaines supposées plus exposées aux pollutions (par exemple en Inde développent 5,4 fois moins d'Alzheimer qu'en Pennsylvanie) [27], mais aussi pour les populations rurales.
- De même les afro-américains vivant aux États-Unis sont beaucoup plus touchés que les Yorubas du Niger, le risque de MA pour ces individus est deux fois moindre au Niger (1,15%) qu'en Amérique du Nord (2,52%) (à âge égal), ce qui plaide aussi pour une cause environnementale, au moins dans 50 % des cas) [28]. Cette maladie est plus rare en Asie (alors que la population chinoise connaît aussi un vieillissement important suite à la politique de contrôle de la natalité soutenue par son gouvernement depuis les années 1960) [29].

2.1.3. Épidémiologie prospective

En Europe, l'incidence des démences devrait croître en 50 ans de 1,9 million de nouveaux cas par an à 4,1 millions, selon Wancata et al [30].

En Belgique, 5 à 10 % des plus de 65 ans sont touchés et près de 20 % des plus de 80 ans [31].

En France, l'étude « PAQUID » (1988-2001) a fait ressortir que 17,8 % des personnes de plus de 75 ans sont atteintes de la maladie d'Alzheimer ou d'un syndrome apparenté. D'après une évaluation ministérielle de 2004, environ 860 000 personnes seraient touchées par la maladie d'Alzheimer en France. Un chiffre qui pourrait atteindre 1,3 million en 2020 et 2,1 millions en 2040. Le nombre de nouveaux cas est d'environ 225 000 par an [32]. La prévalence des démences chez les plus de 75 ans atteint presque 18% (maladie d'Alzheimer à 80%) [33]. Ceci représente environ 900 000 malades (et dans les années 2000 environ 220 000 nouveaux cas par an), avec des tendances et projections très alarmantes : 1 200 000 malades en 2020, et plus de 2 000 000 vers 2040 [34].

En raison d'un accroissement rapide prévu de la population Américaine, la prévalence de la MA quadruplera chez les sujets de 85 ans et plus (8 millions de personnes), tandis qu'elle

doublera chez les sujets âgés entre 75 ans et 84 ans (4,8 millions de personnes) et restera constante dans la tranche d'âge de 65 ans à 74 ans (0,5 millions).

Selon une statistique fournie par la Société algérienne de neurologie et de neurophysiologie clinique (SANNOC), 100 000 personnes sont atteintes par le syndrome d'Alzheimer dans le pays. **(En Algérie l'espérance de vie est passée de 50 ans en 1962 à 76 ans en 2007).**

2.1.4. Symptômes et évolution de la maladie

L'évolution de la maladie se traduit par l'installation insidieuse d'un syndrome démentiel qui se caractérise par un affaiblissement de la mémoire (Amnésie), du jugement, de l'attention et de la capacité à résoudre des problèmes. Il est suivi par des troubles du langage (Aphasie), une difficulté à effectuer certains gestes (Apraxie) et une perte de la reconnaissance des objets (Agnosie). On parle ainsi de la maladie des quatre « A » [35].

Son évolution, des premiers symptômes jusqu'au décès, se constate sur une durée moyenne de 8 ans [36].

On reconnaît trois grands stades dans la progression de la maladie : le stade de début (troubles, notamment de la mémoire et du langage, discrets mais pouvant altérer l'accomplissement de tâches quotidiennes...), le stade modéré (les troubles s'accroissent, désorientation temporelle et spatiale nette, jugement et affectivité perturbés...) et enfin le stade sévère (perte de la mémoire, langage déstructuré, fonctions exécutives nulles, comportement perturbé...).

Cette affection a des retentissements importants sur les proches (conjoint(e), enfants, famille, amis...). En effet, 8 patients sur 10 souffrant de cette maladie cérébrale dégénérative vivent à domicile. Cet impact sur les proches est alors aussi bien psychologique (dépression, troubles du sommeil...), que physique (50% de mortalité en plus chez les aidants) ou financier [37].

Le diagnostic

En l'absence de marqueurs biologiques de la MA, le diagnostic reste essentiellement clinique du vivant du patient. Il pourra être ensuite validé par un examen neuropathologique. Le diagnostic clinique repose sur l'histoire de la maladie, l'interrogatoire de l'entourage, sur l'exploration neuropsychologique et comportementale, et sur l'examen clinique [38]. Les troubles de la mémoire sont les premiers symptômes et dominent le tableau clinique dans la

plupart des cas. Les critères diagnostiques utilisés en général sont ceux de Mc Khann et al (NINCDS-ADRDA) [39].

- L'évaluation neuropsychologique a deux objectifs: authentifier le déclin cognitif et caractériser les troubles, ce qui contribue au diagnostic étiologique de la démence, par les tests comme le MMS (Mini Mental state examination de Folstein), simple, rapide, universel et le test de Grober et Buschke particulièrement intéressant pour définir le type de troubles mnésiques orientant vers une origine corticale, hippocampique ou sous-cortico-frontale. Une quantification des troubles est également possible (Neuropsychiatric Inventory ou NPI de Cummings) [40].

- L'imagerie est un élément important du diagnostic: l'imagerie structurale (scanner X, IRM) évalue l'atrophie régionale hippocampique par la mesure de l'épaisseur de la partie interne du lobe temporal droit [41], mais aussi lobaire, frontale ou temporo-polaire; elle évalue également la participation vasculaire et les anomalies de substance blanche; et bien sur elle élimine les classiques causes « neurochirurgicales ».

Le diagnostic certain de la maladie d'Alzheimer est un diagnostic post-mortem. Il est établi à partir de la présence de deux types de lésions en grande quantité dans les régions hippocampique et corticales associatives : il s'agit des plaques amyloïdes et des neurones en dégénérescence neurofibrillaires. On observe généralement une atrophie cérébrale.

2.1.5. Anatomo-pathologie

La nature neurodégénérative de la maladie d'Alzheimer se traduit par l'installation progressive et irréversible dans le cortex cérébral de lésions histopathologiques bien précises, qui sont les plaques séniles (PS) [42], les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) [43], et les dégénérescences granulo-vasculaires (DGV). Elles s'accompagnent d'une dépopulation neuronale avec atrophie corticale.

2.1.5.1. L'atrophie corticale

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le cerveau peut perdre 8 à 10 % de son poids tous les dix ans, contre 2 % chez un sujet sain selon la plupart des auteurs [44, 45]. L'atrophie corticale s'accompagne d'une dilatation des ventricules cérébraux et des sillons

corticaux ainsi que d'une perte neuronale affectant particulièrement le système cholinergique (noyau basal de Meynert, septum, cortex entorhinal, amygdale et hippocampe) (figure 1).

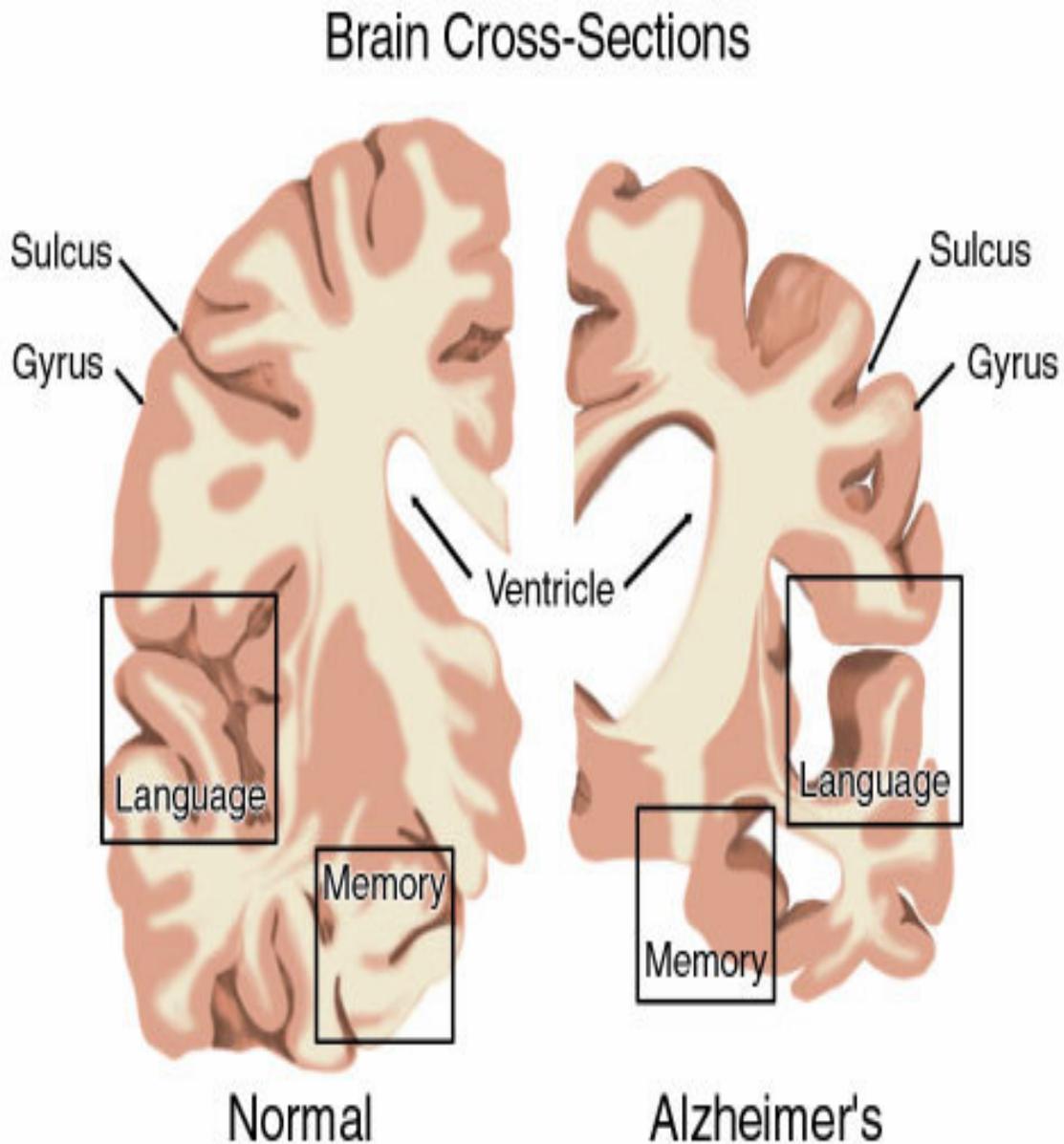


Figure 1: Schéma comparant un cerveau sain (à droite) et un cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer [46]

2.1.5.2. Les plaques séniles (ou plaques amyloïdes)

Ces plaques, essentiellement localisées dans le néocortex et l'hippocampe, correspondent à l'accumulation extracellulaire d'un peptide dit « β -amyloïde » (PbA) ou « peptide $A\beta_{42}$ » (42, parce que constituée de 42 acides aminés). C'est une protéine pathogène (neurotoxique) et insoluble qui est aussi la forme la plus amyloïdogène du bêta-amyloïde.

Cette anomalie permettrait une entrée anormale de calcium dans le neurone, ce qui activerait la microglie (réaction inflammatoire) [47], entraînant la mort inéluctable du neurone par nécrose ou par apoptose (*figure 2*).

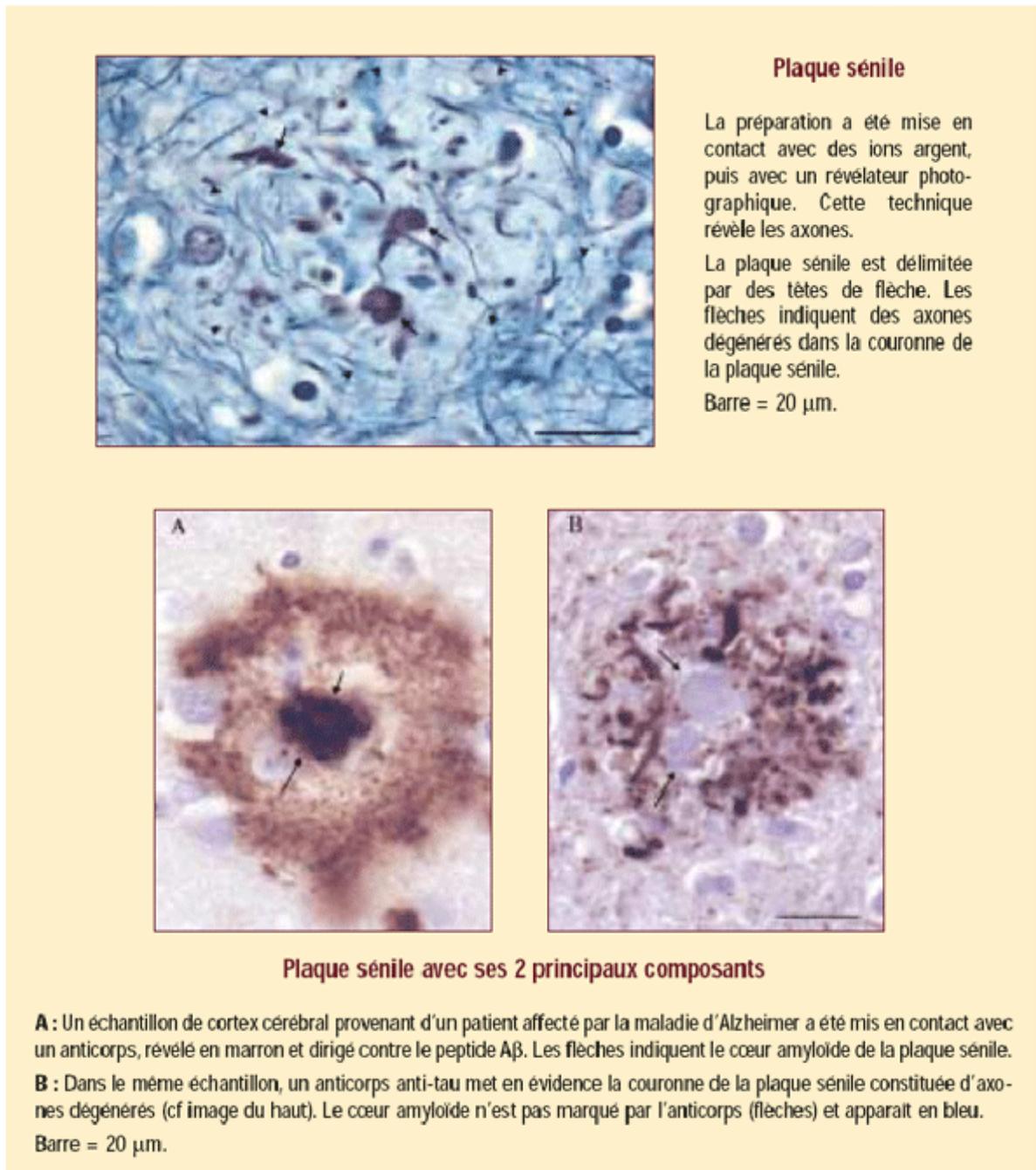


Figure 2: Les plaques séniles [48].

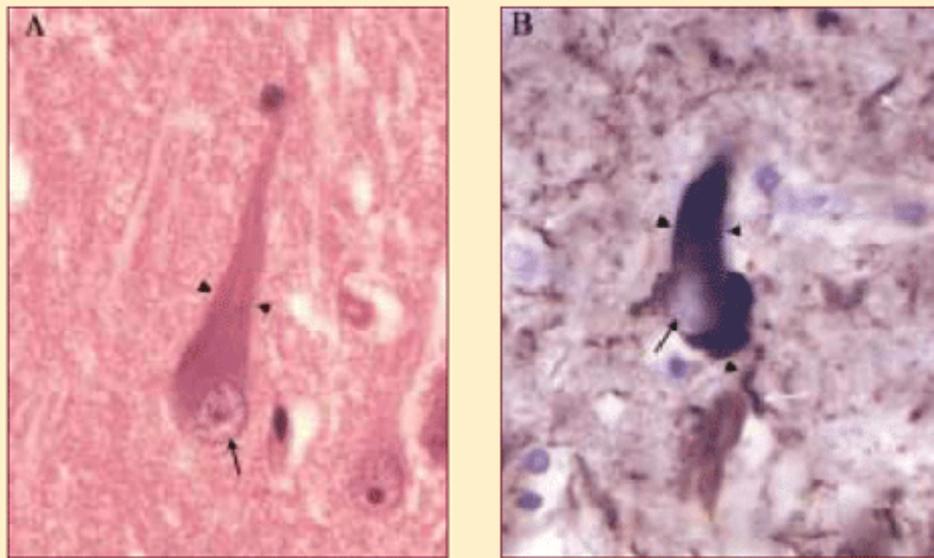
En microscopie électronique le centre amyloïde est constitué d'un enchevêtrement de filaments rectilignes formés du peptide amyloïde $A\beta$.

2.1.5. 3. Angiopathie amyloïde

Ce terme concerne l'accumulation de matériel protéique amyloïde dans la paroi des vaisseaux cérébraux, fréquemment observée chez les malades Alzheimer [49]. Il désigne également une affection autonome, appartenant au groupe des démences artériopathiques [50], caractérisée par des hémorragies et des ramollissements cérébraux récidivant.

2.1.5.4. Les dégénérescences neurofibrillaires

Des lésions cellulaires semblent consécutives à une augmentation de la capacité de phosphorylation (estérification des fonctions alcool des acides aminés hydroxylés) de la protéine tau. Ces lésions semblent induites par l'accumulation anormale d'un dérivé de la protéine tau hyperphosphorylée, responsable de la formation de filaments appariés : lorsque la protéine tau est hyperphosphorylée, elle se détache des microtubules, et va se conformer en paire de filaments hélicoïdaux pathologiques, qui s'agrègent en amas de neurofibrilles causant une neurodégénérescence fibrillaire progressive. Les substances nécessaires au fonctionnement du neurone ne pouvant plus être acheminées jusqu'au corps cellulaire, le neurone finit par mourir (*figure 3*).



Dégénérescence neurofibrillaire (DNF)

A : Coloration d'un échantillon d'hippocampe provenant d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer. Coloration par l'hématoxyline éosine. La DNF apparaît en bleu dans le corps cellulaire du neurone (têtes de flèche) dont le noyau est indiqué par une flèche.

B : Un anticorps dirigé contre la protéine tau a été appliqué sur le même échantillon. Il est révélé en marron. Les têtes de flèche indiquent une dégénérescence neurofibrillaire dans un neurone dont le noyau est indiqué par une flèche.

Les flèches blanches indiquent des fibres tortueuses (accumulation de protéine tau dans les dendrites).

Barre = 20 μ m.

Figure 3: Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) [48].

2.1.6. Le rôle central de l'APP dans la maladie d'Alzheimer

L'étude des rares cas familiaux où la MA se transmet de façon quasi systématique et se déclenche précocement (avant 60 ans). L'étude de ces familles a conduit à la découverte de mutations sur le gène du précurseur de la protéine β -amyloïde (APP), cloné pour la première fois en 1987 [51].

Plusieurs mutations de l'APP et des protéines nommées présénilines (PS) ont été découvertes et sont responsables de formes héréditaires de MA à développement précoce et à transmission autosomale dominante [52]. Ces mutations perturbent le métabolisme de l'APP, dont le clivage protéolytique anormal ou excessif conduit à l'accumulation de protéine β -amyloïde ($A\beta$) dans le cerveau.

2.1.6.1. Les différentes isoformes de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire dont le gène se situe sur le chromosome 21 humain. Ce gène code pour plusieurs isoformes de l'APP membranaire (mAPP), de 365 à 770 acides aminés, obtenues par épissage alternatif de l'ARN messager [53]. Ces isoformes de mAPP contiennent toutes la séquence de 39 à 43 acides aminés correspondant à l'A β retrouvée dans les plaques séniles. Les isoformes principales, que sont l'APP₆₉₅, l'APP₇₅₁ et l'APP₇₇₀, diffèrent structurellement par leur nombre d'acides aminés, et par la présence ou non d'une séquence analogue des inhibiteurs de protéase à sérine (domaine KPI pour *Kunitz-like Protease Inhibitor*) (figure 4). Alors que la forme neuronale prépondérante est l'APP₆₉₅ dépourvue de domaine KPI, les isoformes APP₇₅₁ et APP₇₇₀ possédant un domaine KPI sont exprimées majoritairement dans les tissus périphériques et par les cellules gliales du cerveau [54-56].

L'APP fait partie d'une famille de protéines comprenant également des APLP (pour *Amyloid Precursor Like Proteins*) très conservée sur le plan de l'évolution [57-59].



Mus musculus

Séquence APP murin isoforme 695

```

1 mlpslallll aawt ralev ptdgnaglla epqiamfogr lnmhmvnqng kw dspsgk
61 toidtkegil qycqevypel qitnvveanq pvtiqnwckr grkqckthph fvipyrcolv
121 efvsdallvp dkckflhger mdvcethlhw htvaketcse kstnlhdygm llpogidkfr
181 gvefvccpla eesdnvdsad aeedsdsvww ggadtdyadg sedkvvevae eeevaeveee
241 eadddeded gdevseeeae pyeeateritt siattttttt esvaevvr sv caeaeatgpc
301 dkyletpgde nehahfqkak erleakh rer msqvmrewee aerqaknlpk adkkaviqhf
361 gekvesleqe aanerqqive thmarveaml ndrriialen yitalqavpp rphvfnmlk
421 kyvraeqkdr qhtikhfehv rmvdpkkaaq irsqvmthlr viyermmqsl sllynvpava
481 eeiqdevdel lqkeqnysdd vlnnisepr isygdalmp sltetkttve llpvngefsl
541 ddllqpwah ffg dsvpant en evepvdarpa adrglttrpg sgltniktee ise v kmdaef
601 rhdsqyevth qklvffaedv qsnkqaiigl mvqgvviatv ivitlvmlkk kqytsihhg
661 vevdaavtpe erhlsknqgn gyenptykff eqmgn

```

Séquence APP humain isoforme 695

```

1 mlpglallll aawtaralev ptdgnaglla epqiamfogr lnmhmvnqng kw dspsgk
61 toidtkegil qycqevypel qitnvveanq pvtiqnwckr grkqckthph fvipyrcolv
121 efvsdallvp dkckflhger mdvcethlhw htvaketcse kstnlhdygm llpogidkfr
181 gvefvccpla eesdnvdsad aeedsdsvww ggadtdyadg sedkvvevae eeevaeveee
241 eadddeded gdevseeeae pyeeateritt siattttttt esvaevvr sv caeaeatgpc
301 dkyletpgde nehahfqkak erleakh rer msqvmrewee aerqaknlpk adkkaviqhf
361 gekvesleqe aanerqqive thmarveaml ndrriialen yitalqavpp rprhvfmlk
421 kyvraeqkdr qhtikhfehv rmvdpkkaaq irsqvmthlr viyermmqsl sllynvpava
481 eeiqdevdel lqkeqnysdd vlnnisepr isygdalmp sltetkttve llpvngefsl
541 ddllqpwah ffg adsvpant en evepvdarpa adrglttrpg sgltniktee ise v kmdaef
601 rhdsqyevth qklvffaedv qsnkqaiigl mvqgvviatv ivitlvmlkk kqytsihhg
661 vevdaavtpe erhlsknqgn gyenptykff eqmgn

```

Séquence APP humain isoforme 751

```

1 mlpglallll aawtaralev ptdgnaglla epqiamfogr lnmhmvnqng kw dspsgk
61 toidtkegil qycqevypel qitnvveanq pvtiqnwckr grkqckthph fvipyrcolv
121 efvsdallvp dkckflhger mdvcethlhw htvaketcse kstnlhdygm llpogidkfr
181 gvefvccpla eesdnvdsad aeedsdsvww ggadtdyadg sedkvvevae eeevaeveee
241 eadddeded gdevseeeae pyeeateritt siattttttt esvaevvr sv caeaeatgpc
301 famlarxyfd vteqkcapff yqccqanrn fkeevcmav cga mqsll ttttaas tpdavdkyl
361 etpgdeneha hfqkakerle akh rermsqv mreweeaaerq aknlpkadkk aviqhfqekv
421 esleqeaane rqqivethma rveamlnrrr lalenyita lqavpprprh vfnmlkkyvr
481 aeqkdrqhti khfehvrmvd pkkaaqirsq vmthlrviye mmqslsllly nvpavaeeiq
541 devdellqke qnysddvian miseprisys ndalmpsite kttvellpv ngefslldlq
601 pwhsfqadvp pantenevep vdarpaadrg lttrpgsglt nikteeisev k mdaefrhds
661 qvevhqklv ffaedvqsnk qaiiglmvqgv vviatvivit lvmlkkkqyt sihhgvvevd
721 aavtpeerhl sknqngyen ptykffeomq n

```



Homo sapiens

Séquence APP humain isoforme 770

```

1 mlpglallll aawtaralev ptdgnaglla epqiamfogr lnmhmvnqng kw dspsgk
61 toidtkegil qycqevypel qitnvveanq pvtiqnwckr grkqckthph fvipyrcolv
121 efvsdallvp dkckflhger mdvcethlhw htvaketcse kstnlhdygm llpogidkfr
181 gvefvccpla eesdnvdsad aeedsdsvww ggadtdyadg sedkvvevae eeevaeveee
241 eadddeded gdevseeeae pyeeateritt siattttttt esvaevvr sv caeaeatgpc
301 famlarxyfd vteqkcapff yqccqanrn fkeevcmav cga mqsll kttqeplard
361 pvtlgttaas tpdavdkyle tpgdenehah fqkakerlea kh rermsqv mreweeaaerq
421 knlpkadkka viqhfqekve sleqeaaner qqlvethmar veamlnrrr lalenyita
481 qavpprprhv fnmlkkyvra eqkdrqhtlk hfehvrmvd kkaaqirsq vmthlrviyer
541 mmqslsllly nvpavaeeiq evdellqkeq nysddvianm isepris ygn dalmpsltet
601 kttvellpv ngefslldlq whsfqadvp antenevepv darpaadrg lttrpgsgltn
661 ikteeisevk mdaefrhdsq yevvhqklvf faedvqsnk qaiiglmvqgv vviatvivit
721 vmlkkkqyts ihgvvevda avtpeerhls knqngyenp tykffeomq n

```

Figure 4: Séquences d'acides aminés constituant l'APP chez l'Homme (isoformes 695, 751 et 770) et chez la Souris (exemple de l'isoforme 695) Zones vertes : domaine KPI présent dans les isoformes 751 et 770 Zones rouges: différences Homme/Souris Zones bleues : polymorphismes des isoformes humaines Souligné: séquence correspondant à la protéine β -amyloïde de 40 ou 42 acides aminés Encadré gras : séquence RERMS responsable des effets trophiques [60].

Chez l'Homme et chez la Souris il existe en plus de l'APP, une APLP1 et une APLP2, Ceci laisse à penser que l'APP et les APLP dériveraient d'un seul gène ancestral commun [57]. L'APP et les APLP possèdent des propriétés fonctionnelles redondantes [61], en effet, la double mutation est létale lorsqu'elle implique à la fois le gène de l'APP et celui de l'APLP2, supposant une forte homologie fonctionnelle de ces deux protéines [62].

2.1.6.2. Métabolisme de l'APP

Les sécrétases

L'APP membranaire peut être clivé au niveau de trois sites endoprotéolytiques, par trois activités enzymatiques : les α -, β - et γ -sécrétases [63] (*figure 5*). Traditionnellement, les différentes voies de sécrétion sont qualifiées d'amyloïdogéniques, si elles génèrent de l'A β , ou de non amyloïdogéniques, si elles n'en génèrent pas [64]. L'équilibre entre la production et la dégradation du peptide A β se stabilise dans les conditions normales à un seuil en dessous duquel le peptide reste soluble. Le dérèglement de cet équilibre peut conduire à l'accumulation d'A β .

La voie amyloïdogénique fait intervenir les activités β - et γ -sécrétases qui clivent le mAPP de part et d'autre de la séquence correspondant à l'A β . Cette voie conduit à la libération dans l'espace extracellulaire du peptide A β et d'une forme sécrétée de l'APP, le sAPP β . Le fragment C-terminal de l'APP restant est le fragment P7. Les clivages par la β - et la γ -sécrétase peuvent survenir au niveau du réticulum endoplasmique, au sein du réseau trans-golgien, au niveau de la membrane plasmique ou encore dans des endosomes après réinternalisation du mAPP. Les β -sécrétases identifiées à ce jour sont nommées BACE-1 et BACE-2 (pour *β -site APP Cleaving Enzyme*), et sont deux protéases acides membranaires [65]. Les recherches thérapeutiques actuelles contre la maladie d'Alzheimer visent, entre autres, à réduire l'activité de BACE-1 afin de réduire la production d'A β . En raison de la présence de sites alternatifs de coupure par les β - et γ -sécrétases, ce peptide peut comporter de 32 à 43 acides aminés, les formes principales étant les peptides A β [1-40] et A β [1-42]. Une fois généré, les peptides A β sont éliminés par différents mécanismes de clairance parmi lesquels la dégradation par diverses peptidases dont l'enzyme IDE dégradant l'insuline ou encore la néprilysine [66], mais ils peuvent aussi s'accumuler.

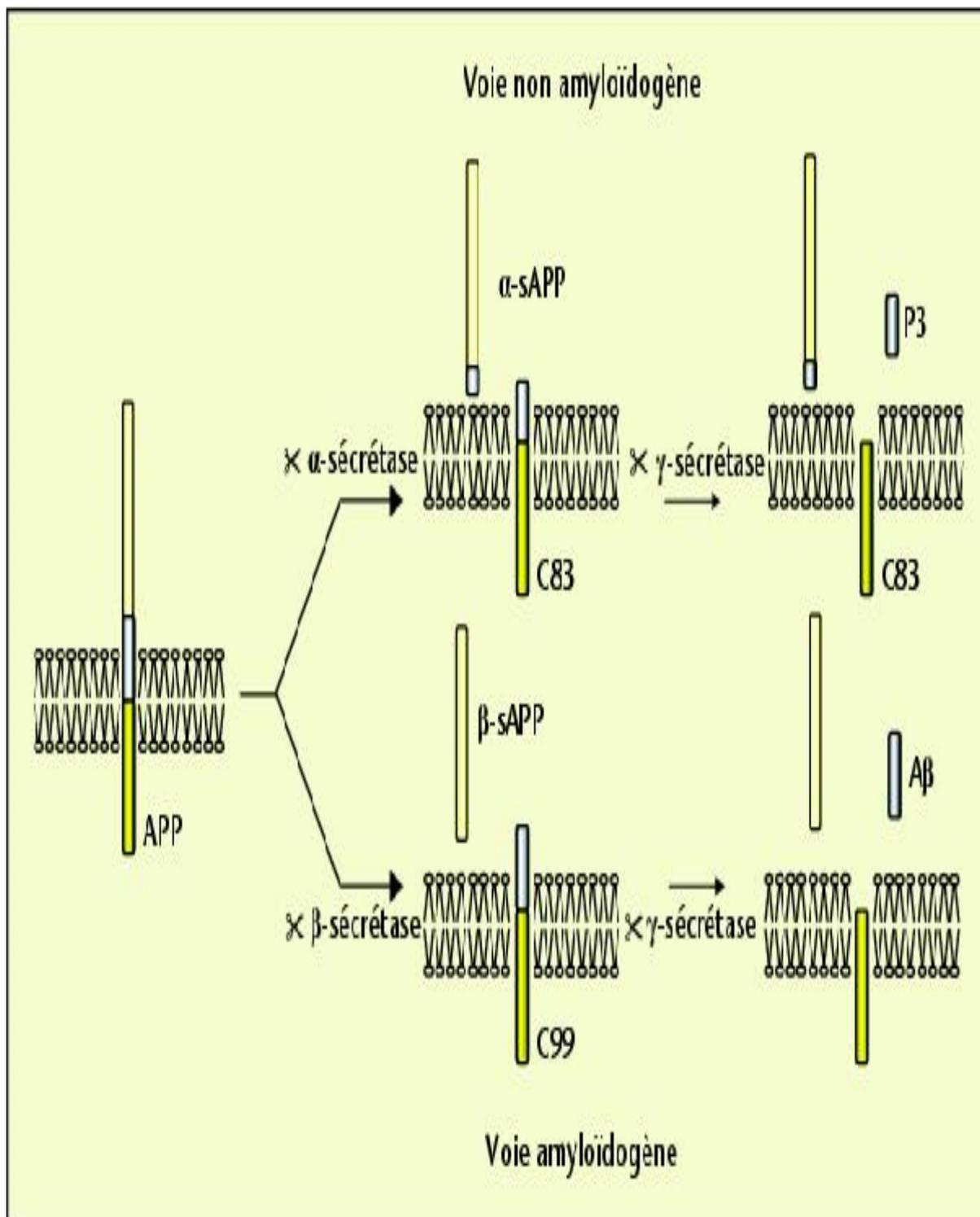


Figure 5: Voies de dégradation de la protéine APP par les différentes sécrétases et production du peptide A β . La protéine transmembranaire APP peut être hydrolysée soit par le couple α - et γ -sécrétases qui produit un peptide P3 court et non-amyloïdogène, soit par le couple β - et γ -sécrétases qui produit le peptide amyloïdogène A β . Le fragment intracellulaire libéré par les γ -sécrétases aurait une fonction de signalisation nucléaire. De même, le peptide extracellulaire libéré par les α -sécrétases serait impliqué dans la communication intercellulaire [67].

La voie non amyloïdogénique fait intervenir une activité α -sécrétase qui coupe le mAPP au milieu de la séquence correspondant à l'A β , permettant ainsi la sécrétion dans l'espace extracellulaire d'une forme sécrétée de l'APP, le sAPP α . Ce clivage peut avoir lieu au sein du réseau trans-golgien ou bien au niveau de la membrane plasmique, puis le sAPP α est libéré dans l'espace extracellulaire. Cette voie de sécrétion ne produit donc pas de protéine β -amyloïde. A ce jour, plusieurs α -sécrétases de la famille des ADAM (pour *a Disintegrin And Metalloprotease*) ont été identifiées: ADAM 10, ADAM 17 (appelée aussi TACE pour *Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme*) ou encore MDC9. Ces métalloprotéases sont généralement impliquées dans la coupure de protéines transmembranaires [68, 69].

Les présénilines

Les présénilines (PS1 et PS2) sont des protéines membranaires multifonctionnelles de 467 et 448 acides aminés, leurs gènes sont situés respectivement sur les chromosomes 14 et 1 humains. De nombreuses mutations de ces gènes ont été découvertes (à ce jour 111 pour la PS1, 10 pour la PS2), et sont retrouvées dans plus de 60 % des formes familiales de MA (contre 10 % environ pour les mutations connues de l'APP [70, 71]).

Les présénilines sont impliquées dans la formation du complexe à activité γ -sécrétase capable de protéolyser l'APP, et dans d'autres voies de protéolyse comme celle de la protéine Notch [72]. Etant donné que la protéine Notch joue un rôle dans la différenciation des cellules (par exemple, lors de l'hématopoïèse), les stratégies thérapeutiques visant à diminuer l'activité γ -sécrétase afin de réduire la production d'A β ne semblent pas dénuées de risques d'effets secondaires majeurs (par exemple, une immunodéficience).

2.1.6.3. Rôles de l'APP et de ses dérivés

En raison de l'évidence de la perturbation du métabolisme de l'APP au cours de la MA, de nombreuses recherches se sont focalisées sur la compréhension des rôles physiologiques normaux de l'APP et de ses dérivés [73, 74]. L'APP est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme, mais ses fonctions physiologiques multiples ne sont pas encore bien connues.

Avec les APLP, l'APP joue un rôle clé dans le développement embryonnaire [43]. La variation d'expression des différentes isoformes de l'APP au cours du développement suggère une implication différentielle de ces isoformes dans l'ontogénèse du système nerveux, dans

les processus d'adhésion cellulaire, de stimulation de la croissance neuritique et de synaptogenèse [75]. Les sAPP pourraient également jouer un rôle dans la neurogenèse [76].

2.1.6.3.1. Hypothèse de la cascade Amyloïde

On s'accorde généralement sur le fait que la cascade amyloïde est le facteur étiologique central de la maladie d'Alzheimer [77]. Cela a mené à l'élaboration de l'hypothèse dite «de la cascade amyloïde», selon laquelle les agrégats d'A β 42 sont à l'origine d'une cascade d'événements aboutissant à la mort neuronale et à la démence (*Figure 6*). Dans des conditions non pathologiques, l'A β est dégradée par des enzymes protéolytiques ou évacuée par des mécanismes de transport. Le déséquilibre entre les mécanismes de production et les mécanismes de dégradation/évacuation de l'A β serait à l'origine d'une cascade d'événements aboutissant aussi à la dégénérescence des neurones et à la démence.

La protéine amyloïde bêta s'accumule dans le milieu extracellulaire puis s'agrège avec différentes substances (l'apolipoprotéine E, l' α -antichymotrypsine, l'acétylcholinestérase, la laminine, la fibronectine, l'ubiquitine, des protéoglycans, l'aluminium, le fer, la protéine tau ...). L'effet neurotoxique de ces dépôts amyloïdes est complexe, à la fois direct et indirect : par une entrée excessive de calcium dans les neurones [78], une hyperphosphorylation de la protéine tau, un dysfonctionnement neuronal, une perte de synapses, une diminution du nombre de dendrites, une diminution des neurotransmetteurs et la mort cellulaire. Par ailleurs, via des récepteurs couplés à la protéine G, les plaques produisent des effets chémoattractants et activateurs sur les monocytes et les astrocytes qui libèrent des cytokines et initient une cascade inflammatoire.

L'A β augmente aussi la libération de radicaux libres accroissant le stress oxydatif et favorise des processus métaboliques menant à l'apoptose.

Cause : mutations APP, PS1, PS2

-> Dérèglement de l'APP

-> Production du peptide A β

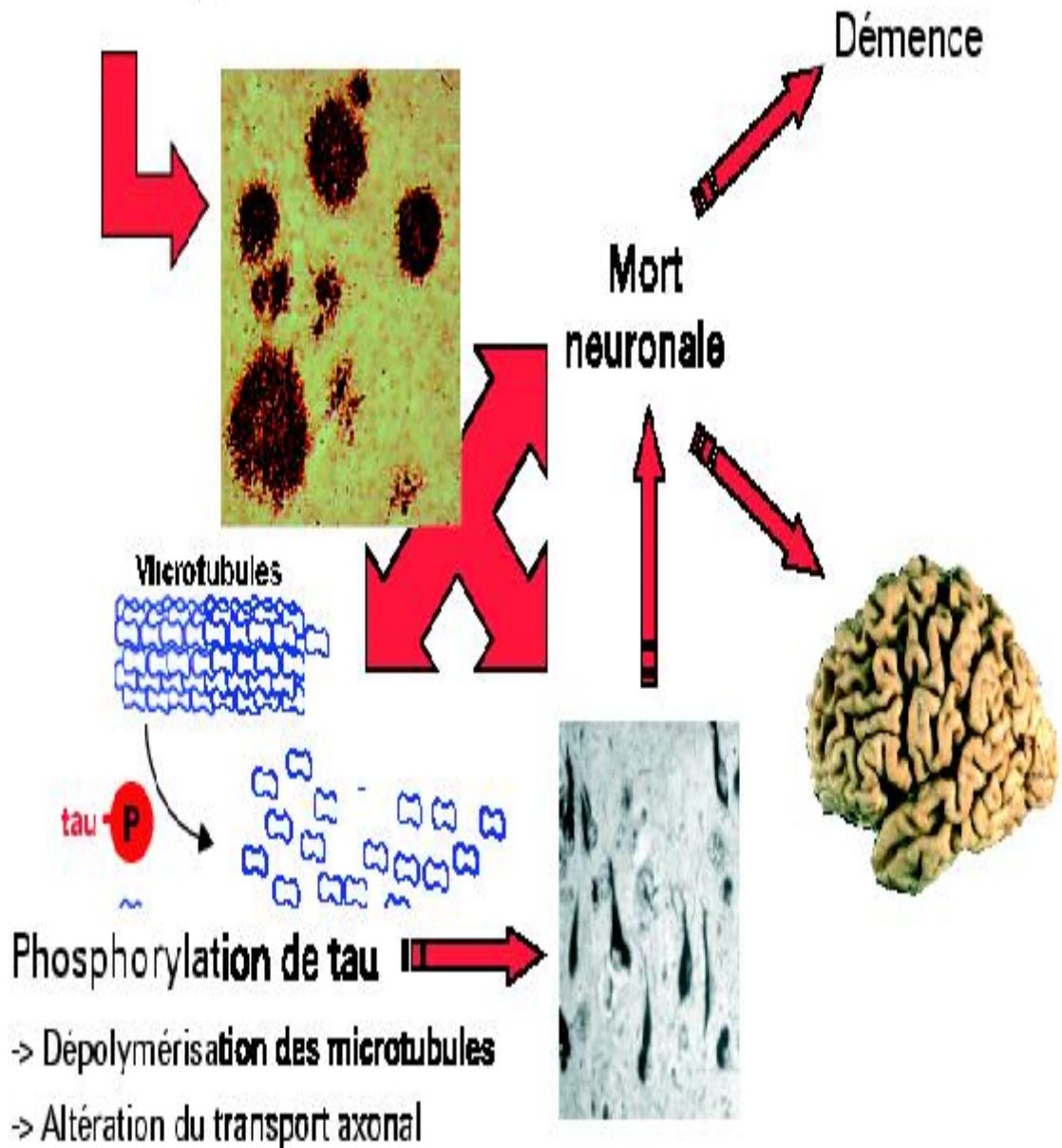


Figure 6: L'hypothèse de la cascade amyloïde. Les perturbations du métabolisme du précurseur du peptide amyloïde (APP) conduisent à la production du peptide A β et son agrégation sous forme de dépôts amyloïdes. La substance amyloïde conduit à la phosphorylation de la protéine tau, à la dégénérescence neurofibrillaires et à la mort neuronale pour aboutir à la démence. La phosphorylation de la protéine tau conduit aussi à une dépolymérisation des microtubules et une altération du transport axonal [79].

2.1.6.3.2. Formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

Dans la maladie d'Alzheimer, la démence résulte d'une perte neuronale et synaptique [80]. Les stigmates neuropathologiques sont de deux types : les neurones en dégénérescence neurofibrillaires (DNF) et des dépôts amyloïdes.

Dans le cortex cérébral, la DNF touche principalement des neurones pyramidaux. Dans la maladie d'Alzheimer, elle suit un chemin séquentiel et hiérarchisé lié aux connexions cortico-corticales (figure 7). La DNF correspond à une accumulation intraneuronale de fibrilles formées de filaments très caractéristiques, appelés les paires de filaments appariées en hélice ou PHF (Paired Helical Filaments). Les PHF sont constituées par l'agrégation de protéines microtubulaires tau. Ces filaments sont pathologiques et constituent des marqueurs ultrastructuraux du processus dégénératif de type Alzheimer. Les PHF sont également observées dans les neurites en dégénérescence qui abondent dans le neuropile et en périphérie des dépôts amyloïdes, pour former les plaques séniles. Les plaques séniles, marqueurs spécifiques de la maladie d'Alzheimer, reflètent la présence de deux processus dégénératifs simultanés : amyloïdogenèse et DNF.

Cependant, la DNF n'est pas une lésion histologique spécifique de la maladie d'Alzheimer, elle est également retrouvée dans la trisomie 21, la région hippocampique des personnes âgées, de nombreux syndromes parkinsoniens, Dégénérescence Cortico-Basale (DCB), Paralysie Supranucléaire Progressive (PSP), Parkinson Post-Encéphalitique [81-83].

La dégénérescence neurofibrillaires n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer, mais sa distribution cérébrale et sa relation avec la pathologie amyloïde reflètent un processus étiopathogénique particulier [84].

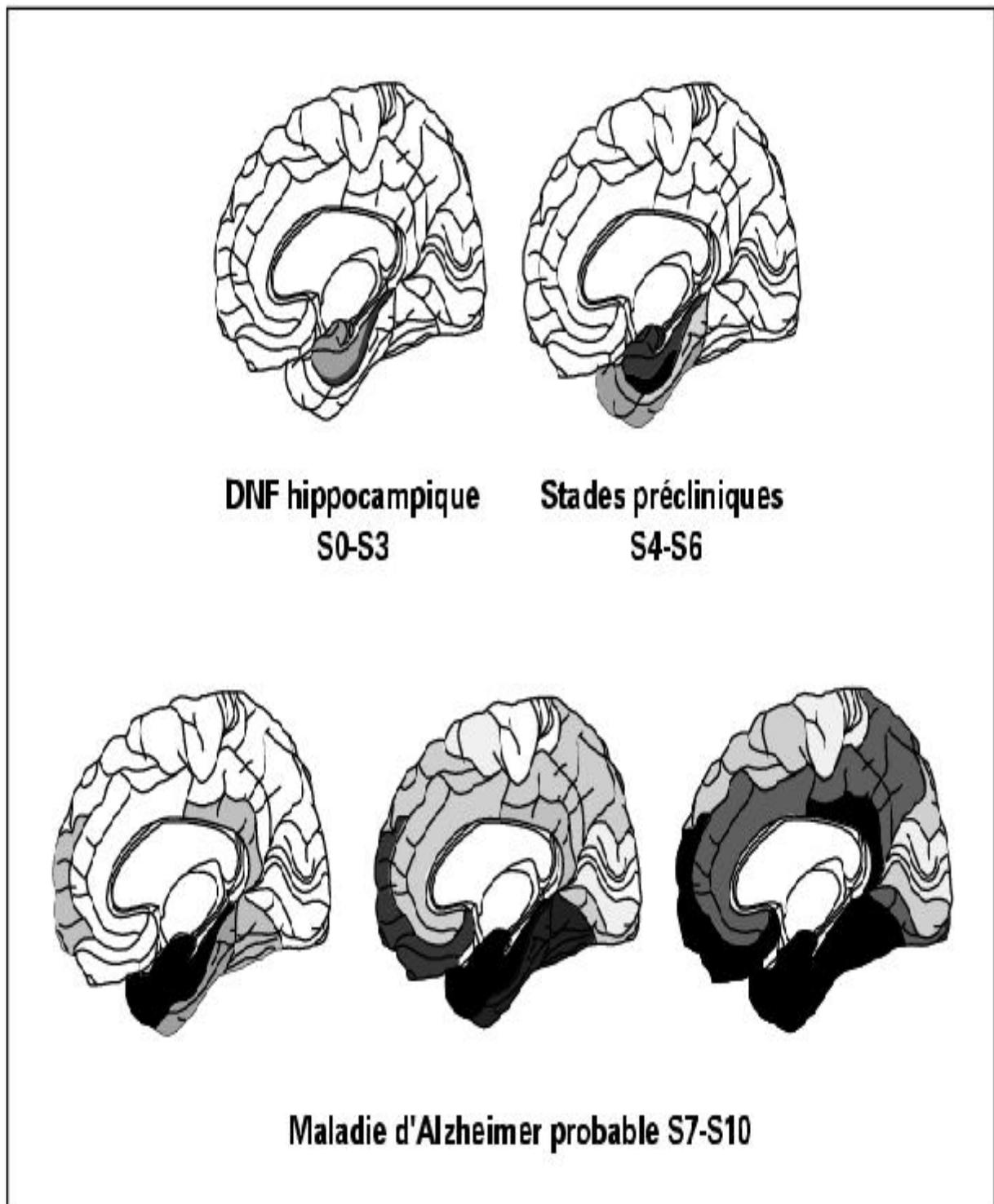


Figure 7: Le chemin séquentiel et hiérarchisé de la DNF. Il existe une séquence d'apparition de la dégénérescence neurofibrillaires. Elle commence au niveau de la région hippocampique (cortex trans-entorhinal (S1), entorhinal (S2), puis hippocampe (S3)) et s'étend séquentiellement aux régions temporales (aires de Brodmann 38, 20, 21) (S4-S6). Puis elle touche les régions associatives polymodales (aires de Brodmann 22 (temporale), 39 (pariétale) et 9 (frontale)) (S7). Dans les cas les plus sévères, elle peut être observée dans des régions sensibles primaires (aires 4 (motrice) et 17 (visuelle)) (S10). Ceci suggère donc qu'il existe des sous-populations neuronales vulnérables et que la pathologie tau progresse le long de circuits neuronaux précis aboutissant à une propagation cortico-corticale [79].

2.1.6.3.3. Les protéines tau

La dégénérescence neurofibrillaire correspond à l'agrégation intraneuronale de protéines tau anormalement phosphorylées sous la forme de paquets de filaments pathologiques [85, 86]. Le rôle physiologique de tau permet de mieux comprendre son impact sur le fonctionnement cérébral. Les protéines tau appartiennent à la famille des MAP (microtubule-associated proteins). Elles sont principalement neuronales et jouent un rôle dans la polymérisation des microtubules [81-83]). Le gène des protéines tau est localisé sur le chromosome 17, à la position 17q21. À partir du gène, et suite à un épissage alternatif, seront produits 6 ARN messagers de tau, traduits ensuite sous forme de 6 protéines tau différentes (en fait six isoformes) [87, 88]. Les protéines tau régulent la stabilité des microtubules en fonction de leur état de phosphorylation.

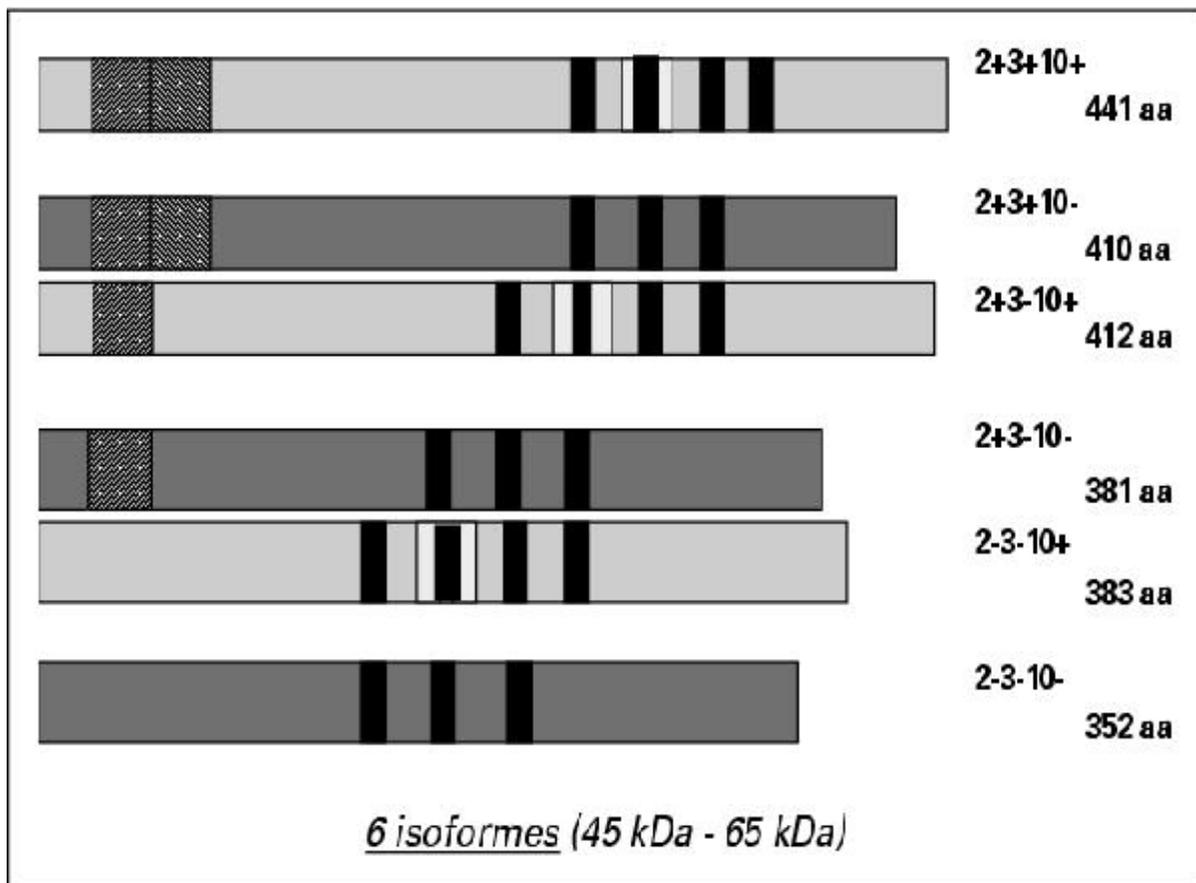


Figure 8: Les six isoformes de protéines tau (45 kDa - 65 kDa). Il existe six isoformes de protéines tau dans le cerveau humain adulte. Une seule isoforme est présente à la naissance et ne comporte pas de séquences codées par les exons 2, 3 et 10, il s'agit de l'isoforme fœtale de 352 acides aminés (aa). Après la naissance, les autres isoformes vont apparaître au cours du développement : [2-3-10+ (383 aa)], [2+3-10- (381 aa)], [2+3-10+ (412 aa)], [2+3+10- (410 aa)] et [2+3+10+ (441 aa)]. Il y a donc trois isoformes à trois domaines de liaison aux microtubules et trois isoformes à quatre domaines de liaison aux microtubules. Les rectangles noirs schématisent les domaines de liaison aux microtubules (R1-R4) [79].

2.1.6.3.4. Caractérisation des protéines tau pathologiques de la maladie d'Alzheimer

La détection de protéines tau agrégées et anormalement phosphorylées au sein des PHF est un élément qui a été intégré dans l'hypothèse de la cascade amyloïde. Le peptide AB est toxique et il conduit à une dérégulation de l'homéostasie cellulaire en activant de façon anarchique un certain nombre de kinases.

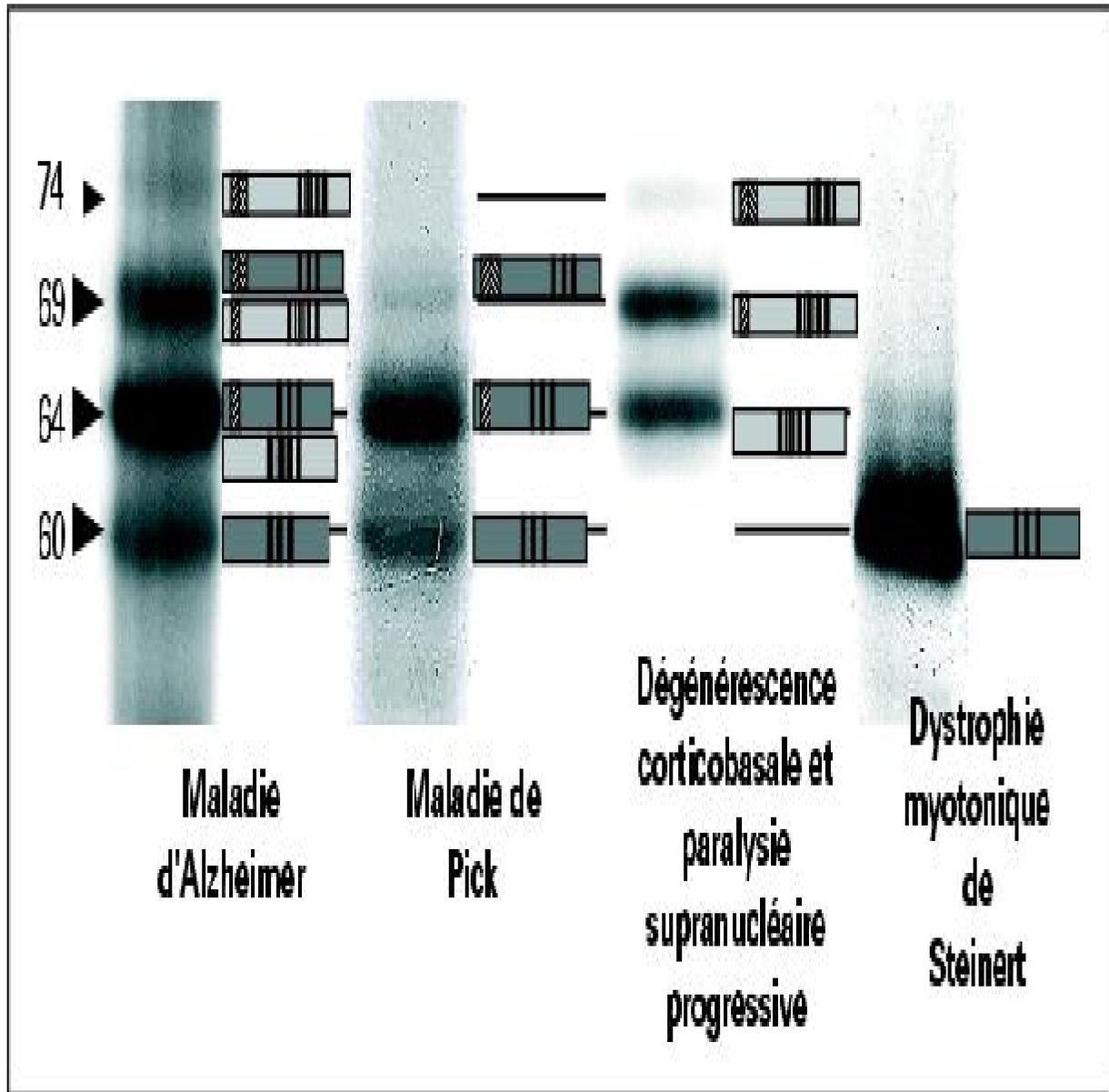


Figure 9: Le code barre des maladies neurodégénératives. Les 6 isoformes hyperphosphorylées s'agrègent dans la maladie d'Alzheimer et présentent un profil électrophorétique de type triplet. Seules les isoformes E10- s'agrègent dans la maladie de Pick et inversement, les isoformes E10+ sont retrouvées dans la PSP. Pour la dystrophie myotonique de Steinert, les isoformes avec les séquences codées par les exons 2 et 3 (E2, E3) ne sont pas exprimées. Les codes couleur sont identiques à ceux de la figure 8 [79].

La notion de tauopathies, pathologies liées à l'agrégation spécifique d'isoformes de protéines tau, était née. Elle repose sur le fait que certaines isoformes de protéines tau définissent des sous-populations neuronales spécifiques (figure 10).

Cependant, des données récentes indiquent que certains polymorphismes du gène tau ont un lien avec l'expression et l'épissage alternatif [89]. C'est ainsi que pour une même mutation sur le gène Tau, l'expression clinique dans une même famille sera très différente, variation de l'âge de début, durée de la maladie, profil clinique [90].

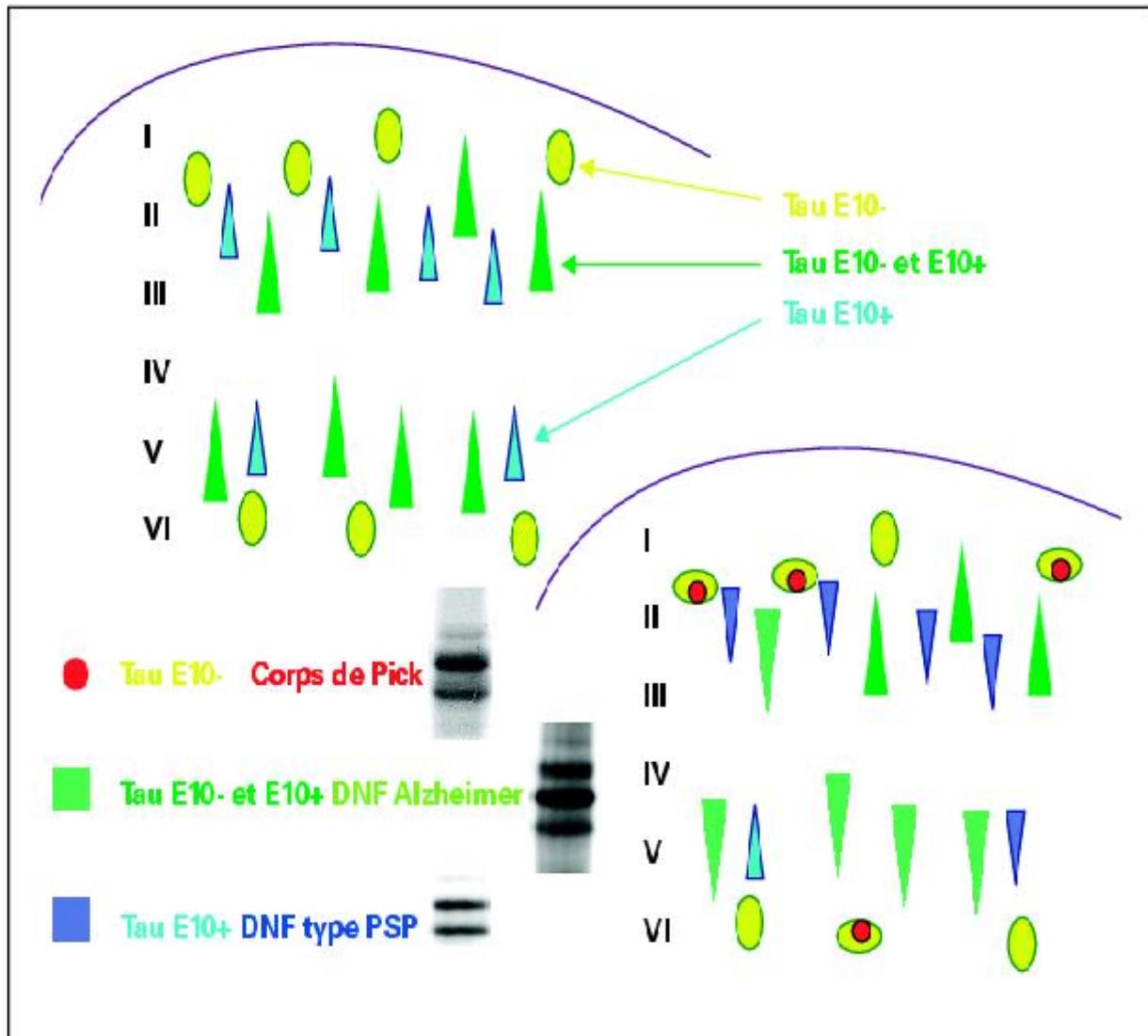


Figure 10: Sous-populations neuronales vulnérables et isoformes de protéines tau. Certaines sous-populations neuronales expriment des isoformes de protéines tau avec 3 (E10-, jaune) ou 4 (E10+, bleu) domaines de liaison aux microtubules. D'autres expriment les six isoformes (E10- et E10+, vert). Si les neurones d'une sous-population dégénèrent, seules les isoformes de protéines tau présentes vont agréger. Cela conduira à une lésion particulière (par exemple, un corps de Pick (rouge)) avec un profil électrophorétique particulier (doublet inférieur tau 60 et 64 avec variant mineur à 69 kDa). Les couches de l'isocortex sont numérotées de I à VI [79].

2.1.6.3.5. La protéine prion

Dans les maladies à prions, la PrP présente un repliement incorrect qui conduit à son agrégation (PrP^{Sc}) à l'intérieur et autour des cellules nerveuses, empêchant leur fonctionnement [91]. Des dépôts sont également observés chez des patients atteints de MA [92, 93]. Il a même été suggéré une surexpression de PrP^c dans le cortex frontal des patients atteints de MA et une réduction de l'expression dans le cortex occipital [94]. La PrP^c pourrait favoriser la formation de plaques A β en augmentant l'agrégation [95].

2.1.7. Les neurotransmetteurs

Les lésions histologiques de la MA apparaissent dans des structures d'où sont originaires les voies cholinergiques, notamment le néocortex, l'hippocampe, le noyau basal de Meynert, la bandelette diagonale de Broca, le septum, le striatum et le thalamus. Il en résulte une diminution parfois massive de la concentration en neurotransmetteurs notamment l'acétylcholine [96]. Le déficit cholinergique peut atteindre jusqu'à 90% dans les stades sévères de la maladie [97]. Cependant, d'autres neurotransmetteurs peuvent interagir dans ces structures. Le déficit de somatostatine touche le néocortex et l'hippocampe. La baisse des concentrations peut atteindre 60%. Des modifications concernent aussi les récepteurs, en particulier à l'acétylcholine. La densité des récepteurs nicotiques baisse au niveau du cortex, alors que celle des récepteurs muscariniques se maintient dans les régions corticales et hippocampiques [98]. La répercussion de la MA sur plusieurs systèmes de neurotransmission explique les limitations des traitements exclusivement cholino-mimétiques [99].

2.2. APOLIPOPROTEINE E

L'apolipoprotéine E (apoE) est une protéine ubiquitaire, jouant un rôle dans le transport du cholestérol et des phospholipides [100, 101]. L'apo E est un des composants des lipoprotéines. Elle est un des constituants des VLDL (very low density lipoprotein) dont la fonction première est le transport des triglycérides, des HDL (high density lipoprotein) qui participent à la redistribution du cholestérol, et des chylomicrons.

2.2.1. Structure

L'apo E comporte deux domaines structuraux correspondant à deux domaines fonctionnels, qui peuvent être individualisés par clivage à la thrombine [102, 103] (*figure 11*). La partie N-terminale (1-191) (22 kDa) comporte un site de fixation à l'héparine (142-147) [104] et de liaison avec le récepteur LDL (141-155) [105, 106].

La partie C-terminale (216-299) (10 kDa) joue un rôle majeur dans le transport des lipides, grâce à un site de liaison aux lipides (244-272) [107].

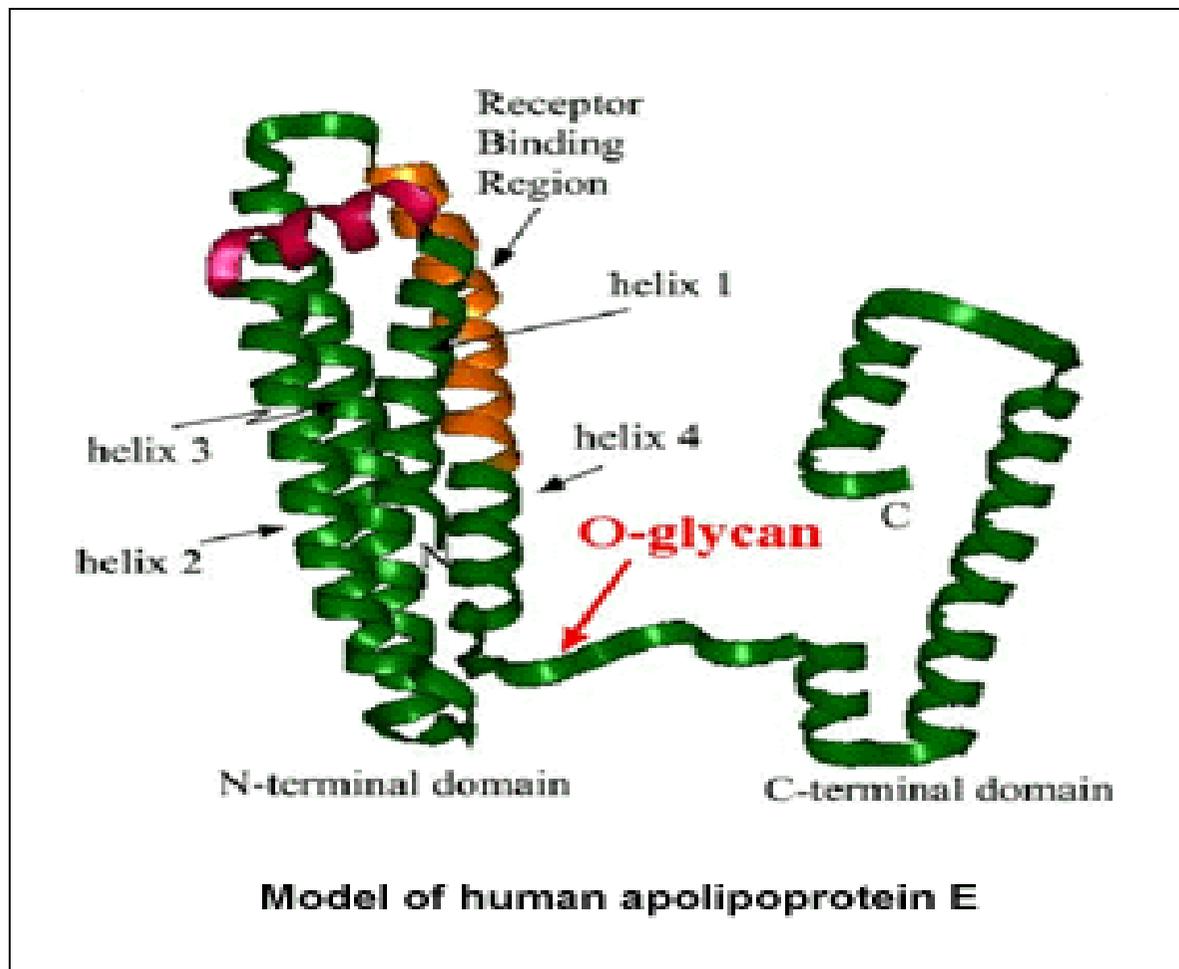


Figure 11 : Le modèle de l'apolipoprotéine E humaine [108].

2.2.2. Le gène de l'apo E

Le gène de l'apo E est unique et situé à l'extrémité centromérique de l'ensemble d'une famille de gènes codant pour le groupe apolipoprotéine E, CI, et CII, sur le chromosome 19, dans la région q13.2 [109, 110]. Ce gène de 3,7 kb comporte quatre exons et trois introns [110, 111]. Le premier exon est non codant, le deuxième exon code pour un peptide signal, le troisième exon pour les 61 premiers acides aminés et le quatrième pour l'essentiel de la protéine mature. L'ARNm a une longueur de 1163 paires de base (*figure 12*).

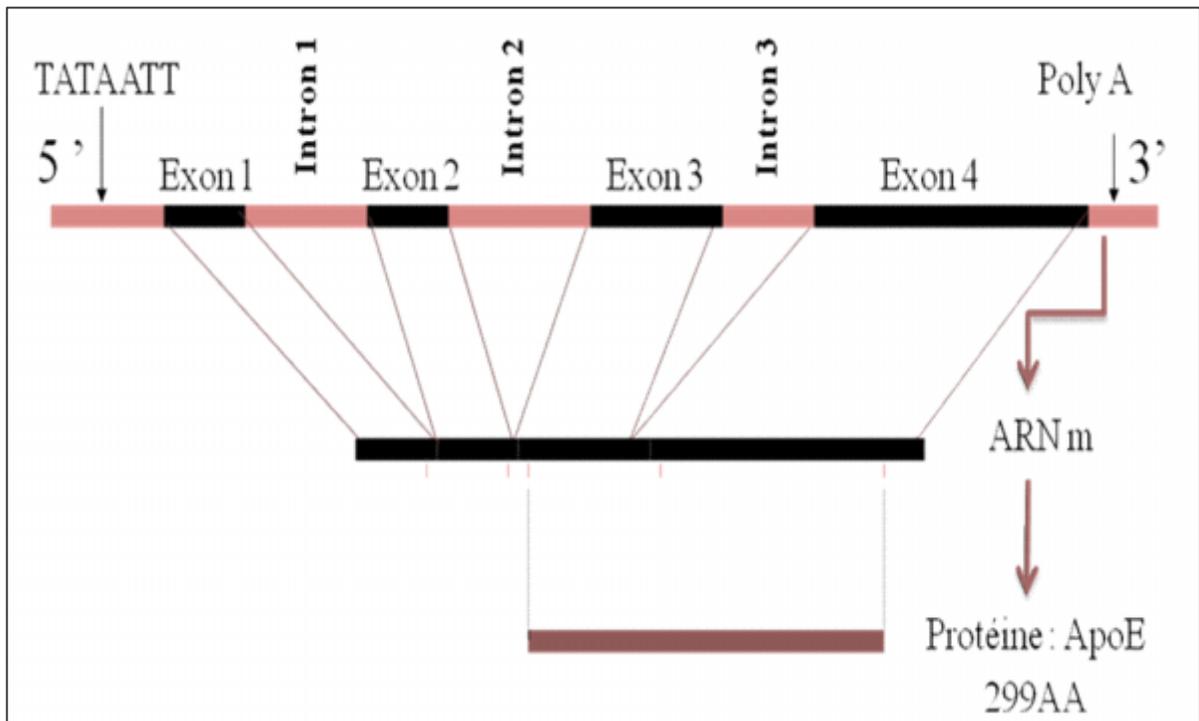


Figure 12 : Le gène de l'apoE et modifications post transcriptionnelles [112]

2.2.3. Polymorphisme génétique de l'apo E

Le polymorphisme génétique de l'apo E se trouve dans la partie codante du gène et modifie la fonction de la protéine produite. Le polymorphisme génétique de l'apo E comporte 3 allèles ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) codant pour 3 formes de l'apo E structurellement et fonctionnellement différentes (E2, E3, E4) [102]. Les formes E2 et E4 diffèrent chacune de la forme E3, la forme la plus fréquente, par un seul acide aminé en position 112 et 158, qui peut être occupé soit par une cystéine, soit par une arginine (*figure 13*).

L'apo E2 comprend deux cystéines, l'apo E3 comprend une cystéine en position 112 (codon TGC) et une arginine en 158 (codon CGC) et l'apo E4 deux arginines en position 112 et 158 [113]. Ces mutations (Arg = CGC, Cys = TGC) entraînent un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction lors d'une digestion de l'ADN de l'exon 4 du gène de l'apoE par l'enzyme Hha I (gcg/c). La présence des deux sites identifie l'allèle ϵ_4 et leur absence l'allèle ϵ_2 . Dans l'allèle ϵ_3 , l'enzyme de restriction Hha I coupe l'ADN en 158 mais pas en 112. Les trois isoformes E2, E3, E4 ont des charges respectivement égal à 0, 1⁺ et 2⁺ [114]. L'allèle ϵ_4 est considéré comme l'allèle ancestral ; l'allèle ϵ_3 qui est le plus fréquent, et l'allèle ϵ_2 qui est habituellement le plus rare [115].

Les allèles de l'apoE se transmettent de façon codominante. Chaque sujet hérite un des trois allèles de chaque parent, chaque individu possède 2 allèles de l'apoE et les combinaisons possibles de ces allèles dans la population donnent six phénotypes différents : trois homozygotes ϵ_2/ϵ_2 , ϵ_3/ϵ_3 , ϵ_4/ϵ_4 et trois hétérozygotes ϵ_4/ϵ_3 , ϵ_3/ϵ_2 et ϵ_4/ϵ_2 [102, 116, 117].

Diverses variantes génétiques ont été trouvées avec ou sans modification de la charge électrique par exemple ϵ_1 , ϵ_5 et ϵ_7 [118, 119] ou encore apoE Leiden [120]. Les proportions de chacun des six phénotypes de l'apoE dans un échantillon Européen de l'ouest sont $\epsilon_2/\epsilon_2=1\%$, $\epsilon_2/\epsilon_3= 11\%$, $\epsilon_2/\epsilon_4=3\%$, $\epsilon_3/\epsilon_3=63\%$, $\epsilon_3/\epsilon_4=20\%$, $\epsilon_4/\epsilon_4=2\%$ [121]. Des fréquences semblables des allèles de l'apoE ont été rapportées pour la population blanche de l'USA [122].

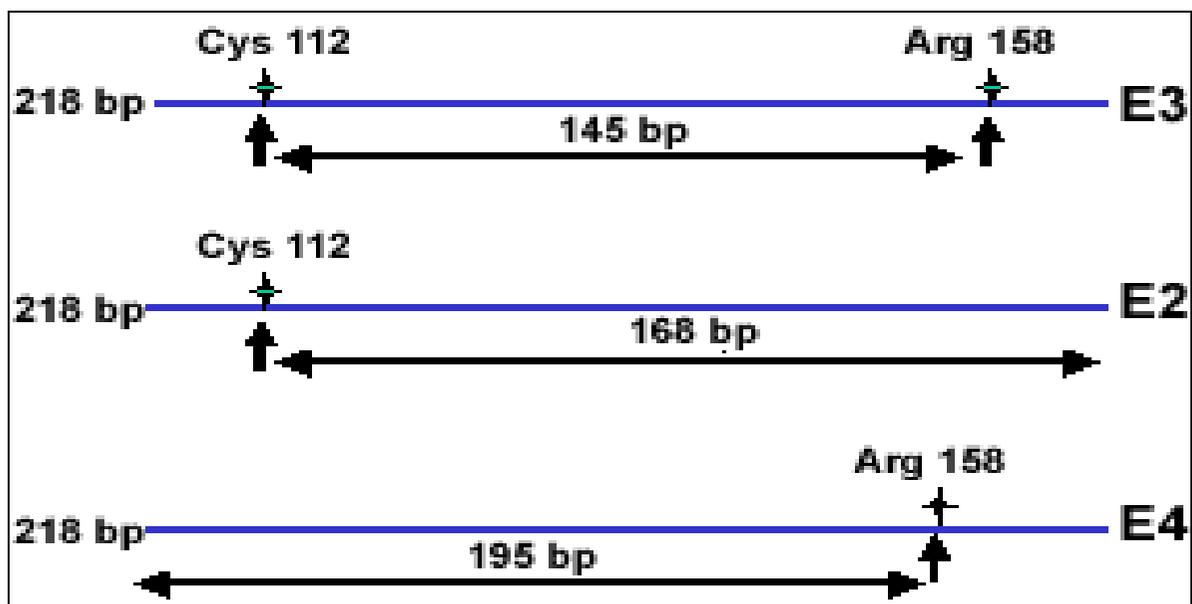


Figure 13 : Apolipoprotéine E et son polymorphisme.

2.2.4. Fréquence des allèles de l'apo E dans le monde

La variation de la fréquence des allèles de l'apoprotéine E est différente d'une population à une autre dans le monde, dans toutes les études, l'allèle $\epsilon 3$ est le plus fréquent qui varie entre 60 et 80% [123, 124], est considéré comme le normale, l'allèle $\epsilon 2$ était le moins fréquent. En ce qui concerne l'allèle $\epsilon 4$, les fréquences varient d'environ 5% dans les populations d'Extrême-Orient jusqu'à 36,8% dans les populations de Polynésie [125].

Dans toutes les populations étudiées, les trois allèles de l'apoE sont présents, sauf dans quelques populations d'amérindiens telles que Mayans [126], Mazatecans [127], Yanomami [128], et Cayapa [129], où l'allèle E2 est complètement absent.

La fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ est basse au Japon et élevée en Finlande. La différence de la fréquence allélique de l'apolipoprotéine E peut contribuer à la variation dans la prédominance de la maladie d'Alzheimer parmi les différentes populations [130]. En Europe il y a un gradient croissant de la fréquence de l'apoE4 du sud vers le nord [131], et suit le gradient de fréquences des maladies cardiovasculaires [132]. Dans les pays du sud méditerranéens comme la France, l'Espagne, le Maroc la fréquence est autour de 12%.

La plupart des études sur les fréquences relatives des allèles de l'apoE ont été faites sans considérer le genre de l'individu. Toutefois quelques études ont calculé les fréquences alléliques de l'apoE en séparant les hommes et les femmes. Dans ces cas les fréquences alléliques chez les femmes n'étaient pas significativement différentes de celles des hommes [133, 134].

2.2.5. La protéine apo E et ses modifications post-traductionnelles

L'apo E est clivée par une peptidase pour les 18 acides aminés composant le peptide signal, lors du passage à travers la membrane du réticulum endoplasmique [135]. L'apo E intracellulaire subit des O-glycosylations, accompagnée de sialylation. La glycosylation, qui s'accompagne généralement d'une sialylation, a lieu à un seul site de l'apo E, à la thréonine 194. La protéine est ensuite sécrétée et désialylée extracellulairement. 90% de l'apo E plasmatique est désialylée. L'apo E mature sécrétée est une protéine de poids moléculaire apparent de 34 kDa (299 acides aminés) [136]. Les substitutions des acides aminés aux positions 112 et 158 des trois principales isoformes de l'apo E induisent des changements de point isoélectrique (Apo E2, pI=5,5; Apo E3, pI=5,4; Apo E4, pI=5,3) [101].

2.2.6. Distribution tissulaire

La source majeure de production d'apo E est le foie: il serait à l'origine des 2/3, voire des 3/4 de l'apo E plasmatique [137]. Le second site de production de l'apo E est le cerveau (environ 1/3 de l'apo E du foie) [137]. Sa synthèse peut être effectuée au niveau du système nerveux central par les oligodendrocytes, la microglie et plus particulièrement les astrocytes [138]. La présence de la protéine apo E est aussi mise en évidence dans les cellules nerveuses, grâce à des techniques d'immunohistochimie [139]. Elle est aussi présente de façon notable dans le liquide céphalo-rachidien. L'apo E est la principale apolipoprotéine du système nerveux [140].

2.2.7. Récepteurs de l'Apo E

Les complexes apoE/lipides sont internalisés par les cellules grâce aux différents récepteurs. La majorité des récepteurs aux lipoprotéines contenant l'apo E font partie de la famille des récepteurs LDL, le récepteur LDL est exprimé dans les terminaisons nerveuses et sur les astrocytes [141].

Le polymorphisme des isoformes E2, E3 et E4 interviennent au niveau du site d'interaction avec les récepteurs LDL et entraînent des changements de charges. Ces changements pourront modifier les interactions avec les récepteurs. L'isoforme E2 serait moins affine que les isoformes E3 et E4 pour ces récepteurs [142].

2.2.8. Rôle de l'apoE

En plus des fonctions communes attribuées aux apolipoprotéines, dont son rôle dans la clairance plasmatique des lipoprotéines riches en triglycérides, l'apoE est une composante majeure prenant part dans le processus générale d'homéostasie du cholestérol.

L'apo E joue un rôle dans le transport des lipides, mais il est probable qu'elle joue d'autres rôles notamment au niveau du système nerveux. L'apoE est impliquée dans le stockage et la redistribution du cholestérol nécessaires à la régénération neuronale périphérique [143].

In vitro, il a été démontré que l'apoE pourrait effectivement avoir une action sur le réseau microtubulaire en favorisant la polymérisation de la tubuline en microtubules. Cependant aucune différence en fonction de l'isoforme de l'apoE étudiée n'a pu être observée. L'apoE pourrait également jouer un rôle dans la stabilisation du cytosquelette neuronal, la croissance neuritique et la toxicité neuronale.

2.2.9. Apolipoprotéine E et maladie d'Alzheimer

Apo E et lésions de la maladie

Des études immunohistochimiques des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer ont montré la présence d'apo E dans les dépôts amyloïdes extracellulaires, ainsi que des dépôts vasculaires, dans les astrocytes et dans quelques neurones contenant ou non des PHFs [144]. C'est la partie C-terminale de l'apo E qui est retrouvée au sein des fibrilles amyloïdes des cerveaux Alzheimer [145]. L'apo E est mise en évidence dans les dépôts compacts d'amyloïde, mais il existe une distribution régionale de l'apo E au sein des dépôts diffus d'amyloïdes.

Les sujets homozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ ont un nombre accru de dépôts amyloïdes au sein des vaisseaux et de plaques amyloïdes [146]. De même, les PS sont plus nombreuses dans les cerveaux de patients Alzheimer possédant un isoforme E4 de l'apoE par rapport à ceux ayant un isoforme E3. Une augmentation de l'expression de l'apo E par les astrocytes est observée dans les cerveaux de patients.

Le polymorphisme de l'apo E peut également jouer sur les déficits neurochimiques, et notamment sur le déficit cholinergique. Qui sont plus importants chez les patients porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ [147].

2.2.10. Apo E et peptide amyloïde

La localisation de l'apo E au sein des plaques serait le résultat de son association avec le peptide amyloïde [148]. La liaison du peptide amyloïde et de l'apo E n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer, car elle est retrouvée dans l'angiopathie cérébrale et différentes pathologies cérébrales avec amyloïdoses.

L'apo E4 purifiée de plasma se lierait au peptide amyloïde avec une affinité plus importante que les autres allèles [149]; ce sont des formes oxydées de l'apo E qui se lient à l'A β . Cette liaison a lieu pour l'apo E dans le domaine d'interaction avec les lipides. La liaison de l'A β avec l'apo E4 s'effectue de façon plus rapide que celle de l'apo E3 et de l'A β [150], et entraîne l'apparition de fibrilles plus précocement [151].

L'association de l'apo E et du peptide amyloïde aboutit donc à la formation de fibrilles insolubles.

L'apo E serait donc une molécule chaperonne pour la fibrillogénèse, et c'est l'isoforme E4 qui se lierait préférentiellement au peptide amyloïde [152]. La liaison de l'apo E4 et du peptide amyloïde expliquerait son rôle en tant que facteur de risque.

2.2.11. Apo E: élimination du peptide amyloïde

D'autres auteurs, ont mis en évidence des résultats contradictoires: le peptide A β se lierait préférentiellement à l'apo E3 associée à des lipoprotéines, plutôt qu'à l'isoforme E4 associée à des lipoprotéines. L'apo E2, sous forme de dimères, serait encore plus efficace que l'apo E3 pour la formation de complexes avec le peptide amyloïde [153].

L'efficacité à former des complexes entre l'apo E et le peptide amyloïde est inversement corrélée au risque de développer la maladie: l'apo E2, qui est un facteur protecteur se lie préférentiellement au peptide amyloïde. Le peptide amyloïde et l'apo E ont été mis en évidence au sein de mêmes vésicules dans les neurones [154]; ces neurones expriment en quantité importante le récepteur gp330. La présence de complexes solubles apo E2/E3-A β permettraient l'internalisation par des récepteurs de l'apo E dans les cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Il a été proposé que le peptide amyloïde, après être complexé à des lipoprotéines contenant de l'apo E, serait éliminé par l'intermédiaire des récepteurs de l'apo E et en particulier de la protéine LRP (*low density related protein*) [155]. En présence d'apo E4, le peptide amyloïde extracellulaire ne serait pas ou peu éliminé.

Un argument supplémentaire en faveur du rôle protecteur de l'apo E est la protection in vitro de la toxicité du peptide amyloïde [156] avec un effet spécifique de chaque isoforme (E3 étant plus efficace qu'E4 et moins qu'E2). L'apo E diminue les effets toxiques en protégeant d'un stress oxydatif induit par le peptide amyloïde [157].

Toutes ces hypothèses proposent un rôle indirect de l'apo E dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, un rôle direct de l'apo E peut aussi être envisagé. D'après des études sur le rôle de l'apo E dans le système nerveux, l'apo E module avec un effet isoforme spécifique la croissance neuritique, et participerait à la réinnervation après perte cellulaire. D'autre part, l'apo E ou des fragments dérivés sont toxiques pour des cellules en culture. Ces différentes voies pourraient agir en synergie, ce qui impliquerait un rôle prédominant de l'apo E dans la maladie d'Alzheimer.

2.3. LIPIDES

Les lipides forment un groupe hétérogène de composés qui représentent environ 20 % du poids du corps et jouent un rôle capital en exerçant une grande variété de fonctions biologiques à la fois au niveau structurale et fonctionnel : ils interviennent dans la constitution des membranes cellulaires et constituent aussi une source énergétique importante. Ils sont cependant loin de n'être que des éléments de réserve d'énergie. Ce sont aussi des messagers chimiques et précurseurs de dérivés doués d'activités biologiques indispensables, prostacyclines, thromboxanes et leucotriènes, acides biliaires et stéroïdes hormonaux [158]. Les lipides majeurs dans le corps sont les triglycérides (TG), le cholestérol libre (CL), le cholestérol estérifié (CE) et les phospholipides [159].

2.3.1. Les triglycérides et acides gras

Les triglycérides, stockés dans les adipocytes des tissus adipeux, constituent une réserve énergétique essentielle pour l'organisme. Leur catabolisme est régulé par des signaux hormono-dépendants, ils sont dégradés en glycérol et acides gras libres, ces derniers libérés dans le sang et transporté aux tissus, peuvent être capté par le foie et les muscles, ou ils seront oxydés en acétyl-CoA [160].

Dans le plasma, les acides gras existent de manière assez transitoire sous forme libre alors appelés AGL (acides gras libres) ou AGNE (acides gras non estérifiés), sont nécessaires à de nombreux processus physiologiques comme la différenciation cellulaire. Les acides linoléiques (18 : 2 n-6), et linoléique (18 : 3 n-3) (acides gras essentiels) et leurs dérivés polyinsaturés à 20 et 22 atomes de carbone exercent des fonctions vitales, multiplication et différenciation des cellules, reproduction et croissance, précurseurs de prostaglandines, thromboxanes et leucotriène [161].

Le système nerveux est l'organe comprenant la plus grande concentration en lipides (50% du poids sec) intervenant au niveau de la structure, et de la fonction de conduction nerveuse [162, 163]. Les AGPI qui composent en grande partie les membranes des neurones sont indispensables au développement cérébral. Les AGPI ω 3 diminuent le risque d'arythmie cardiaque, ils ont aussi des effets anti-thrombotiques et anti-athérosclérose [164]. À côté de ces hypothèses vasculaires, de nombreux travaux ont montré une association entre neuro-inflammation et pathologie neurodégénérative [165]. Les AGPI ω 3 issus de l'alimentation pourraient prévenir la neurodégénérescence en régulant négativement la surexpression des cytokines inflammatoires qui apparaît au cours du vieillissement.

2.3.2. Cholestérol

Le cholestérol est une molécule multifonctionnelle, elle détermine les propriétés des membranes cellulaires et de leurs composants de signalisation, sert de précurseurs à la synthèse des hormones stéroïdiennes et règle les fonctions des différents signaux cellulaires [166]. Compte tenu de ces multiples fonctions, toute déficience du métabolisme du cholestérol est à l'origine de graves maladies [167]. Cependant, peu de données existent sur le rôle du cholestérol dans le système nerveux [168].

A partir des travaux réalisés sur des cultures de neurones purifiés deux hypothèses ont été formulées: durant le développement cérébral, les neurones réduisent ou arrêtent la synthèse du cholestérol et l'importent à partir d'un sous-type de cellules gliales, les astrocytes, qui sécrètent le cholestérol dans des particules de lipoprotéines riches en apolipoprotéine E (ApoE). Les neurones du SNC ont besoin de ce cholestérol provenant de la glie afin de former de nombreuses synapses fonctionnelles [169] et stimuler également l'efficacité de la libération de neurotransmetteurs [170].

Il a été montré que les vésicules synaptiques possèdent plus de cholestérol que les autres organites intracellulaires [171]. Le transport des vésicules le long des microtubules nécessite que leur membrane renferme du cholestérol [172]. Cela suggère que le transport efficace des vésicules synaptiques vers les terminaisons pré-synaptiques dépendrait de leur composition en cholestérol.

Le cholestérol pourrait également favoriser la différenciation post-synaptique. Les récepteurs des neurotransmetteurs, ainsi que d'autres composants post-synaptiques, sont associés aux rafts [173].

D'une manière générale, les neurones récupèrent le cholestérol grâce à deux voies différentes, soit par l'endocytose de lipoprotéines se liant à des récepteurs des LDL, soit par le transfert direct des lipoprotéines vers la membrane plasmique via des récepteurs des HDL [174].

2.3.3. Les lipides et la maladie d'Alzheimer

Les études épidémiologiques suggèrent que les patients MA présentent un profil lipidique plasmatique avec des taux élevés de cholestérol total, et de cholestérol-LDL [175] et des taux bas de cholestérol-HDL [176].

La machinerie génératrice de l'APP est hautement sensible aux petites modifications et altérations des niveaux des lipides et surtout du cholestérol [177].

Différentes études récentes ont montré que le traitement par les statines, molécules utilisées comme hypolipémiants, pourrait avoir un effet protecteur vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer [178].

2.3.4. Les relations cholestérol / métabolisme de l'A β

Au niveau des membranes neuronales et gliales, le cholestérol est distribué asymétriquement au niveau des deux feuillets membranaires. Le feuillet externe contient plus de 85% du cholestérol membranaire. Cette distribution différentielle du cholestérol membranaire au niveau des deux feuillets est nécessaire pour le fonctionnement physiologique normal [179]. Le vieillissement ainsi que le génotype apoe4 sont parmi les facteurs causant la diminution du ratio entre le cholestérol du feuillet interne et externe [180]. Certaines statines peuvent augmenter ce ratio en diminuant le cholestérol du feuillet externe [181].

Les études utilisant des modèles animaux, montrent une forte connexion entre les niveaux du cholestérol plasmatique et la génération de la protéine amyloïde. Un régime riche en cholestérol pendant 8 semaines provoque l'accumulation intracellulaire des A β dans les neurones de l'hippocampe chez les animaux [177].

Une grande quantité de cholestérol dans les domaines membranaires (lipid raft), facilite la liaison de la β et γ sécrétase avec leurs substrats l'APP dans une configuration optimum, et de ce fait promeut le clivage pathogénique indésirable du précurseur amyloïde [182].

La distribution intracellulaire du cholestérol se trouve soit sous forme de cholestérol libre au niveau de la membrane, soit sous forme d'ester de cholestérol ou sous forme de gouttelettes cytoplasmiques. L'acyl coenzyme A cholestérol acyltransférase (ACAT) catalyse la formation d'ester de cholestérol à partir du cholestérol, et des longues chaînes d'AG, ainsi l'ACAT contrôle l'équilibre entre ces deux formes du cholestérol cellulaire [181]. L'augmentation sélective de l'ester de cholestérol augmente la génération de l'A β . Un inhibiteur compétitif de l'ACAT réduit la biosynthèse de l'ester de cholestérol et la génération de l'A β , augmente la concentration du cholestérol libre.

2.4. DIABETE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Depuis peu de temps, l'intérêt s'est porté sur le rôle de l'insuline dans le vieillissement cérébral. Les dysrégulations du métabolisme de l'insuline sont associées au déclin cognitif lié à l'âge et à une augmentation du risque de MA. Les états au cours desquels le métabolisme de l'insuline est perturbé comme l'obésité, le diabète et les complications cardiovasculaires augmentent en prévalence, renforçant la nécessité de connaître leur effet potentiellement délétère sur le cerveau.

L'insuline possède de nombreux récepteurs dans le cerveau notamment au niveau des zones de la cognition comme l'hippocampe et le cortex frontal. De plus, elle module l'utilisation cérébrale de glucose et augmente les taux de neurotransmetteurs cérébraux impliqués dans le processus mnésique. Lorsque l'insuline est administrée à doses optimales avec une quantité suffisante de glucose, elle améliore la mémoire chez l'homme [183].

Mais ces bénéfices de l'insuline en physiologie normale peuvent être diminués par des états pathologiques modifiant son activité, comme l'insulino-résistance.

Au niveau cérébral, l'hyperinsulinémie et l'insulino-résistance ont pour conséquence une diminution du transport de l'insuline vers le cerveau. En périphérie, l'hyperinsulinémie chronique provoque une élévation des taux d'acides gras libres et des cytokines de l'inflammation. Ces effets sont exacerbés par l'obésité.

2.4.1. Obésité et maladie d'Alzheimer

Rôle des acides gras libres et de l'inflammation :

En physiologie normale, l'insuline inhibe l'Hormone Sensitive Lipase (HSL) donc diminue la libération d'acides gras libres (AGL) par l'adipocyte. Ce métabolisme est perturbé dans l'obésité et l'insulino-résistance causant une augmentation des acides gras libres. Chez des obèses ayant des taux d'acides gras libres chroniquement élevés, leur normalisation augmente la sensibilité à l'insuline de 50%.

Les AGL inhibent l'activité mitochondriale et donc altèrent les ressources énergétiques cérébrales. Ils ont aussi une action de diminution de la perméabilité de la barrière cérébro-méningée. L'élévation des AGL serait un facteur précoce ou initiateur de la pathogénèse de la MA, jouant aussi un rôle dans l'inflammation, en particulier via le TNF α (Tumor Necrosis Factor α). Le TNF α stimule la lipolyse et donc la libération d'AGL. Il est surexprimé dans le tissu adipeux des sujets insulino-résistants. Sa neutralisation stimule l'insulinosensibilité et diminue le taux d'AGL. Le TNF α a aussi des conséquences cérébrales:

il est élevé dans le cerveau et dans le LCR de patients avec une maladie d'Alzheimer ou un MCI (Mild Cognitive Impairment) et il inhibe le transport vers la périphérie des peptides β amyloïdes.

2.4.2. Conséquences de l'hyperinsulinémie

L'hyperinsulinémie, classiquement observée dans l'insulino-résistance, peut modifier les taux de TNF α et d'AGL.

Un clamp hyperinsulinique euglycémique est réalisé chez des sujets avec et sans MA. Son principe repose sur l'administration intraveineuse d'insuline à débit continu associée à une perfusion variable de glucose de manière à maintenir une glycémie normale.

L'observation est que chez les sujets sans MA de faibles doses d'insuline (10-20 μ UI/mL) améliorent la mémoire alors que des doses élevées (60-85 μ UI/mL) sont nécessaires dans le sous groupe de patients insulino-résistants atteints de maladie d'Alzheimer. Ceux-ci étaient majoritairement non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (ApoE4). L'hypothèse faisant de l'insulino-résistance une voie importante de la genèse de la MA est donc renforcée.

L'hyperinsulinémie retentit aussi sur le métabolisme du peptide β amyloïde. Au dessus du seuil optimal d'insulinémie, la facilitation de la mémorisation est moindre et un déclin cognitif est même objectivé. La forme longue du peptide β amyloïde à 42 acides aminés (A β 42) constitue des oligomères qui inhibent la mémorisation probablement en perturbant le mécanisme de potentialisation à long terme. Le peptide amyloïde β est aussi augmenté dans le sang mais uniquement chez les sujets ayant une maladie d'Alzheimer et ce d'autant plus que leur indice de masse corporelle est élevé.

Une récente étude montre qu'un clamp euglycémique hyperinsulinique entraîne une augmentation du peptide amyloïde β dans le LCR ainsi qu'une atténuation de la mémorisation [184].

L'hyperinsulinémie a aussi un impact sur l'inflammation du système nerveux central. Il est observé une augmentation de la concentration de plusieurs protéines de l'inflammation dans le LCR (IL β , IL-6, TNF α). Ces données démontrent pour la première fois que l'hyperinsulinémie périphérique augmente l'inflammation du SNC et amène la preuve que cette augmentation est exacerbée par l'obésité. De plus, une augmentation de la concentration d'un marqueur cérébral dérivé de la peroxydation des lipides, F2-IsoProstane a été aussi trouvée, les taux de F2 isoP sont corrélés positivement aux changements des taux d'A β 42.

L'insuline périphérique semble donc avoir un effet direct sur la chaîne de l'inflammation au niveau cérébral.

Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'hyperinsulinémie chronique peut potentiellement favoriser l'apparition d'une MA.

2.4.3. L'hypothèse d'une contribution des glucides

Cette hypothèse est fondée sur des études épidémiologiques comparées entre maladie d'Alzheimer et diabète, et sur la présence dans la substance amyloïde de composés dérivés de la fixation non enzymatique de glucides.

La principale étude dite « Rotterdam » [185] a porté sur plus de 6 000 personnes âgées de 55 à 99 ans, parmi lesquelles furent diagnostiqués 724 cas de diabète et 265 cas de démence. La corrélation s'est avérée très positive, tout particulièrement entre démence et diabète traité à l'insuline, ce qui peut signifier un diabète sévère car, en 1996, le traitement insulinaire des diabétiques n'était pas encore systématique. La corrélation la plus forte fut observée dans les cas de démence d'origine vasculaire, mais indépendamment de manifestations ou de risques d'athérosclérose (tabagisme, obésité, hypertension). L'étude prospective a montré que le diabète doublait le risque de démence [186]. Le glucose améliore la mémoire, aussi bien dans des observations chez l'homme que dans des expérimentations animales, et sa dérégulation est considérée comme responsable de la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer [187].

Les modèles animaux de 'diabète induit' suggèrent un effet neurodégénératif direct du diabète. La plupart des études montrent des résultats sur l'hippocampe – la zone associée à l'apprentissage et à la mémoire et la première structure affectée par la neurodégénérescence de la maladie d'Alzheimer, étayée par une étude post-mortem [188, 189].

2.4.4. La présence des produits terminaux de glycation

Les surcharges glucidiques entraînent une condensation non enzymatique de la molécule glucidique avec les groupements aminés libres (glycation) pour conduire par l'intermédiaire d'une base de Schiff instable à de la fructosamine. Cette dernière peut s'oxyder et se condenser à son tour avec le groupement guanidine de l'arginine pour aboutir à des produits terminaux (ou avancés) de glycation (*figure 14*). Il s'agit notamment de la N-epsilon-carboxyméthyl-lysine et de la pentosidine [190]. Ces produits de liaisons intermoléculaires qui affectent la structure des protéines en altèrent les fonctions. Les marqueurs de la glycation

se manifestent précocement chez les diabétiques, mais ils apparaissent aussi au cours du vieillissement des sujets non diabétiques normo glycémiques [191]. Le diabète n'est donc pas la seule cause de la glycation des protéines, des surcharges glucidiques sporadiques peuvent suffire.

Des anticorps spécifiques de produits terminaux de glycation (pentosidine et pyrraline) ont permis de mettre en évidence ces produits dans les plaques séniles [192]. Cette glycation démontre la contribution d'une anomalie du métabolisme glucidique. Les produits de glycation sont également oxydables (glycoxydation) et capables de produire un stress oxydatif neurotoxique [193], ils ont été retrouvés dans les enchevêtrements neurofibrillaires et dans les corps de Hirano localisés dans le cytosquelette et le cytoplasme de l'hippocampe, montrant ainsi leur intervention dans des altérations intracellulaires qui correspondent à un stade précoce de la dégénérescence neuronale [194], (*figure 15*).

Les protéines glyquées participent au stress oxydatif, une protéine glyquée génère 50 fois plus de radicaux libres qu'une protéine non glyquée [195]. La glycation concerne non seulement les protéines autochtones des neurones, mais aussi les apolipoprotéines E à localisation microgliale [196] ; elle peut participer à des mécanismes de peroxydation lipidique avec les conséquences cytotoxiques qui en découlent [197]. Cause ou effet, le rôle des glucides ne peut être récusé dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Ils participent à un phénomène toxique où les radicaux libres ont une place importante [198].

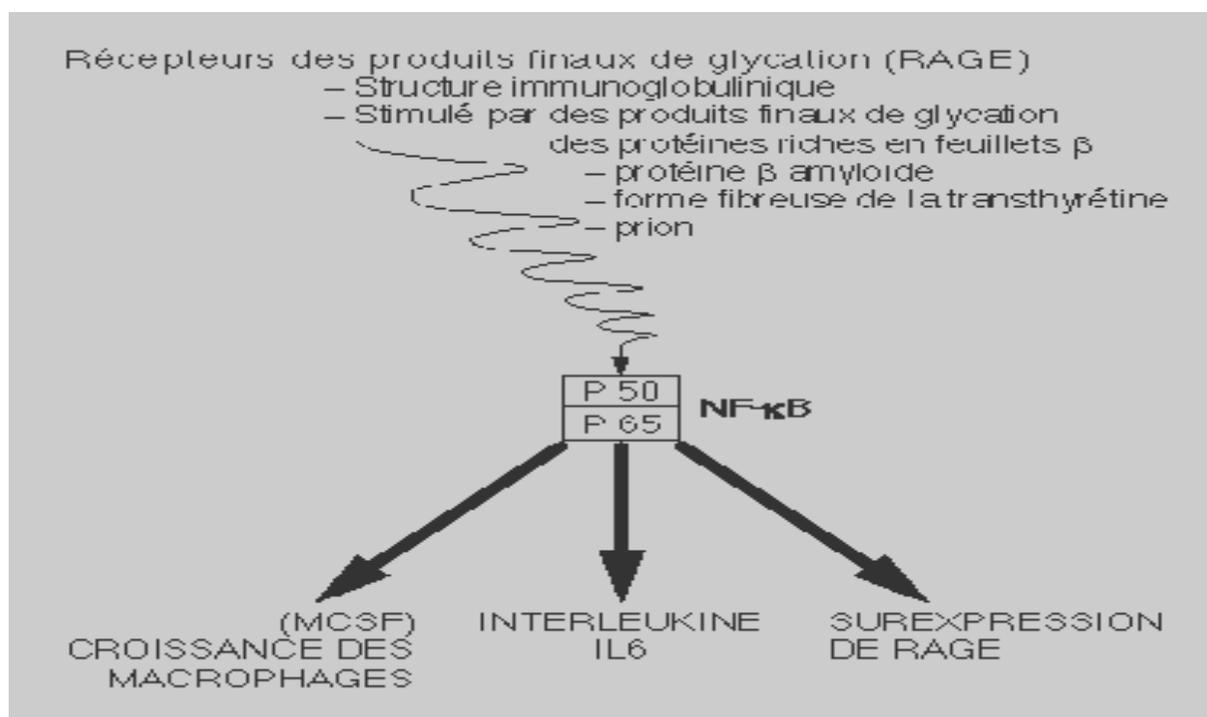


Figure 14 : Réaction inflammatoire induite par la stimulation des récepteurs aux produits finaux de glycation (RAGE) [199].

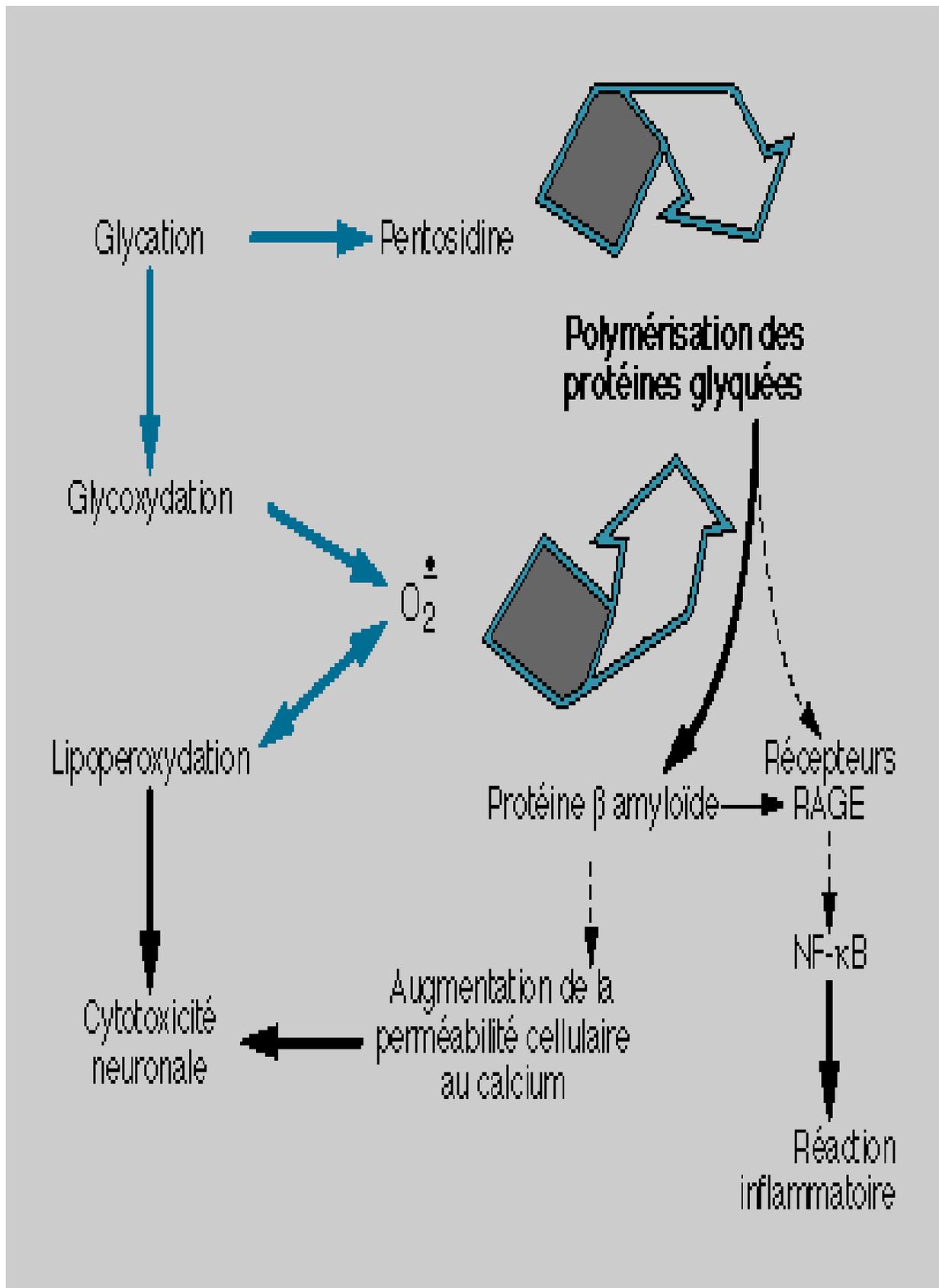


Figure 15 : Effets convergents de la glycation et de la lipoperoxydation sur la formation des plaques séniles par : réactions chimiques (flèches bleues), signaux cellulaires (flèches discontinues noirs), effets biologiques (flèches continues noirs) [199].

2.5. LE CORTISOL

Le cortisol est une hormone stéroïde, molécule à 4 cycles carbonés (*figure 17*) [200]. Les stéroïdes (cortisol, progestérone, œstradiol...) ont des propriétés biologiques différentes en raison des divers radicaux greffés sur ces cycles.

2.5.1. Synthèse du cortisol

Les métabolites de ces hormones résultent de la modification (ou de l'adjonction) de certains radicaux. Le cortisol est synthétisé par les cellules de la zone fasciculée de la surrénale à partir du cholestérol donnant naissance aux précurseurs du cortisol dans les différentes organelles où se situent les enzymes de la cascade de synthèse [200]. L'enzyme clé responsable de la synthèse dès la stimulation des cellules est la 11beta-hydroxylase (P-450_{C11}). Elle est stimulée par l'augmentation des concentrations intracellulaires d'AMP cyclique sous l'effet de l'ACTH. Il n'y a pas de « réserve » notable de cortisol libérable : il est sécrété immédiatement après sa synthèse, sous forme libre.

2.5.2. Transport du cortisol

Le cortisol est peu soluble dans l'eau. Toutefois dans le plasma, il se lie (à 90-97 %) à 2 protéines porteuses : une globuline et l'albumine. La première, la transcortine (ou *Cortisol-Binding Globulin*, CBG) est une protéine de grande affinité pour le cortisol qui s'y lie à 80-90% [201]. L'albumine n'en transporte que 5 à 10 % avec une affinité beaucoup plus faible. Au niveau des organes d'élimination du cortisol (foie et rein) et des tissus cibles, il se produit donc en permanence un déplacement des molécules de cortisol de sa forme liée à sa forme libre en fonction de sa dégradation ou de son utilisation. En effet, la forme libre est active parce qu'elle franchit les membranes cellulaires.

2.5.3. Actions du cortisol

Le cortisol agit *via* des récepteurs cytosoliques qui modulent la transcription de l'ADN. La modification des métabolismes qui en résulte a des effets diffus sur l'organisme. Les neurones des noyaux paraventriculaires (sécrétant la corticolibérine (CRH) et la vasopressine) et les cellules hypophysaires (sécrétant l'ACTH) sont des tissus cibles particuliers car ils sont responsables du rétrocontrôle négatif du cortisol sur sa propre sécrétion [202] (*figure 16*).

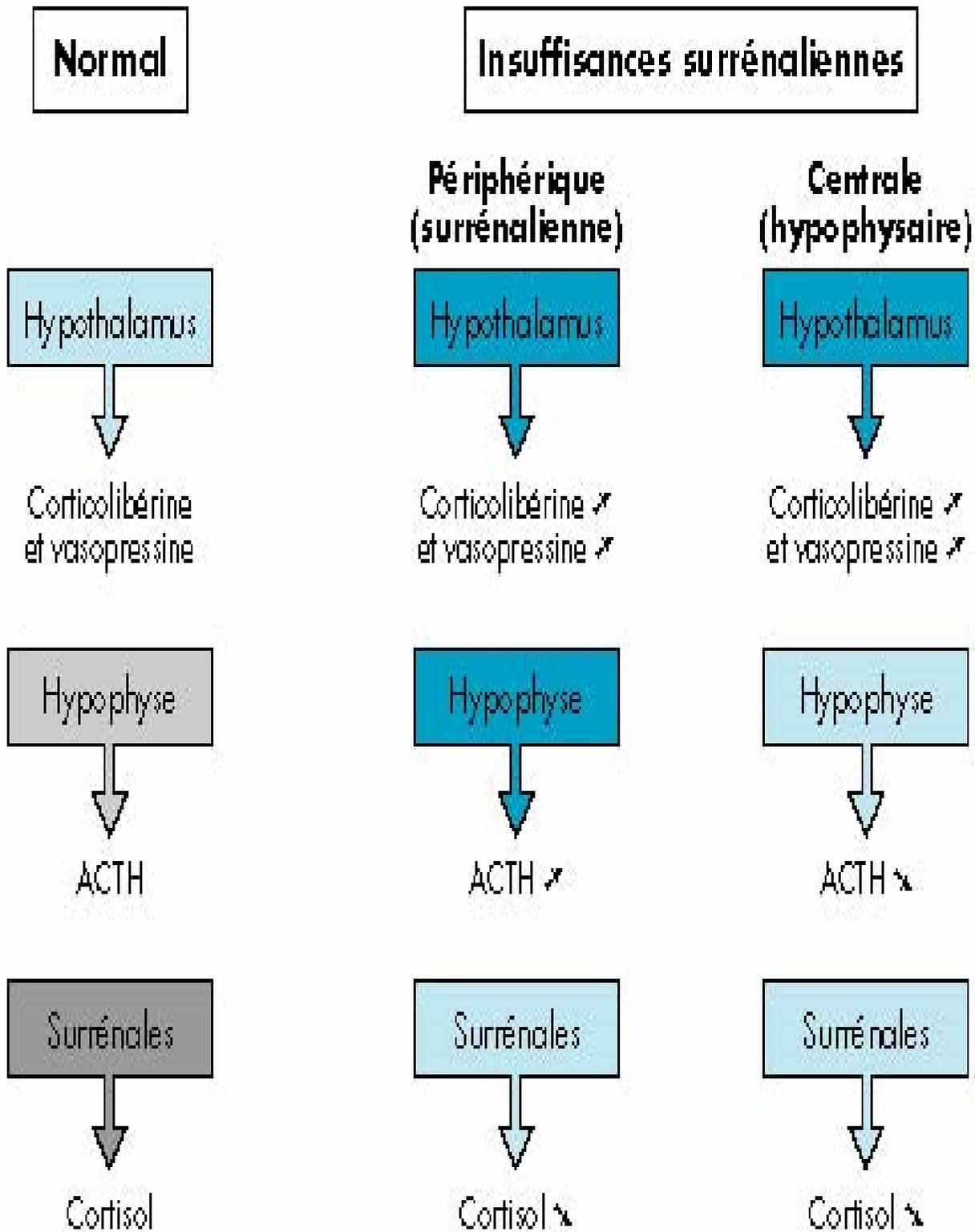


Figure 16 : Schéma de l'axe hypothalamo-hypophysaire normal et pathologique : insuffisances surrénaliennes périphérique ou centrale. Les neurones hypothalamiques

2.5.4. Le cortisol et maladie d'Alzheimer

Le stress est associé à une augmentation du cortisol dans le sang. Cette découverte initiale a été vérifiée de multiples fois, dans différentes conditions sur des modèles animaux et humains.

A long terme, une sécrétion élevée de cortisol entraîne des effets secondaires importants qui se traduisent par une diminution des performances de mémorisation et d'apprentissage. En effet, des études sur l'animal et sur l'homme (sujet âgé, malades touchés par la maladie de Cushing, malades mentaux, malades souffrant de la maladie d'Alzheimer) montrent une corrélation négative entre la concentration de cortisol dans le sang et des épreuves d'apprentissages et de mémorisation. La structure cérébrale qui serait fragilisée par le cortisol est l'hypothalamus.

D'autre part, il a été montré que le cortisol interfère avec les structures et les fonctions de l'hippocampe, en provoquant une certaine atrophie au niveau des dendrites des neurones, une altération des neurones pyramidaux et des interférences avec les activités des terminaisons nerveuses (les synapses) [203]. Il est possible d'émettre l'hypothèse que ces altérations sont basées sur des modifications de la nature des acides gras constituant les membranes biologiques, en particulier celles des neurones et de leurs terminaisons nerveuses.

Cette hypothèse a précisément été vérifiée positivement dans les travaux de l'équipe Yehuda, qui constituent la base de la formulation de NOSTRESS [204].

Des données cliniques mettent clairement en évidence chez l'homme une relation entre le stress et les niveaux de cortisol. Une étude américaine menée sur les soldats effectuant des stages d'entraînement à la survie montre de profondes modifications hormonales, et notamment des niveaux sanguins de cortisol [205].

Une autre étude réalisée sur des employés de banque participant à un séminaire de formation et devant réaliser une présentation en public montre des taux urinaires de cortisol significativement augmentés avant et après la prise de parole [206].

A très court terme, les mécanismes physiologiques mis en œuvre lors d'une situation de stress sont particulièrement bénéfiques car ils mettent à la disposition de l'organisme les ressources énergétiques nécessaires pour faire face à l'agression. A long terme, les effets sont néfastes voire désastreux, car ils épuisent l'organisme, le rendent vulnérable aux maladies [207] et produisent des altérations neuronales (perte de mémoire) [203].

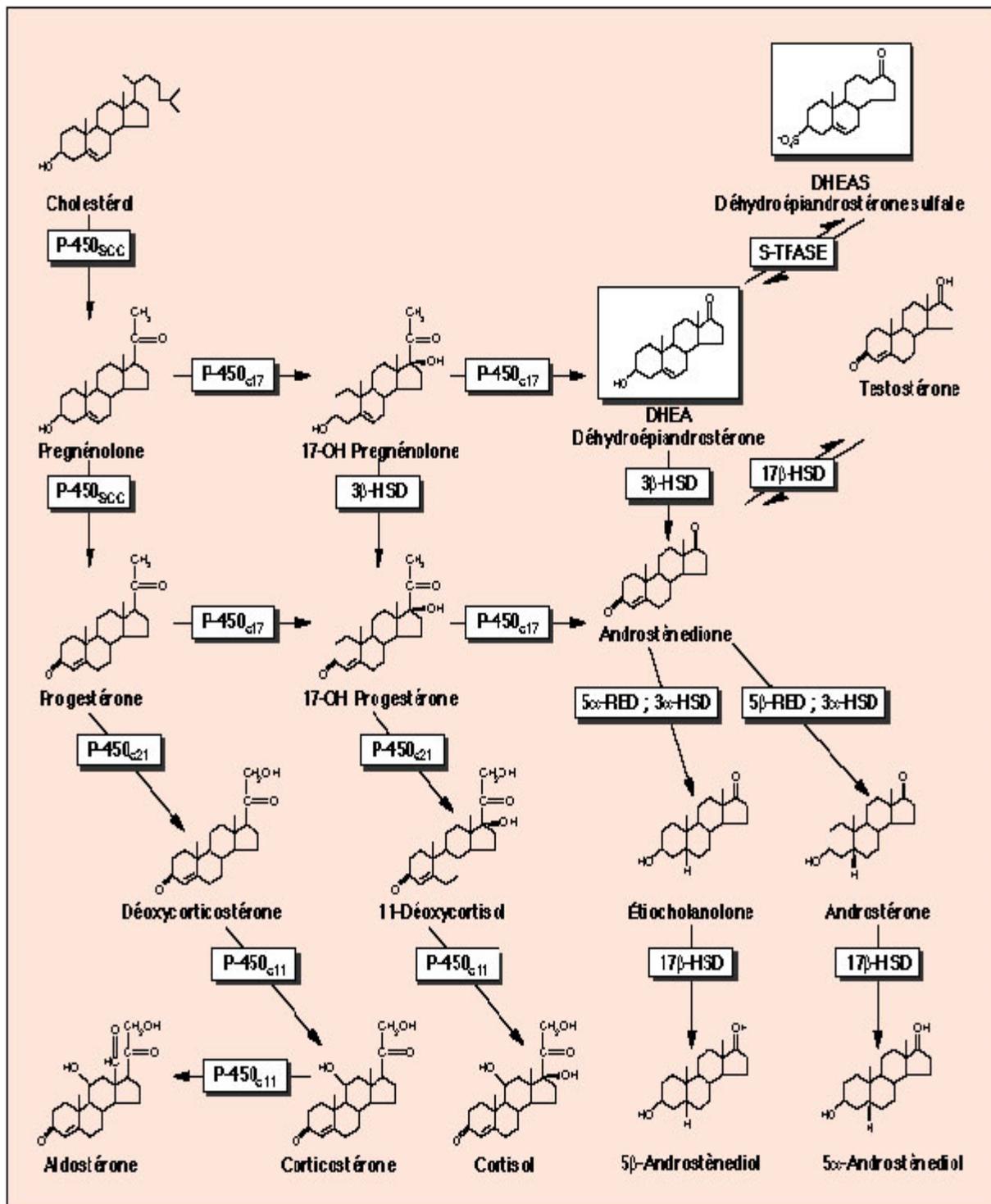


Figure 17 : Schéma métabolique des hormones stéroïdes dans le cortex surrénalien. Les voies de biosynthèse des hormones surrénaliennes comportant les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les hormones androgènes ainsi que leurs structures sont présentées. Les enzymes impliquées dans ces voies de biosynthèse sont les suivantes : P-450_{ssc}, enzyme de clivage de la chaîne carbonée ; P-450_{c17}, 17alpha-hydroxylase ; P-450_{c11}, 11beta-hydroxylase ; P-450_{c21}, 21-hydroxylase ; S-TFase, sulfotransférase ; 3beta-HSD, 3beta-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 17beta-HSD, 17beta-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 5beta-RED, 5beta-réductase ; 5alpha-RED, 5alpha-réductase synthétisant la corticolibérine (CRH) et la vasopressine sont la cible du rétrocontrôle négatif du cortisol. Les concentrations d'ACTH abaissées qui en résultent ferment la boucle de rétroaction négative [208].

2.6. HOMOCYSTEINE

2.6.1. L'homocystéine et les vitamines du groupe B

L'homocystéine est un acide aminé sulfuré à la croisée de voies métaboliques. Son métabolisme est complexe (figure 18) [209]. Il existe des relations étroites entre homocystéine et vitamines B6, B12 et acide folique. Au niveau plasmatique, les taux d'homocystéine varient de manière opposée aux concentrations en vitamines B6, acide folique et B12. Chez le sujet âgé, la supplémentation en acide folique doit systématiquement être associée à de la vitamine B12, car il est démontré que de fortes doses d'acide folique peuvent entraîner une détérioration des fonctions cognitives, en masquant une carence en vitamine B12.

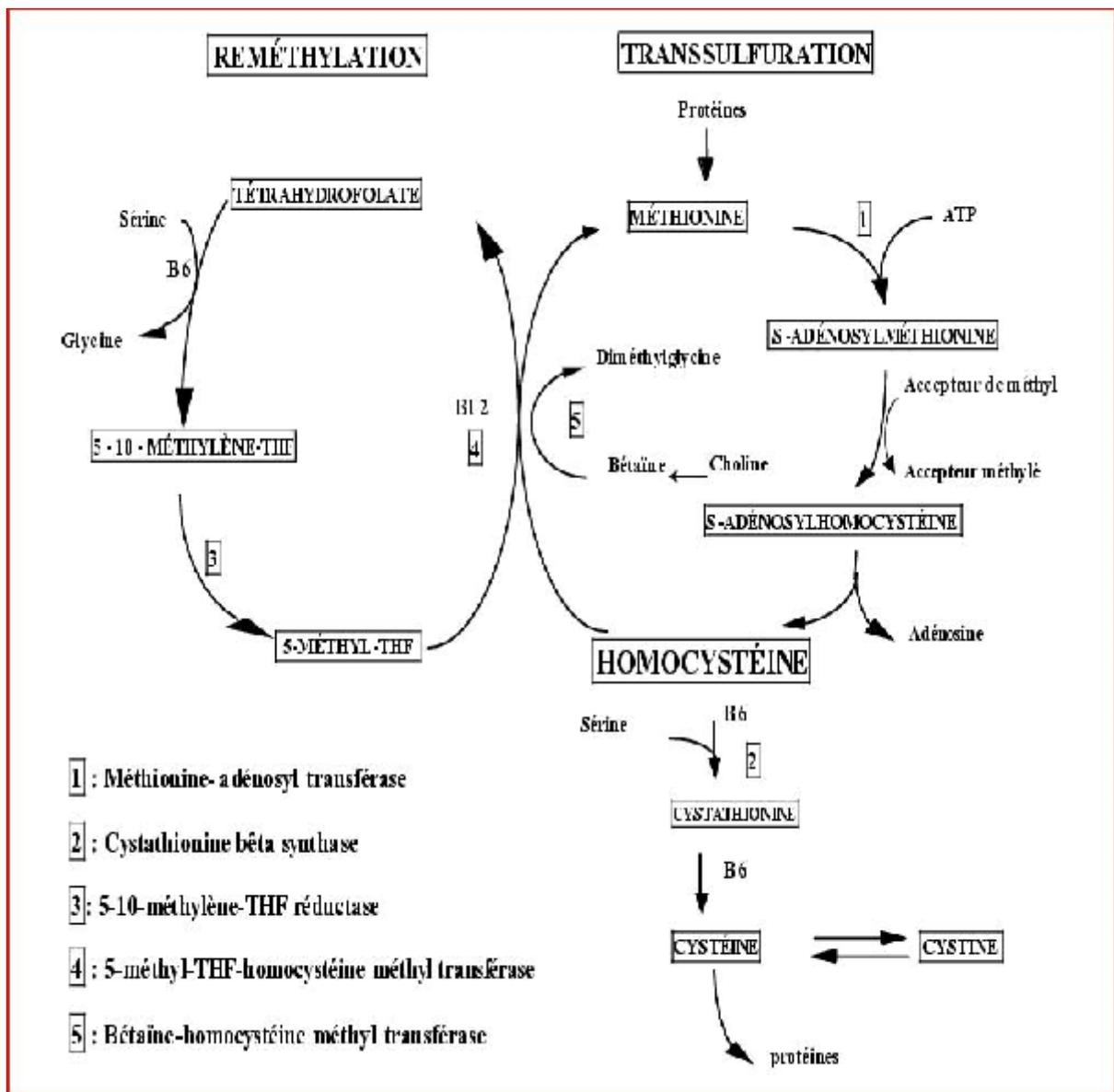


Figure 18 : Métabolisme de l'homocystéine [209].

2.6.2. Régulation du métabolisme de l'homocystéine

Le taux de la méthionine influence la synthèse de l'homocystéine et contrôle la répartition entre la reméthylation et la transsulfuration.

Chez l'homme suivant un régime alimentaire normal [210], l'équilibre entre la transsulfuration et les voies de reméthylation est fortement régulé. La moitié de l'Hcy est reméthylée, le reste empruntant la voie de transsulfuration [210-212].

En cas de déficit protéique, la méthionine intracellulaire est diminuée. La reméthylation est favorisée et l'Hcy est recyclée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant de méthionine. Dans ce cas seulement 10% de l'Hcy est catalysée par C β S. A contrario, lors d'un apport protéique excessif, la voie de la transsulfuration est favorisée par rétrocontrôle positif de la C β S et rétrocontrôle négatif de la MTHFR [213].

Le régulateur allostérique étant la SAM. Le taux élevé de la Met augmente la concentration de la SAM qui active la C β S et conduit l'Hcy vers la voie de transsulfuration inhibant ainsi la MTHFR et BHMT [214].

2.6.3. Homocystéine plasmatique

Du fait de sa cytotoxicité, l'Hcy est rapidement éliminée via le plasma. Ce mécanisme d'élimination hors des cellules, complète le catabolisme de l'Hcy par la voie de la transsulfuration permettant de maintenir des concentrations intracellulaires basses et précisément régulées inférieures à 1 μ mol/L [210].

Dans le plasma, l'Hcy peut se trouver sous 2 formes (la forme libre et la forme liaison-protéine). Du fait de sa fonction thiol libre (HS-) facilement oxydable uniquement 1 à 2% est sous forme réduite libre, le reste (98%) est sous forme oxydée [215-218], et est lié soit aux protéines, essentiellement l'albumine représentant 75% de l'Hcy plasmatique totale [219, 220], soit à une autre molécule possédant un thiol libre (cystéine ou homocystéine elle-même) pour former ainsi des disulfures : cystéine-homocystéine ou homocystéine-homocystéine encore appelées homocystéine pour représenter 25% [221]. La concentration totale en homocystéine (tHcy) se réfère à toutes ces formes plasmatiques (*figure 19*).

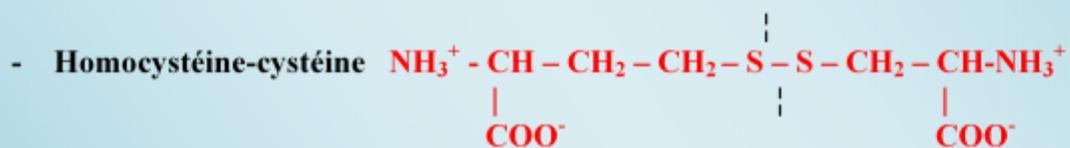
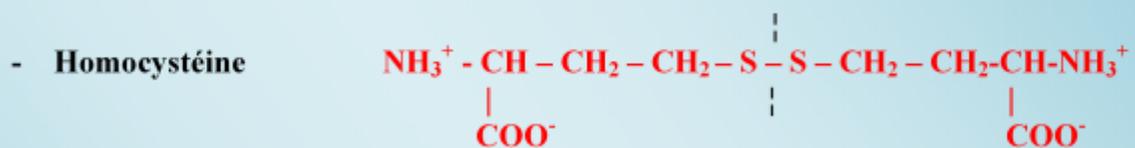
La concentration physiologique de l'Hcy plasmatique est comprise entre 5 et 15 μ mol/L. Un taux élevé d'Hcy plasmatique supérieur à la normale permet de décrire une hyperhomocystéinémie (Hhcy) [222].

I FORME REDUITE



II FORMES OXYDEES

- Les formes libres



- La forme liaison-protéine

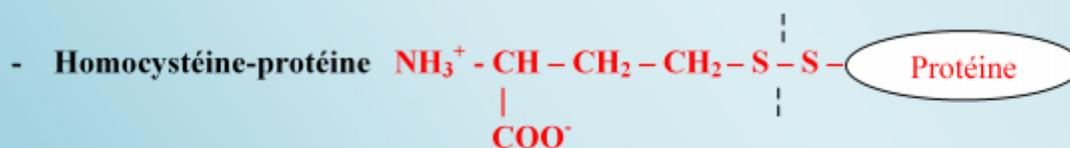


Figure 19 : Illustration de toutes les formes de l'Hcy présentes dans le plasma [223].

2.6.4. Homocystéine et maladie d'Alzheimer

De plus en plus d'études s'intéressent au rôle potentiel des vitamines du groupe B (en particulier folates, vitamines B12 et B6) dans la prévention du déclin cognitif et de la démence [224-230]. Il est actuellement bien reconnu qu'un déficit en vitamines B6, B12 et folates, cofacteurs intervenant dans la méthylation de l'Homocystéine (Hcy), est associée à une augmentation de l'Hcy plasmatique [231-234]. Des modèles cellulaires et animaux ont montré que des niveaux supraphysiologiques d'Hcy étaient neurotoxiques et pourraient donc avoir un effet direct sur le déclin cognitif. Ces dernières années, des études se sont intéressées au rôle potentiel de l'Hcy dans les dommages cérébraux. L'Hcy elle-même, ou les déficits en vitamine B12 et folates, pourraient perturber les réactions de méthylations et/ou les potentiels redox stimulant ainsi le flux calcique, l'accumulation des protéines tau et amyloïde, l'apoptose et la mort neuronale [235-242].

La plupart des études prospectives suggèrent un rôle protecteur des vitamines B, particulièrement des vitamines B9 et B12 sur le déclin cognitif et la démence [241-254].

Une étude a retrouvé de manière inattendue une augmentation de la vitesse de déclin cognitif chez des sujets qui avaient des apports totaux en folates supérieurs à 400 µg/jour [246].

Compte tenu du programme de fortification en place aux Etats-Unis, il est probable qu'un pourcentage significatif de sujets ait des apports en folates supérieurs aux recommandations de 400µg/jour. L'évidence épidémiologique d'un rôle protecteur de l'association des vitamines B est la première étape mais reste encore limitée. Une des limitations majeure des nombreuses études prospectives portant sur les vitamines B et qui pourrait expliquer les résultats contradictoires est le manque de contrôle statistique des éventuels facteurs de confusion alimentaires [225-244]. Les biais engendrés par ces facteurs de confusion sont particulièrement vrais pour les folates qui sont associés à de nombreux autres nutriments (ex : antioxydants, autres vitamines B, graisses alimentaires) et dont les carences peuvent être aggravés par d'autres variables liées au style de vie qui ont été impliquées comme facteurs protecteurs contre la MA et le déclin cognitif.

Quatre essais cliniques randomisés, réalisés sur de petits échantillons ont examiné les effets d'une supplémentation en une ou plusieurs vitamines du groupe B chez des sujets âgés en bonne santé [255], ainsi que chez des sujets présentant des troubles cognitifs ou une démence [256-258]. Aucune étude n'a mis en évidence d'effets bénéfiques sur les fonctions cognitives. Une des explications possibles est que ces études n'avaient pas assez de puissance pour permettre de détecter de faibles effets [259-260].

Dans un essai clinique récent conduit par Eussen et al [261], 195 personnes vivant au domicile ou en foyer logement, ont été randomisés pour recevoir 1000 μ g de la vitamine B12, ou 1000 μ g de la vitamine B12 plus 400 μ g d'acide folique, ou du placebo pendant 24 semaines. Aucun effet bénéfique sur les performances cognitives, déterminé par une batterie étendue de tests neuropsychologiques, n'a été observé quel que soit le groupe supplémenté considéré, bien que le déficit en vitamine ait été corrigé. La faible taille de l'échantillon, la durée courte de l'intervention sont probablement deux limites majeures de cette étude. Un autre essai clinique réalisé auprès de 276 personnes âgées de 65 ans et plus en bonne santé a testé l'hypothèse selon laquelle la diminution des concentrations plasmatiques d'Hcy par une supplémentation quotidienne en acide folique (1000 μ g) plus vitamines B12 (500 μ g) et B6 (10mg), permettrait d'améliorer les fonctions cognitives. Les concentrations plasmatiques d'Hcy étaient plus basses dans le groupe supplémenté que dans le groupe placebo mais aucun résultat n'était en faveur d'un effet bénéfique d'une supplémentation en vitamines du groupe B sur les performances cognitives [262].

Enfin, l'efficacité d'une supplémentation durant 3 ans en acide folique (800 mg/jour contre le placebo) sur les fonctions cognitives a été testée chez 818 hommes et les femmes âgés de 50 à 70 ans. Les patients sélectionnés avaient des concentrations plasmatiques élevées d'Hcy (≥ 13 mmol/l) et des niveaux sériques normaux de vitamine B12 (≥ 200 pmol/l). Cet essai a montré qu'une supplémentation en acide folique améliorait de manière significative la mémoire, la vitesse de transmission de l'information et la vitesse sensorimotrice. Les valeurs biologiques des folates étaient significativement augmentées et les concentrations d'Hcy plasmatiques diminuaient de 26% chez les sujets supplémentés comparé au groupe placebo [263].

2.7. MTHFR ET POLYMORPHISME GENETIQUE C677T

2.7.1. La protéine MTHFR

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase, plus communément appelée MTHFR, représente l'enzyme clé du métabolisme des folates. C'est une flavoprotéine cytosolique qui agit avec le dinucléotide adénine flavine (FAD) comme cofacteur en catalysant la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyl tétrahydrofolate, indispensable à la reméthylation de l'homocystéine en méthionine [264].

Chez l'homme, la protéine a deux isoformes. L'un de poids moléculaire 77KDa et l'autre 70 KDa dont la plus petite a été découverte uniquement dans le foie de l'adulte ainsi que dans le foie et les reins fœtaux [21].

La MTHFR possède deux domaines : le domaine catalytique représenté par l'extrémité N-terminale de poids moléculaire 40 KDa, liant le FAD (cofacteur), le NADPH (donneur d'électrons) et le méthylène tétrahydrofolate et le domaine de régulation à l'extrémité C-terminale de poids moléculaire 37 KDa [265]. Entre ces deux domaines se trouve une forte région hydrophobe avec une séquence d'acides aminés Lys-Arg-Arg-Glu-Glu constituant un site de clivage par la trypsine [266]. La digestion de la MTHFR par la trypsine ne provoque pas la perte de l'activité catalytique réductrice de l'enzyme. Par contre, la protéine devient sensible à la régulation allostérique [265] (*figure 21*).

2.7.2. Rôle de la MTHFR

La MTHFR intervient dans le métabolisme de l'homocystéine. (*Figure 20*)

Le 5-méthyltétrahydrofolate est régénéré à partir du 5, 10-méthylène tétrahydrofolate au cours d'une réaction catalysée par la 5, 10-méthylène tétrahydrofolate-réductase.

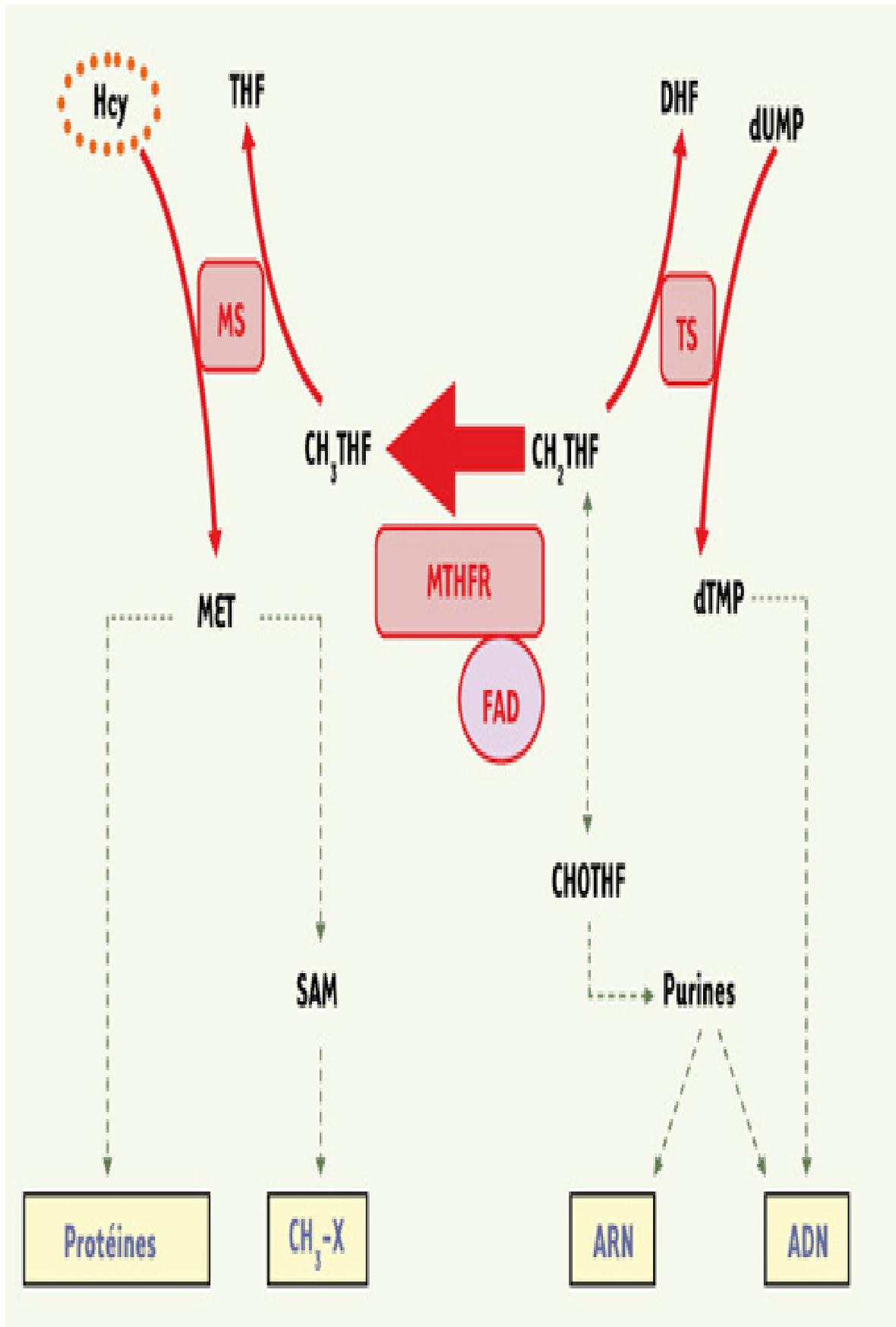


Figure 20 : Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR. [18]

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate (CH_2THF) en 5-méthyl tétrahydrofolate (CH_3THF). L'activité de la MTHFR affecte ainsi la disponibilité du CH_2THF , ce qui influence la synthèse de l'ARN et de l'ADN. Le CH_3THF est requis pour la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine (MET), qui intervient elle-même dans la synthèse protéique et la méthylation de l'ADN et d'autres composés ($\text{CH}_3\text{-X}$).

2.7.3. Gène de la MTHFR

La première indication fut la découverte d'un variant thermolabile de la MTHFR, dont l'activité spécifique a été réduite de 50% par rapport aux témoins, à 37°C (30minutes), et de 65% après chauffage in vitro à 46°C pendant cinq minutes [267], responsable d'une Hcy modérée. Ce variant fut retrouvé avec une fréquence significative chez les malades vasculaires et les coronariens, en particulier ceux qui avaient justement une Hcy [268].

De ce fait, le clonage et la localisation du gène de la MTHFR ont été étudiés pour la première fois et la mutation ayant pour conséquence la production d'une enzyme thermolabile à activité spécifique diminuée fut recherchée.

En effet, le gène codant pour la MTHFR a été localisé sur le bras court du chromosome 1 (1p36.3) et il comporte 11 exons [20]. Sa région promotrice contient plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription, mais ne possède pas une séquence TATA box. Sur l'exon 1 du gène il y a un site d'épissage alternatif ; la région UTR de ce gène est longue, montrant la complexité dans la régulation de ce gène [269] (*figure 21*).

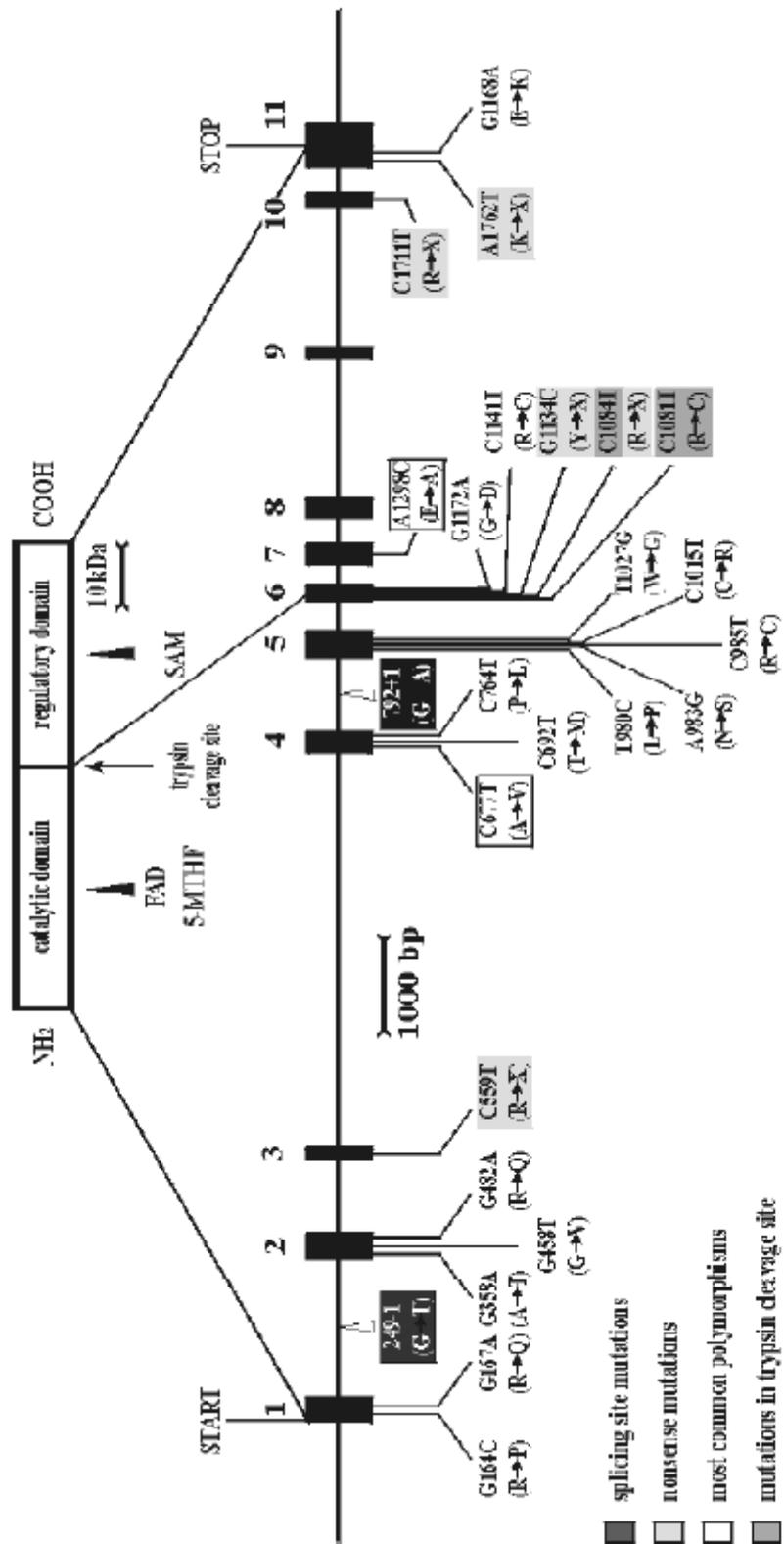


Figure 21 : Gène, protéine et polymorphisme de la MTHFR [265]

2.7.4. Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR

Le polymorphisme identifié sur le gène de la MTHFR et qui a effectivement pour conséquence de rendre thermolabile la protéine est une substitution d'une cytosine par une thymine en position 677 dans la séquence nucléotidique. Elle se traduit dans la séquence protéique par la substitution d'une alanine par une valine sur le codon 222 [21,270] (*figure 21*). La mutation change la structure secondaire du peptide ainsi que les interactions entre les monomères. La protéine modifiée perd son cofacteur FAD rapidement, ce qui diminue sa stabilité et par conséquent son activité [271]. Il importe de savoir aussi que l'extrémité catalytique N-terminale de la MTHFR humaine est homologue à celle d'*Escherichia coli*. L'acide aminé Ala 177 de la protéine d'*E.coli* est représenté par Ala 222 dans la protéine humaine. L'étude de l'activité enzymatique de la protéine mutée d'*E.coli* comparée au phénotype sauvage a montré que la mutation n'affecte pas la cinétique de la réduction du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyl tétrahydrofolate, mais l'affinité de l'enzyme à son cofacteur FAD [272]. Le polymorphisme présente une hétérogénéité de distribution mondiale. La fréquence de l'allèle C677T est de 1% chez les noirs du Brésil et des Etats Unis [273, 274], de 7% chez les noirs Africains [275] et jusqu'à 40% chez les sujets d'origine Italienne ou Hispanique [276, 277]. Dans les pays du Maghreb, les résultats ont montré une fréquence allélique de 17,8% en Tunisie [278]. En Algérie, aucune fréquence n'a été rapportée.

2.7.5. Effets métaboliques de la mutation

2.7.5.1. Effet de la mutation sur l'homocystéine

Plusieurs études ont montré qu'à l'état homozygote TT, le polymorphisme, noté C677T, augmente le risque d'avoir une Hhcy modérée par rapport aux génotypes CT et CC. La formation d'un variant enzymatique à activité insuffisante, entraîne une diminution du 5-méthyl THF, limitant ainsi partiellement la voie de la reméthylation [21, 279]. Cependant cet effet de la mutation ne s'observe que si le statut folique est bas [21, 279, 280, 281]. Ce qui tend à prouver qu'un apport suffisant de folates par l'alimentation peut compenser le déficit en folates métaboliquement disponible et par ailleurs corriger l'effet de la mutation, qui augmente l'affinité du FAD à la protéine et par conséquent une augmentation de sa stabilité.

2.7.5.2. Effet de la mutation sur les folates

Le génotype (T/T) de la MTHFR rendant l'enzyme thermolabile, diminue l'efficacité et par voie de conséquence la quantité de méthyl-THF qui en résulte, et entraînant une perturbation du métabolisme de folate et un changement de la composition cellulaire des dérivés foliques [282].

Plusieurs investigateurs ont trouvé que les taux plasmatiques des folates sont significativement bas chez les individus de génotype T/T [279, 280, 283, 284].

Molloy et al [285] ont rapporté une diminution non seulement des folates plasmatiques mais aussi érythrocytaires chez des femmes avec le génotype T/T de la MTHFR. Par contre, d'autres équipes ont trouvé effectivement une baisse de folate plasmatique chez les individus du génotype T/T mais la concentration du folate érythrocytaire s'est avérée élevée [279, 284].

La différence dans les résultats de ces études peut être expliquée par l'utilisation de diverses méthodes de dosage [285].

Les conséquences d'une supplémentation par l'acide folique peuvent être ajoutées à cette évidence de l'effet métabolique de la mutation C677T sur le folate et l'homocystéine [286, 287]. En effet, une différence du changement du taux de folate et d'homocystéine, suite à une supplémentation de 0,5mg/j d'acide folique entre les individus T/T et CC a été constatée [284].

La plupart des études visent le génotype TT, bien que le génotype CT puisse aussi causer une baisse des folates, une augmentation d'homocystéine est une réponse positive à la supplémentation en acide folique [276]. En effet, il est admis que la production de méthyles disponible est abaissée de 70% chez les porteurs homozygotes de la mutation et de 35% chez les hétérozygotes [288].

La présence de la mutation entraîne un ralentissement de l'activité du cycle folique, augmente le besoin de ce nutriment et une diminution du potentiel méthylant de l'organisme, y compris sa capacité à reméthyliser l'homocystéine. Par conséquent ce polymorphisme peut être un candidat unique pour ce rôle en raison de sa neurotoxicité directe [235, 289, 290] et son association avec la maladie cérébrovasculaire [291], qui joue actuellement un rôle significatif dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer [292].

2.7.6. Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR et MA

Depuis sa caractérisation biochimique en 1991 [268] et son identification génétique en 1995 [21], l'allèle 677T du gène MTHFR a suscité un intérêt tout particulier en recherche

clinique. C'est ainsi qu'il s'est avéré être un facteur de risque associé à des pathologies aussi diverses que les maladies cardiovasculaires [293-295], l'anomalie de fermeture du tube neural [296, 297], les cancers [298-300] et les maladies psychiatriques [301, 302], avec toutefois des résultats contradictoires dans les cancers [303] et les MCV.

Il a été noté une différence de distribution du polymorphisme C677T en fonction de l'âge, puisque la fréquence était de 83 % et 17 % respectivement chez les sujets de 40 à 60 ans et ceux de plus de 60 ans. Ceci est en accord avec d'autres études qui montrent que la fréquence de cette mutation est significativement plus basse chez les personnes âgées que chez les sujets plus jeunes [304, 305], ce qui pourrait indiquer un effet délétère du génotype TT. La survie des sujets qui portent la mutation est amoindrie en cas de déficit en folates, ce qui diminue sa fréquence chez les sujets âgés. De même, une meilleure alimentation des mères des sujets jeunes, pourrait expliquer la différence observée dans la répartition de la fréquence en fonction de l'âge. Les homozygotes TT seraient avantagés quand leurs mères ont une valeur de folate suffisamment élevée pendant la grossesse.

Ils n'ont pas observé de différence significative selon le sexe (44 % chez l'homme *versus* 56 % chez la femme), ce qui est en accord avec une étude récente menée en Espagne [306].

Une analyse, qui considérait 6 000 individus, a indiqué que le génotype 677TT cause une augmentation de 70 % du risque de dépression [307]. Des travaux sur la démence et le déclin cognitif léger ont permis de constater qu'il existe une augmentation des taux d'homocystéine plasmatique chez un nombre significatif de patients [307]. Puisque la démence est caractérisée, entre autres, par un affaiblissement des vaisseaux sanguins qui irriguent le cerveau, le variant 677T représente donc un facteur de risque potentiel. Le lien entre le polymorphisme et la démence d'origine vasculaire ou encore la maladie d'Alzheimer n'a toutefois pas été clairement établi [18]).

2.8. AUTRES FACTEURS DE RISQUE

2.8.1. Les maladies cardiovasculaires et la démence Alzheimer

Contrairement à la distinction établie dans le passé entre les démences vasculaire et neurodégénérative, des données récentes suggèrent que la MA peut être initiée par des facteurs vasculaires qui précèdent les modifications neurodégénératives. On connaît maintenant l'importance grandissante de ces facteurs vasculaires dans la maladie d'Alzheimer [308]. L'hypoperfusion et la pathologie microvasculaire cérébrale contribuent à l'apparition de la maladie d'Alzheimer [309]. Plus encore, la présence d'une atteinte vasculaire semble modifier l'expression clinique de la maladie comme le montre la Nun Study [310]. Casserly et Topol ont mis en évidence que la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose ont en commun des origines génétiques et des facteurs de risques environnementaux, comme l'Apo E, l'hyperhomocystéinémie, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le syndrome métabolique, le tabagisme, l'inflammation, l'augmentation de la masse grasse et l'obésité [311].

2.8.2. Hypertension

De nombreuses études montrent qu'il existe un lien entre l'hypertension artérielle et la MA [312-314]. Une étude franco australienne portant sur 1241 sujets âgés hypertendus, a montré que le traitement antihypertenseur était associé à un risque plus faible de MA (OR-0,58 ; IC 95% 0,42-0,81). Les inhibiteurs calciques notamment étaient associés à une diminution du risque d'apparition d'une MA [315]. Parmi les traitements cardiovasculaires identifiés comme ayant un possible effet bénéfique dans la prévention de la MA on retrouve également les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC). Dans l'étude Cache Country sur 3038 sujets, tous les traitements antihypertenseurs identifiés à l'entrée étaient associés à une plus faible incidence de la MA (risque relatif ajusté 0,64 ; IC 95% 0,41-0,98).

2.8.3. L'inactivité physique

Elle est associée au risque cardiaque et à la pathologie vasculaire cérébrale. L'activité physique régulière peut être un facteur protecteur du déclin cognitif et de la démence. Dans une étude cas-contrôles, les patients ayant pratiqué un sport, ou toute autre activité physique pendant la période d'âge mûr ont montré un risque plus faible de maladie d'Alzheimer [316]. Dans l'étude longitudinale de la Canadian Study of Health and Aging, les auteurs ont mis en

évidence qu'un bon niveau d'activité physique sur une période de cinq ans était associé à un plus faible risque de déclin cognitif, notamment de maladie d'Alzheimer (odds ratio 0,50 ; IC 95% 0,28-0,90) [317].

2.8.4. Facteurs hygiéno-diététiques

Une consommation régulière d'acides gras oméga 3 et d'antioxydants de type vitamine C et E est essentielle dans la prévention vasculaire. Une étude transversale avait retrouvé des consommations moins importantes en vitamines C et E chez les patients porteurs d'une MA par rapport aux sujets contrôles [318]. Dans la Chicago Health and Aging, une consommation majorée de vitamine E naturelle (dans l'alimentation) était associée à un plus faible risque de MA [319], alors que dans la Honolulu Asia Aging il n'y avait pas de réduction de ce risque chez les sujets japonais qui consommaient des vitamines C et E sous formes de suppléments de synthèse [320]. Dans la Rotterdam Study, une alimentation riche en poisson avait un effet protecteur vis-à-vis de la MA [321].

2.8.5. Le mercure comme cause possible pour les cas "non-familiaux" ?

La toxicité de ce métal est telle qu'il nous a semblé nécessaire d'en exposer les méfaits dans ce travail à travers les nombreuses études mettant en évidence la relation cause à effet dans beaucoup de pathologies.

Pour les cas n'ayant pas d'origine génétique, un nombre croissant d'indices désignent le mercure comme cause possible

- Ce mercure aurait pour principale origine les plombages dentaires : L'OMS considère que le mercure-vapeur émises par les amalgames dentaires est la 1^{ère} source d'exposition mercurielle des populations occidentales [322].

Boyd Haley et ses collègues [323], ont récemment montré comment le mercure induit une neurodégénérescence caractéristique de la MA, suite à une exposition chronique à de faibles doses de mercure-vapeur.

- Le mercure inhalé qui passe le mieux et plus directement au travers des poumons et qu'il est facilement stocké dans le cerveau qu'il gagne aisément grâce à sa lipophilie partielle, les cellules gliales le stockent durablement, pour des dizaines d'années, sous forme d'un complexe insoluble soufré de cations mercuriques (Hg^{2+}).

- On mesure un taux de mercure plus élevé dans le cerveau des malades d'Alzheimer, et tout particulièrement dans le noyau basal de Meynert au centre de l'encéphale, là où la dégénérescence neuronale est la plus forte chez les malades [324, 325].
- Chez le rat de laboratoire exposé à du mercure, on observe des processus de dégénérescence du cerveau, semblables à ceux de la maladie d'Alzheimer. [326].
- Les malades ont presque toujours un taux de mercure sanguin anormalement élevé (2 à 3 fois plus élevé que pour l'échantillon témoin) [327].
- Le mercure inhibe la fixation des riboses sur l'adénosine diphosphate (ADP ; coenzyme nucléotidique de la tubuline), ce qui inhibe la polycondensation de cette protéine, entraînant la formation d'amas neurofibrillaires cytotoxiques [328]. Cet effet n'est pas retrouvé avec d'autres métaux neurotoxiques : aluminium, plomb, manganèse [329].
- Des chélateurs (molécules captant les métaux) associés à des antioxydants permettent une solubilisation de la protéine β -amyloïde (PbA). C'est un indice de plus en faveur d'une responsabilité du mercure dans l'accumulation de cette protéine pathogène [330].
- L'effet toxique du mercure est aggravé chez les personnes génétiquement moins aptes à sa détoxification. Or, cette susceptibilité génétique au mercure (liée au polymorphisme du gène de l'*apolipoprotéine E* ou *APOE*) est corrélée à un risque beaucoup plus élevé de développer une MA, et de la développer plus jeune [331, 332]. Un trouble cognitif léger a aussi plus de valeur prédictive chez ces derniers [333].

Débarrasser le cerveau de ses excès de certains métaux pourrait être une piste thérapeutique contre la MA [334].

2.8.6. L'aluminium

Le lien possible entre la consommation d'aluminium et la maladie d'Alzheimer est encore l'objet de recherches [335]. Des études animales ont permis de confirmer la neurotoxicité d'injections d'aluminium. Les fortes concentrations d'aluminium dans les liquides nécessaires au fonctionnement de reins artificiels ont été reliées à des cas de démence [336]. Enfin, d'importantes concentrations cérébrales d'aluminium ont été rapportées après autopsie du cerveau des malades.

Une étude française [337] s'étendant sur près de huit ans a identifié comme facteur de risque de fortes concentrations en aluminium dans l'eau potable. Neuf des treize études

épidémiologiques sur le sujet arrivent aux mêmes conclusions et relie directement la dose au risque de développement de la maladie d'Alzheimer [338].

2.8.7. L'éducation, l'activité intellectuelle et l'optimisme

Le niveau d'éducation semble jouer un rôle important dans le risque de survenue de la maladie d'Alzheimer. Les personnes n'ayant pas poursuivi une longue scolarité (moins de six ans) ont plus de risques d'être atteints. De la même manière, une scolarisation plus importante aurait pour effet de retarder l'apparition des premiers troubles.

Une récente étude suédoise sur des jumeaux dont l'un est malade a permis de souligner que l'implication intellectuelle plus tôt dans la vie aurait une influence sur la survenue de la maladie [339].

Exploitant les données de la très large enquête PAQUID, des chercheurs français ont également pu mettre en évidence l'influence du niveau d'éducation [340]. En septembre 2001, les mêmes scientifiques de l'INSERM soulignent que les occupations à l'âge adulte ne semblent pas jouer un rôle déterminant contrairement à celles effectuées durant l'enfance et l'adolescence [341].

En suivant des nonnes pendant de nombreuses années, des chercheurs américains [342] ont même suggéré que des traits de personnalité comme la sérénité et l'optimisme pourraient avoir un effet protecteur.

2.8.8. Les traumatismes crâniens

Des études ont montré que des blessures à la tête durant la jeunesse augmentent le risque de développer par la suite la maladie d'Alzheimer. Les chercheurs se sont particulièrement intéressés aux boxeurs victimes de démence pugilistique.

Dans le cerveau de ces sportifs "saouls de coups", les changements moléculaires observés sont identiques à ceux se produisant chez les malades d'Alzheimer. Une récente étude* témoigne de l'accumulation anormale de la protéine tau. Par extension, ces résultats suggèrent que des blessures à la tête pourraient augmenter le risque de développer la maladie d'Alzheimer à un âge plus avancé [343].

ETUDE PRATIQUE
ETUDE PRATIQUE

METHODOLOGIE

3. METHODOLOGIE

L'étude que nous avons entreprise est de type cas témoins; elle a duré deux ans, elle a porté sur deux types de populations :

3.1. Recrutement

- Les malades : il s'agit d'un échantillon de la population nord Constantinoise présentant une maladie d'Alzheimer diagnostiquée, et intéresse les deux sexes.

Les recrutements de malades ont été effectués au niveau de :

- Service de neurologie CHU de Constantine.
- En consultation privée (Skikda, Constantine).
- Les témoins : sujets sains des deux sexes recrutés au niveau de la maison de retraite de Constantine (Hamma Bouziane) et de Skikda.

3.2. Critères diagnostics clinico-biologiques

Les critères diagnostics de recrutement des patients sont ceux du DSM IV (Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition), ceux de la NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer Disease and Related Disorders Association), plus un examen MMSE modifié (Mini Mental Status Examination).

Nous avons recensé pour les deux populations témoins et malades la présence de facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer et cardiovasculaire (HTA, diabète (DNID), hypercholestérolémie, hyperhomocystéinémie, tabagisme et lipides).

- La pression artérielle est mesurée chez les sujets assis depuis au moins 5 minutes pour la population générale et en décubitus chez les malades grâce à un appareil ordinaire (un sphygmomanomètre modèle Spengler). La présence d'une HTA est retenue chez tous les sujets déjà connus et traités ainsi que chez les sujets ayant une diastolique égale ou supérieure à 95 mm Hg et/ou une systolique supérieure ou égale à 14 mm Hg.
- Le diabète a été défini par une glycémie matinale à jeun à 1.26g/l.
- Le poids a été mesuré chez les sujets sans chaussures grâce à une balance portable

La taille a été prise sans chaussures grâce à des marques que nous avons placées sur le mur. Pour les malades chez lesquels il a été impossible de prendre ces mesures nous avons utilisé la carte d'identité nationale pour la taille ou à défaut posé des questions aux proches et fait des approximations pour le poids. Le poids et la taille sont exprimés selon l'IMC (Kg / m^2)

- Le tabagisme : nous avons pris en considération tout fumeur (sujets prenant plus de 1 cigarette par jour).
- Tous les sujets ont eu un bilan biologique comprenant un dosage de :
 - L'homocystéine : L'hyperhomocystéinémie est retenue pour une concentration plasmatique $>15 \mu\text{mol/L}$.
 - Cortisolémie 7h – 9h : 4.2 à 38.4 $\mu\text{g/dl}$ (valeur médiane de 10.8 $\mu\text{g/dl}$).
 - L'insulinémie : valeurs de référence 0.2 – 9.4 $\mu\text{U/ml}$.

3.3. Critères d'inclusion et d'exclusion

Des critères d'inclusion et d'exclusion ont été établis pour les malades et pour les témoins.

- Malades

- Critères d'inclusion :

Les sujets présentant une MA probable ou possible retenues au niveau du service de Neurologie du CHU de Constantine ou en consultation privée (MMSE inférieur ou égal à 24)

- Critères d'exclusion :

Les patients présentant une démence vasculaire ou tumorale seront exclus de cette étude.

- Témoins :

- Critères d'inclusion :

Tous les sujets âgés de plus de 50 ans acceptant de participer à l'enquête et ne présentant pas de maladie d'Alzheimer

- Critères d'exclusion

➤ Tous les sujets présentant un MMSE supérieur à 24.

3.4. Questionnaire

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer probable ou possible est confirmé pour chacun de nos malades par le médecin neurologue. Tous les sujets de notre étude ont subi une évaluation cognitive via le test de l'MMSE (modifier) (*annexe 1*), un score est attribué pour chaque malade.

Un interrogatoire du patient est mené par nous même ou par le médecin consultant. Un questionnaire a été établi en collaboration avec les médecins neurologues comportant l'état civil du patient, le niveau d'étude, les facteurs de risques mnésiques, les antécédents personnels etc... (Voir *annexe 2*).

L'interrogatoire a apprécié la sédentarité et l'existence d'antécédents familiaux d'Alzheimer et de coronaropathies ou d'autres localisations cliniques d'athérome. Les antécédents personnels et familiaux ont porté sur les autres facteurs de risque en priorité, chez les sujets et leurs familles maternelles et paternelles.

3.5. Le prélèvement

Tous les prélèvements ont été réalisés sur tube EDTA.

Les prélèvements sanguins pour les dosages quantitatifs des hormones (homocystéine, cortisol et insuline) doivent être conservés dans la glace entre le moment du prélèvement et la centrifugation. Il est important de séparer le plasma des cellules dès que possible, car la présence de fibrine dans les échantillons de sérum pour le dosage de l'insuline ou du cortisol peut causer des résultats incorrects. Il en est de même pour l'homocystéine dont la synthèse peut avoir lieu dans les hématies.

Pour la réalisation des bilans lipidiques les prélèvements ont été effectués sur des sujets à jeun d'au moins dix heures.

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction d'ADN nécessite l'utilisation des tubes avec un anticoagulant EDTA qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes DNase ou nucléase [344].

3.6. Enregistrement

Tous les prélèvements sont étiquetés soigneusement, et le sang prélevé est acheminé directement au laboratoire pour l'analyser.

Après centrifugation le surnageant est utilisé pour le dosage des différents paramètres. Le cholestérol, les triglycérides, les HDL-C et les LDL-C ont été dosés le jour même du prélèvement.

Le cortisol et l'homocystéine ont été dosés le jour même alors que l'insuline a été conservé à -20° pendant au moins une semaine.

Le culot a servi pour l'extraction de l'ADN qui a été conservé à -80°.

3.7. Méthodes de dosage des paramètres lipidiques

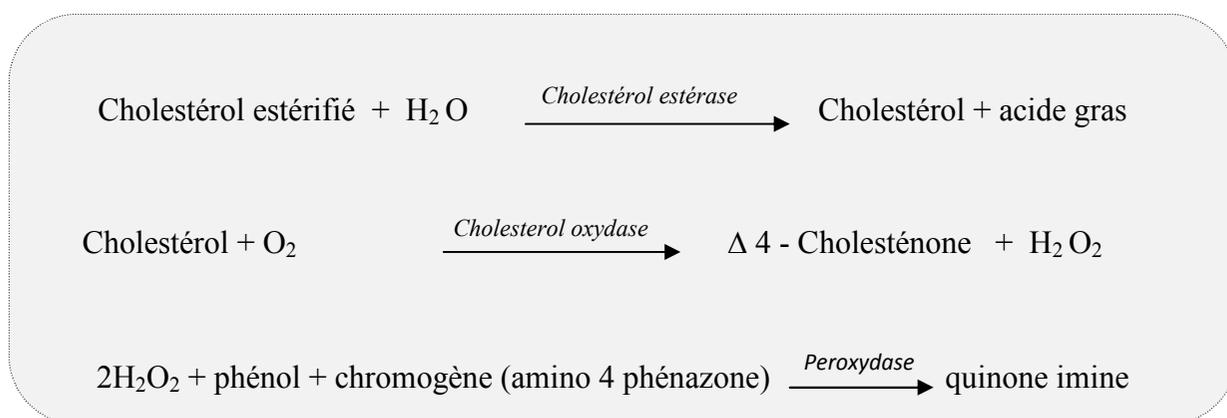
Le cholestérol, les triglycérides et le cholestérol –HDL ont été dosés le jour même du prélèvement.

3.7.1. Dosage du cholestérol

Le cholestérol peut être dosé par différentes méthodes, dont les plus anciennes sont colorimétriques, actuellement la totalité des laboratoires utilisent des méthodes enzymatiques.

Dans notre étude, le cholestérol a été déterminé suivant une méthode enzymatique (réaction de Trinder) par un auto analyseur de type (technicon RA et Opera systems ref.T01-2801-56).

Réaction :



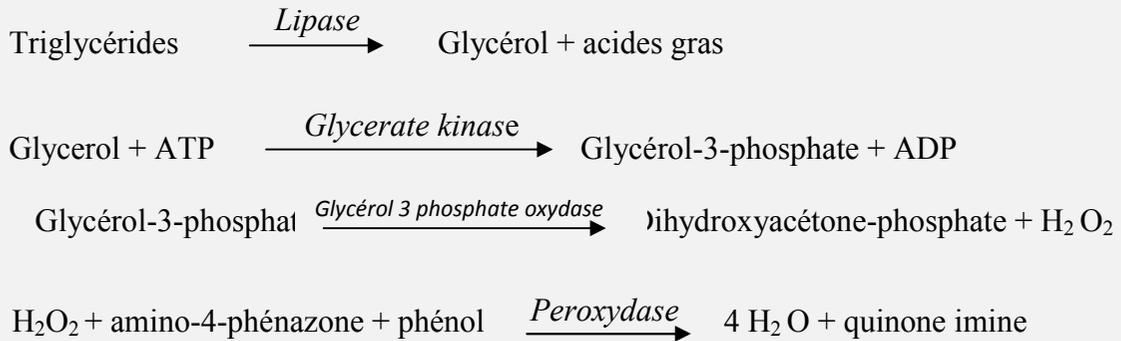
L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon du sérum.

3.7.2. Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides a été effectué par le même auto analyseur (technicon RA et Opera systems ref.T01-2801-56) suivant une méthode colorimétrique enzymatique des triglycérides (Réaction de Trinder).

Principe

Le principe repose sur le dosage en colorimétrie du glycérol libre (à 500 nm) après sa libération par hydrolyse enzymatique des triglycérides selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm est directement proportionnelle à la quantité de triglycérides contenue dans l'échantillon du sérum [345].

3.7.3. Le cholestérol HDL

Principe

Le dosage du HDL cholestérol s'est effectué grâce au réactif phosphotungstate associé au chlorure de magnésium (ref. T01-2801-56, 6.5 ml) qui va faire précipiter les chylomicrons, les VLDL et les LDL.

Le HDL cholestérol est alors dosé dans le surnageant résultant de la centrifugation du précipité par la même technique enzymatique que le cholestérol total [345].

3.7.4. Cholestérol LDL

Le cholestérol LDL est calculé grâce à la formule de Friedewald (1972) [346], à condition que les TG soient inférieurs à 3.5 g/l (4mmol/l).

$$\text{LDL-C} = \text{CT} - (\text{HDL-C}) - [\text{TG}/5]$$

3.7.5. Contrôle de qualité

Le contrôle de qualité a été réalisé pour tous les paramètres. Nous avons apprécié ce contrôle par la répétabilité et la reproductibilité.

- **Répétabilité**

Un pool a été réalisé à partir des sérums, le cholestérol et les triglycérides de ce pool ont été dosés (30 fois), le cholestérol HDL (15 fois) (*tab I*)

3.7.6. Reproductibilité

Elle a été réalisée grâce à deux sérums de contrôle, l'un normal et l'autre pathologique pour chaque série d'analyse. Les contrôles sont préparés chaque jour et dosés soit au début, soit à la fin de la série.

Tableau I : Tableau exprimant les résultats du contrôle de qualité préalablement réalisé

Répétabilité				Reproductibilité			
Paramètre	N	X S	CV%	Paramètre	N	X S	CV%
Cholesterol	30	1.85 ± 0.08	4.3	Cholestérol	30	2.29 ± 0.11	4.8
Triglycerides	30	1.08 ± 0.05	4.6	Triglycérides	30	1.48 ± 0.08	5.4
HDL	15	0.41 ± 0.01	2.4	HDL	15	0.45 ± 0.02	4.4

3.8. Dosage de l'insuline

3.8.1. Principes biologiques de la procédure

Le dosage de l'insuline est réalisé grâce à une technique immunoenzymatique microparticulaire (MEIA) sur l'AxSYM (Abbot).

- *Sérum et plasma*

Le dosage AxSYM Insuline peut être effectué sur du sérum ou du plasma (prélevés sur héparine, EDTA, citrate ou fluorure de sodium). Les échantillons devraient être examinés aussitôt que possible, en raison de l'enzyme dégradante d'insuline existant dans les globules rouges, dont la présence peut montrer des niveaux très bas pour les valeurs déterminées (éviter les échantillons hémolysés).

Les échantillons de sérum ou de plasma devront être séparés du caillot ou des globules rouges, puis conservés congelés à -20°C.

- *Volume d'échantillon*

Le volume d'échantillon nécessaire pour réaliser un dosage Insuline unique sur l'AxSYM varie selon le type de récipients-échantillons utilisé. Le volume minimum d'échantillon nécessaire dans un godet-échantillon est de 150 µl pour un dosage de ROUTINE et de 86 µl pour un dosage URGENT. Pour chaque dosage supplémentaire (ROUTINE ou URGENT) effectué sur le même récipient-échantillon, il faut ajouter 36 µl d'échantillon.

- *Protocole de dilution manuelle*

Les échantillons de patients dont la valeur d'insuline est supérieure à 300 µU/ml peuvent être dilués avec le calibrateur A AxSYM Insuline. Il est recommandé d'effectuer la dilution de sorte que l'échantillon dilué donne un résultat supérieur à 3 µU/ml sur la courbe de calibration. Exemple : une dilution au 1/5ème est préparée en ajoutant 50 µl d'échantillon à 200 µl calibrateur A AxSYM Insuline. Mélanger soigneusement avant analyse. Pour déterminer la concentration en insuline de l'échantillon, multiplier la concentration de l'échantillon dilué par le facteur de dilution.

3.8.2. Unité d'échantillonnage

- L'échantillon et tous les réactifs AxSYM Insuline (*annexe 3*) nécessaires à une série de dosages sont pipetés par l'aiguille d'échantillonnage dans les différents puits de la cartouche de réaction (CR). La CR est immédiatement transférée dans l'unité de traitement, où le pipetage continue avec l'aiguille de traitement.

Les réactions ont lieu dans l'ordre suivant :

- Echantillon, les microparticules recouvertes d'anticorps anti-insuline (souris, monoclonal), et le tampon de dosage sont pipetés dans un puits de la CR. Pendant l'incubation de ce mélange réactionnel, l'insuline présente dans l'échantillon se lie aux microparticules recouvertes d'anticorps anti-insuline pour former un complexe anticorps-antigène.
- Une partie aliquote du mélange réactionnel est transférée sur la matrice. Les microparticules se lient irréversiblement à la matrice en fibre de verre.
- La matrice est lavée afin d'éliminer le matériel non lié.
- Le conjugué d'anticorps anti-insuline (souris, monoclonal) : phosphatase alcaline est distribué sur la matrice et se lie au complexe anticorps-antigène.

- La matrice est lavée afin d'éliminer le matériel non lié.
- Le substrat, du phosphate de méthyl-4-ombelliféryl, est ajouté sur la matrice et le taux de formation du produit fluorescent est mesuré par le système optique MEIA.

- *Valeurs de références*

Insuline AxSYM de notre laboratoire présente les valeurs de référence suivantes :

Moyenne : 4.8 µU/ml [0.2 – 9.4 µU/ml]

Ecart-type : 2.3 µU/ml

3.9. Dosage du cortisol

3.9.1. Principes biologiques de la méthode

AxSYM Cortisol est basé sur la technologie de dosage immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA). La technique inclut également une étape préliminaire manuelle de prétraitement des échantillons. Pour obtenir des résultats optimaux, les échantillons ne doivent pas contenir de fibrine, de globules rouges ou d'autres particules en suspension.

- *Sérum et plasma*

Le dosage du Cortisol peut être effectué sur du sérum ou du plasma (prélevés sur héparinate de sodium, héparinate de lithium ou EDTA tripotassique). Les échantillons peuvent être conservés au maximum 24 heures entre +2 et +8°C avant d'être analysés. Si le dosage est effectué plus de 24 heures après le prélèvement, les échantillons de sérum ou de plasma devront être séparés du caillot ou des globules rouges, puis conservés congelés à -20°C.

- *Volume d'échantillon*

Le volume d'échantillon nécessaire pour réaliser un seul dosage Cortisol sans dilution sur l'AxSYM varie selon le type de récipient-échantillon utilisé. Le volume minimum d'échantillon nécessaire dans un godet-échantillon est de 150 µl pour un dosage de ROUTINE et de 94 µl pour un dosage URGENT. Pour chaque dosage Cortisol supplémentaire (ROUTINE ou URGENT) effectué sur le même récipient-échantillon, il faut ajouter 44 µl d'échantillon.

- *Protocole de dilution manuelle*

Les échantillons de patients dont la concentration en cortisol est supérieure à 60.0 µg/dl peuvent être dilués à l'aide d'une dilution manuelle au 1/2. Ajouter un volume d'échantillon de patient à un volume de diluant AxSYM. Recommencer l'analyse sur l'échantillon dilué manuellement. Afin d'obtenir la concentration finale de l'échantillon, la concentration enregistrée par l'AxSYM doit être multipliée par le facteur de dilution manuelle.

3.9.2. Unité d'échantillonnage

- L'échantillon et tous les réactifs AxSYM Cortisol (*annexe 4*) nécessaires pour une série de dosage sont pipetés par l'aiguille d'échantillonnage dans les différents puits d'une cartouche de réaction (CR).
- L'échantillon, l'antisérum anti-cortisol (anticorps), la solution de prétraitement et la solution 4 (diluant) sont pipetés dans un puits de la CR pour former le mélange de prédilution.
- Une fraction supplémentaire de solution de prétraitement et la solution 4 (diluant) sont pipetées dans la cuvette de la CR.
- La CR est immédiatement transférée dans l'unité de traitement, où le pipetage continue avec l'aiguille de traitement.

3.9.3. Unité de traitement

- Une partie aliquote du mélange de prédilution et de la solution 4 (diluant) est transférée dans la cuvette de la CR et l'intensité du blanc de l'échantillon est mesurée.
- Une seconde partie aliquote du mélange de prédilution est transférée dans la cuvette avec le traceur Cortisol marqué à la fluorescéine.
- Le cortisol présent dans l'échantillon et le traceur Cortisol marqué à la fluorescéine entrent en compétition pour occuper les sites de liaisons sur la molécule d'anticorps.
- L'intensité de la polarisation de fluorescence est mesurée par le système optique FPIA.

- *Valeurs de références*

Les limites de l'intervalle de confiance à 95% de la plage de normalité du cortisol dans des échantillons sériques pour le matin et l'après-midi ont été déterminées comme étant comprises entre :

7h – 9h : 4.2 et 38.4 µg/dl (valeur médiane de 10.8 µg/dl).

16h – 18h : 1.7 et 16.6 µg/dl (valeur médiane de 6.7 µg/dl).

3.10. Dosage de l'homocystéine

3.10.1. Principe

C'est un immunodosage par compétition sur IMMULITE 2000 (DPC).

Le test inclut une étape préliminaire manuelle de prétraitement des échantillons.

L'homocystéine des échantillons plasmatiques est séparée des protéines de liaison et convertit en SAH après incubation de 30 minutes à 37°C en dehors du système et en présence de SAHH et de dithiothreitol (DDT).

L'échantillon prétraité et l'anticorps anti SAH marqué à la phosphatase alcaline sont introduits simultanément dans l'unité test qui contient une bille de polystyrène recouverte de SAH. Pendant une incubation de 30 minutes, le SAH provenant de l'échantillon prétraité entre en compétition avec le SAH fixé pour se lier à l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline.

3.10.2. Dosage

▪ *Préparation de la solution de travail*

Solution préparée quotidiennement. Elle doit être utilisée dans les 2 heures suivant la préparation.

- Un volume suffisant de solution B de prétraitement (DDT dans un tampon) est dilué au 1/10 dans l'eau distillée avant de l'ajouter à la solution A de prétraitement (SAHH bovine dans un tampon).
- Les deux solutions A et B (diluée) sont mélangées à volume égal.

Les quantités doivent être suffisantes pour le nombre de tests à réaliser, par exemple:

Nb d'éch	Sol travail ml	H ₂ O ml	Pre – B µl	Pre – A ml	Total ml
5	1.5	0.90	100	1	2

▪ *Préparation des échantillons*

- Pour les contrôles et échantillons de patients.

15 µl de chaque contrôle et échantillon de patient (plasma) est ajouté à 300 µl de la solution de travail. Les tubes fermés et mélangés sont placés dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes, ensuite ils sont transférés dans les unités échantillon IMMULTE.

- Pour les ajusteurs

20 µl de chacun des ajusteurs (SAH synthétique dans une matrice protéine/tampon) est ajoutée à 400 µl de la solution de travail. Les autres étapes sont les mêmes.

Les échantillons prétraités sont stables à température ambiante (+ 15°C/+ 28°C) ou réfrigérés à + 2°C/+ 8°C une heure avant le dosage.

- *Valeurs de références* : Le test IMMULITE 2000 Homocystéine présente un domaine de référence de 5 – 15 µmol/l.

3.11. Extraction de l'ADN

3.11.1. Introduction

La plupart des études génétiques nécessitent la disposition d'échantillons d'acide nucléique, les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. Les autres sources cellulaires peuvent être des biopsies (biopsie de villosités chorales..) ou des cultures de cellules (amniocytes, fibroblastes, lignées lymphoblastiques...) [344].

De très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels. Dans la grande majorité des cas la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre de copies et des méthodes de biologie moléculaires utilisée ultérieurement (PCR) [344].

Quelle que soit la méthode d'extraction des acides nucléiques utilisée à partir du sang fraîchement recueilli ou décongelé, le sang doit être initialement vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges, la méthode d'extraction employée dans notre étude est une méthode utilisant un solvant inorganique, NaCl [347].

3.11.2.. Etape d'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN s'effectue en plusieurs étapes : elle consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges ; ils seront ensuite traités par un détergent (SDS) et une protéinase K.

Dans le lysat, l'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par précipitation au NaCl. Le surnageant ainsi récupéré est traité par de l'éthanol dans lequel une pelote de l'ADN se forme par précipitation.

L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (Tris EDTA 10 : 1). Sa pureté et sa concentration sont estimées par spectrophotométrie à UV.

➤ Préparation des leucocytes

L'extraction des acides nucléiques à partir du sang est vigoureusement mélangé à une solution hypotonique TE (Tris-EDTA) 20 : 5 dans un tube falcon de 50 ml pour faire éclater les globules rouges. La lyse est réalisée à 4 °C pendant 10 à 15 minutes.

Le lysat est centrifugé pendant 15 min à 3900 g (3800 rpm) et, après élimination du surnageant, le culot cellulaire contenant les leucocytes est repris dans une solution TE 20 : 5 dans un volume total de 25 ml.

On le laisse dans la glace pendant 10 minutes. Une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions que la première fois et le culot obtenu des leucocytes par une deuxième aspiration du surnageant est utilisé pour l'extraction de l'ADN. (On peut s'arrêter à ce niveau le culot des leucocytes est conservé dans un tube nunc de 1.5ml avec du TE 10 : 1 à - 20°C).

➤ Extraction de l'ADN

- Transverser le culot de leucocytes dans un tube falcon de 15 ml.
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (Na Cl 400 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 8.2) en dilacérant le culot.
- Ajouter 200 µl de SDS à 10 %.
- Ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml.
- Agiter le tube sur une roue à 37°C pendant une nuit.
- Le lendemain refroidir dans la glace.
- Ajouter 1ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main.
- Remettre 5 min dans la glace pour précipitation des protéines.
- Centrifuger 15 min à 2500 rpm.

- Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 15 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme.
- Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote ne se forme pas
- Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette Pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70%.
- Mettre la pelote dans un tube nunc.

➤ **Solubilisation**

- Ajouter entre 300 et 1000 μl de TE 10 : 1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.

- Laisser une nuit sur agitateur rotatif à 37°C , puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

➤ **Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN**

○ **Détermination de la pureté**

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisée par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée. Les ADN purs sont conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

Principe

- l'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) absorbent à 280 nm.
- L'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillé (10 μl de l'ADN solubilisé dans 990 μl de l'eau stérile).
- Les DO sont lus à 260 et 280 nm (longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines) dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile).
- Par le moyen du rapport de $\text{DO}_{260\text{ nm}}/\text{DO}_{280\text{ nm}}$, la pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.

On considère que :

- L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260}/DO_{280}$ est compris entre 1.6 et 2 ($1.6 < R \leq 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260}/DO_{280} < 1.6$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260}/DO_{280} > 2$.

○ Détermination de la concentration de l'ADN

La concentration de l'ADN est estimée par spectrophotométrie à 260 nm sachant que :
1 unité de $DO_{260 \text{ nm}}$ = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN

On mesure donc à 260 nm la DO d'une dilution au $1/100^{\text{ième}}$ de la solution à doser. On déduit la concentration de l'ADN grâce au calcul suivant :

$$[C] (\mu\text{g} / \text{ml}) = \text{Facteur de dilution} \times DO_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$\text{Facteur de dilution} = \text{vol total} / \text{vol d'ADN}$$

Exemple :

Pour un ADN solubilisé dans 1000 μl de TE 10 : 1 ayant une $DO_{260 \text{ nm}} = 0.139$

1 unité de $DO_{260 \text{ nm}}$	—————→	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN
0.139 de $DO_{260 \text{ nm}}$	—————→	X

$$X = 0.139 \times 50 = 6.95 \mu\text{g}/\text{ml}$$

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100, donc $6.95 \times 100 = 695 \mu\text{g}/\text{ml}$

La concentration de l'ADN peut être vérifiée par un contrôle de taille des molécules d'ADN qui doivent être suffisamment longues pour être digérés. L'ADN génomique doit être manipulé en évitant toute action mécanique violente.

3.12. Génotypage de l'apo E

Elle consiste à amplifier une partie de l'ADN contenant le gène de l'apo E. Puis de différencier les génotypes par digestion d'une enzyme de restriction spécifique.

La détermination du génotype a été effectuée en plusieurs étapes successives :

- la PCR (polymerase chain reaction) et contrôle de PCR sur gel d'agarose
- la digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction *Hha I*.
- la séparation des produits de digestion par migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide et distinction des différents génotypes par transillumination sous UV.

3.12.1. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation (PCR)

➤ Introduction

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis et développée par Henri A et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA) en 1985 [344].

Cette réaction enzymatique conduit à l'amplification spécifique de plusieurs millions de fois d'une séquence nucléotidique précise que l'on désire étudier. Elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gènes précis même présents en quantité très faible dans un mélange puis de le multiplier rapidement.

➤ Principe de la PCR

La Polymerase Chain Reaction permet l'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues par un procédé d'extension d'amorce. Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est une copie du brin codant et l'autre, une copie du brin non codant. Sous l'action d'une enzyme (*Taq polymérase*), chaque amorce est allongée dans le sens 5'→3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée.

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

- une étape de dénaturation des acides nucléiques
- Une étape d'hybridation des amorces sur les séquences cibles
- Une étape d'extension des amorces par l'ADN polymérase

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

3.12.2. Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR

Pour préparer le milieu réactionnel on multiplie la quantité de chaque composant par le nombre de tubes voulu + un, c'est le tube témoin négatif dans lequel on met uniquement le mélange sans ADN.

L'ADN est amplifié par PCR avec deux amorces encadrant la région avec les deux codons polymorphes des acides aminés 112 et 158 de l'apo E.

Les amorces utilisées pour l'étude du polymorphisme de l'apoE sont :

- . OD 5'- ATG GCG CTG AGG CCG CGC TC - 3' (20pb)
- . OG 5'- AAC AAC TGA CCC CGG TGG CG - 3' (20pb)

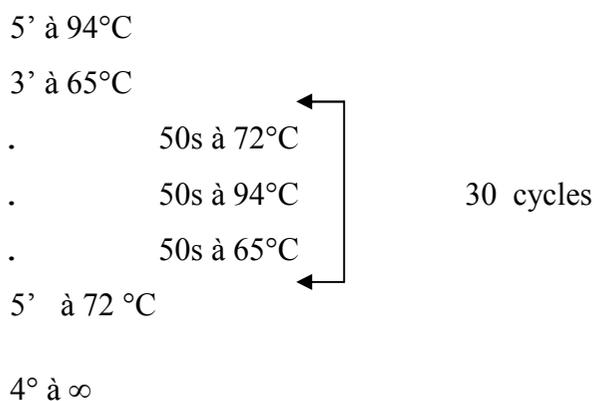
3.12.3. Condition d'amplification

Pour un volume total de 75 µl

- . DNA 2 µl / à 250 ng / µl
- . REACTIF COMMUN (Mix) :
 1. Tampon de Taq 10X 7.5 µl
 2. DMSO 7.5 µl
 3. Mix d NTP 25mM (au 1/10) 6 µl (200 µM)
 4. Taq polymérase 2,5 u 0.5 µl
 5. Mg CL₂ 50mM 3 µl
 6. OG sol. mère 0,93mM 1.2 µl (0.6 µM)
 7. OD sol .mère 1,11mM 1 µl (0.6 µM)
 8. H₂O q.s.p 75 µl 46.3 µl

Pour le tube témoin on met uniquement le mix sans ADN.

Cycles PCR



3.12.4. Contrôle de La taille des fragments amplifiés

La taille des fragments amplifiés a été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose additionné de Bromure d'éthidium (*figure 22*).

10 à 15 µl de la solution d'ADN amplifié ont été déposés dans chaque puits d'un gel d'agarose à 1.5 % soumis à une migration sous un courant de 90 volts pendant 1 h. Cette analyse permet, d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN survenue au cours de la PCR.

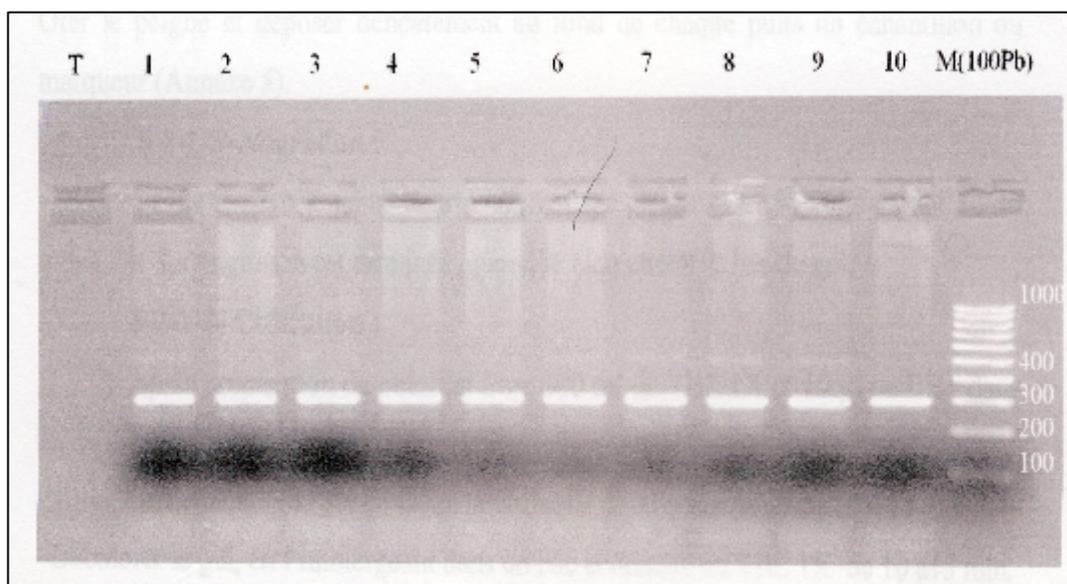


Figure 22 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% des fragments amplifiés (292pb) par PCR du gène Apo E

3.12.5. La digestion du produit de PCR

Les trois allèles communs de l'apolipoprotéine E diffèrent par la nature des acides aminés en position 112, et 158 : Les codons variables des locus 112 et 158 sont TGC quand ils codent pour une cystéine ou CGC quand il code pour une arginine. L'amplification par PCR du fragment de 292 pb encadrant ces positions, suivie d'une digestion enzymatique par *HhaI* qui a pour site de coupure les séquences GCGC (annexe 5). Son action n'est possible que lorsque des arginines figurent en 112 ou 158 parce que celles-ci sont codées par la séquence CGC et que ces deux locus sont précédés tous les deux d'un codon se termine par G.

Ils existent par ailleurs sept sites constants de clivages par *HhaI* dans le segment amplifié. La coupure par l'enzyme génère donc des fragments constants et des fragments de taille variable en paires de bases caractéristiques selon les allèles (*figure 23*).

Chacun des isoformes de l'apo E se distingue par une combinaison unique de polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP) issus du clivage par *HhaI* et possédant différentes tailles (*figure 23*).

Chaque allèle a un site de coupure spécifique. L'allèle $\epsilon 2$ (Cys112, Cys158) est caractérisé par l'absence de codon CGC de l'arginine 158, par conséquent la coupure donne un fragment de 83 pb spécifique de cet allèle et un fragment 91 pb encadrant le site 112.

L'allèle $\epsilon 4$ (Arg112, Arg158), se distingue par la présence du codon CGC en position 158, par conséquent, l'enzyme agit à ce niveau et libère deux segments d'ADN 48 et 35 pb, un fragment 72 pb issu de clivage à la position 112.

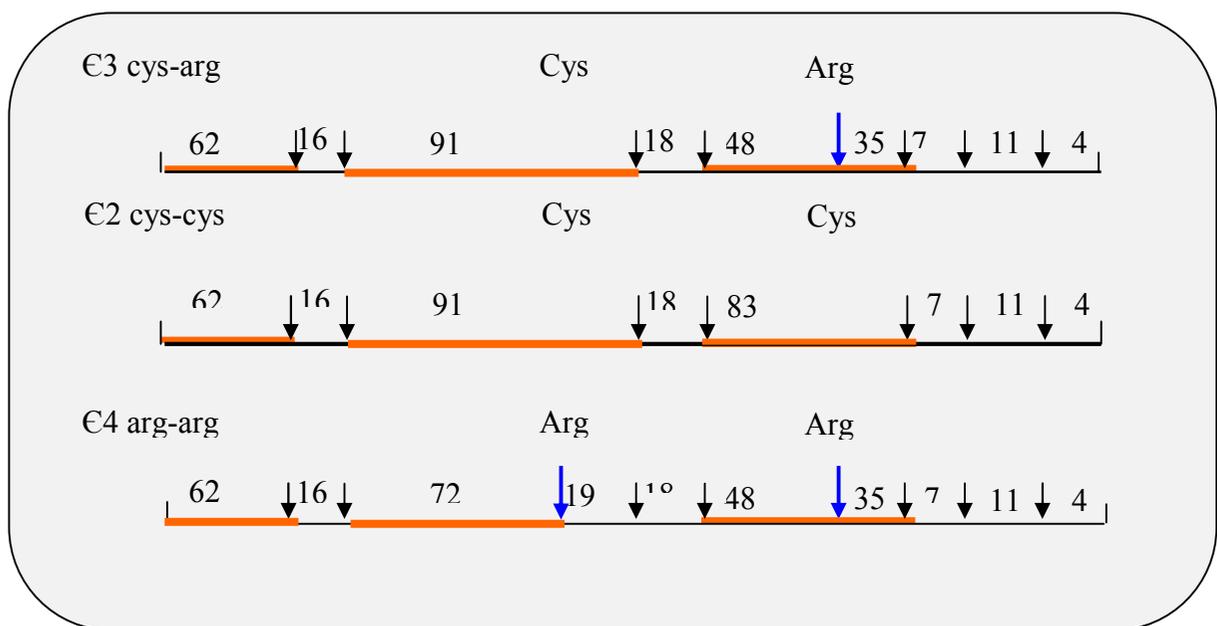


Figure 23: Digestion par *Hha I* des trois allèles

➤ Clivage des produits de PCR

Les manipulations se font sur la glace :

- Pour un volume final de 25 μ l on prépare le mix pour (n+1) tubes :

▪ Tampon	}	2.5 μ l	X (n + 1)
▪ Hha I (10 unités)		1 μ l	
▪ H ₂ O qsp 10 μ l		6.5 μ l	
- Répartition de 10 μ l de mixte dans chaque tube
- Ajouter 15 μ l de chaque produit de PCR
- Homogénéiser le contenu des tubes dans la centrifugeuse de paillasse
- Placer les tubes au bain marie à 37°C pendant une nuit.

- Après Incubation à 37°C pendant une nuit le produit de digestion est concentré au speed-vac pendant 15 à 20 min.

3.12.6. Electrophorèse des fragments de restriction

Les produits de restriction sont soumis à une migration sur gel d'acrylamide à 10% dans un tampon TBE 1X à 250 Volts.

➤ Préparation d'un gel d'acrylamide 10%

Pour un gel de 70 ml

- Acryl 30% 23.8 ml
- TBE 10X 7 ml
- H₂O 38.5 ml

Pendant que les réactifs se remettent à température ambiante

- . On prépare le persulfate d'ammonium à 10% (0.01g dans 100 µl H₂O)
- . On monte le support de gel
- . Addition de persulfate d'ammonium et de Temed juste avant de couler le gel
 - 50 µl de persulfate/10 ml (350 µl)
 - 10 µl de Temed /10 ml (70 µl)
- . On homogénéise, et on coule immédiatement en versant le contenu de bûcher entre les plaques de verre en prenant soin de ne pas faire de bulle et on place le peigne afin de former les puits, on laisse polymériser à température ambiante 1h. à 1h 30min.

➤ Dépôts des échantillons

Quand le gel est polymérisé, on plonge le système (gel + électrodes) dans la cuve verticale contenant un volume (450 ml) du tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X), on ôte le peigne et on dépose délicatement au fond de chaque puits un échantillon.

On met sous tension le générateur à un voltage élevé soit 250 volts durant 1h 30 min à 2 h. La migration est terminée, quand le bleu atteint le bas du gel.

Coloration

Après préparation du colorant avec 100 ml de TBE 1X et 10 µl de BET dans un bac.

- On glisse délicatement le gel de façon horizontale dans le bac pendant 10 à 15 min.
- On visualise le gel aux UV et prendre une photo.

➤ **Révélation du profil électrophorétique**

Le BET fluorescent aux UV s'est fixé sur l'ADN (cette molécule s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN) et va permettre de visualiser les fragments de restriction dans le gel placé sur la table à UV.

Les petits fragments de 35 pb sont très difficiles à visualiser sur le gel sous UV. Quant à ceux de 19, 18, 16, 11, 7 et 4 pb, sont élués dans le tampon lors de la migration électrophorétique.

Chaque fragment d'ADN est visible sous forme d'une bande dont la position sur le gel d'acrylamide dépend de sa taille, une combinaison de bandes étant caractéristique de chaque génotype (*Tableau II, figure 24*).

Tableau II: Tailles des fragments de restriction en paire de base (Pb) correspondants aux six génotypes possibles (3 homozygotes et 3 hétérozygotes)

E3/E3	E3/E2	E4/E2	E2/E2	E3/E4	E4/E4
91	91	91	91	91	-
-	83	83	83	-	-
-	-	72	-	72	72
62	62	62	62	62	62
48	48	48	-	48	48
35	35	35	-	35	35

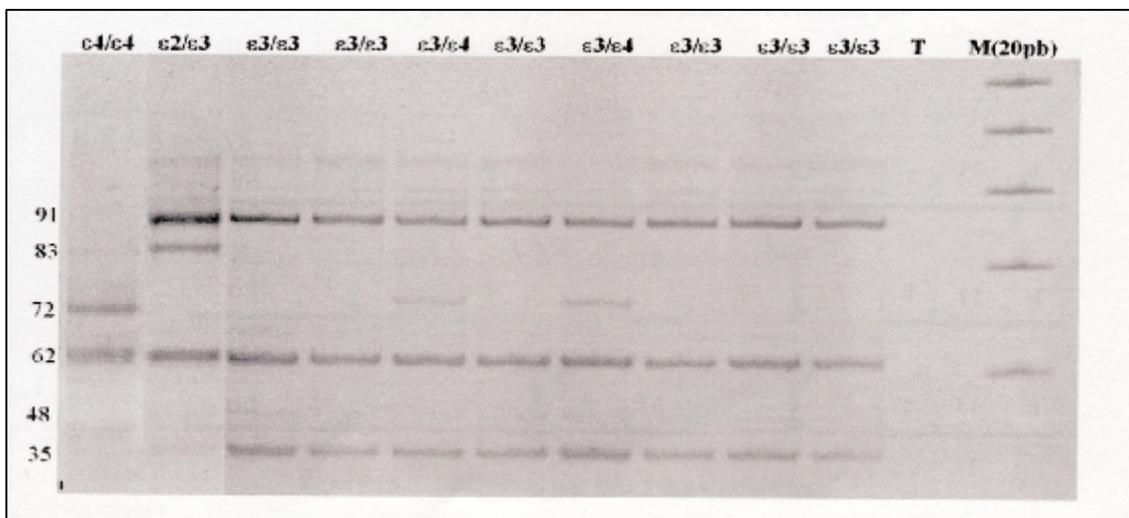


Figure 24 : Profil d'électrophorèse sur gel d'acrylamide des fragments issus par clivage de *HhaI* présentant différents génotypes d'apo E

3.13. Recherche de la mutation C677T du gène codant la MTHFR

3.13.1. Principe

La mutation C677T du gène de la MTHFR a été déterminée par la méthode PCR/RFLP décrite par Frosst et al en 1995 [21].

Le principe de la PCR est la synthèse de multiples copies d'une séquence d'ADN spécifique, l'ADN cible amplifié est analysé par RFLP (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction). Le RFLP reflète une différence (un polymorphisme) au niveau d'un site particulier de reconnaissance d'une enzyme de restriction donnée. Après digestion enzymatique, les fragments de restrictions sont soumis à une électrophorèse sur gel qui permet leur séparation en fonction de leur taille. La variabilité d'un site de restriction se manifeste par la présence ou l'absence de celui-ci, ce qui se traduit par un polymorphisme des longueurs des fragments de restriction. La mutation C677T crée un site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction *Hinf I* (source : *Haemophilus influenzae*), dans une séquence de 198 pb du gène MTHFR amplifiée par la méthode PCR utilisant le couple d'amorces :

5' – TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA – 3' (sens, exonique : F),

5' – AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG – 3' (antisens, intronique : R).

La digestion enzymatique a donné des fragments : 175 pb, 198 pb et 23 pb, le premier apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté. Le deuxième apparaît aussi sous forme d'une seule bande, il s'agit du type homozygote sauvage. Les deux bandes ensemble, correspondent au type hétérozygote (*figure 25*). Le troisième n'est pas visible à cause de son intensité trop faible.

3.13.2. Technique

▪ **La PCR** (Polymerase Chain Reaction)

□ **Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR** (*Annexe 6*)

Mix de PCR	µl/test
Tampon 10 X	5
DNTP	5
H ₂ O	35.2
MgCl ₂	3
Oligo F (Forward)	0.2
Oligo R (reverse)	0.2
Taq polymérase	0.4

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre de tubes voulu plus un autre. C'est le tube témoin négatif dans lequel on met uniquement le mélange sans ADN.

Pour les autres tubes 2 µl d'ADN sont mélangés à 49 µl du mix.

□ **Déroulement des cycles de la PCR**

La séquence cible de l'ADN est amplifiée par 30 cycles. Chaque cycle se divise en trois étapes qui se déroulent à différentes températures : la dénaturation, l'hybridation des amorces et l'élongation.

Les conditions d'amplification sont comme suit : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 65°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 40 secondes et enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

□ **Contrôle des produits de PCR**

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5% additionné de 10 µl de BET (Bromure d'éthidium) et coulé sur plaque de cuve horizontale. Dans chaque puits du gel, il est déposé :

- 15 µl de produit d'amplification + 2 µl BBP (Bleu de Bromophénol).

- 3 µl de marqueur de taille (PM 100 pb Ladder, ref. GEPMQR01 – 26) + 10 µl H₂O + 2 µl BBP.

Les dépôts se font du côté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant de 90 à 120 volts pendant 1 heure. Cette analyse permet aussi, d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR.

□ **Digestion des produits de PCR**

- Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de la digestion (*Annexe 6*)

Mix de la digestion	µl/test
Tampon	4
Hinf I	1
H ₂ O	5
BSA	0.2

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre de tubes voulu plus un autre. Dans chaque tube, sont mélangés 10 µl du mix avec 30 µl du produit de PCR.

La digestion enzymatique est réalisée dans un bain marie à 37°C durant une nuit. Après incubation, ils sont concentrés au Speed – Vac (System ISS 40 – SA ranta).

– **Electrophorèse des produits de la digestion**

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3%, additionné de 10 µl de BET et coulé sur une plaque de la cuve horizontale. 10 µl du produit de la digestion sont mélangés à 3 µl de BBP, déposés dans des puits creusés dans le gel du côté de la cathode qui vont migrer vers l'anode dans le champ électrique et leurs vitesses dépendent de leurs tailles. Plus le fragment à une taille élevée moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion sera importante. A l'opposé, les fragments de petites tailles auront une distance de migration plus élevée.

Les fragments sont révélés par le bromure d'éthidium, réactif s'intercalant entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition aux ultra violet (UV) (*figure 25*).

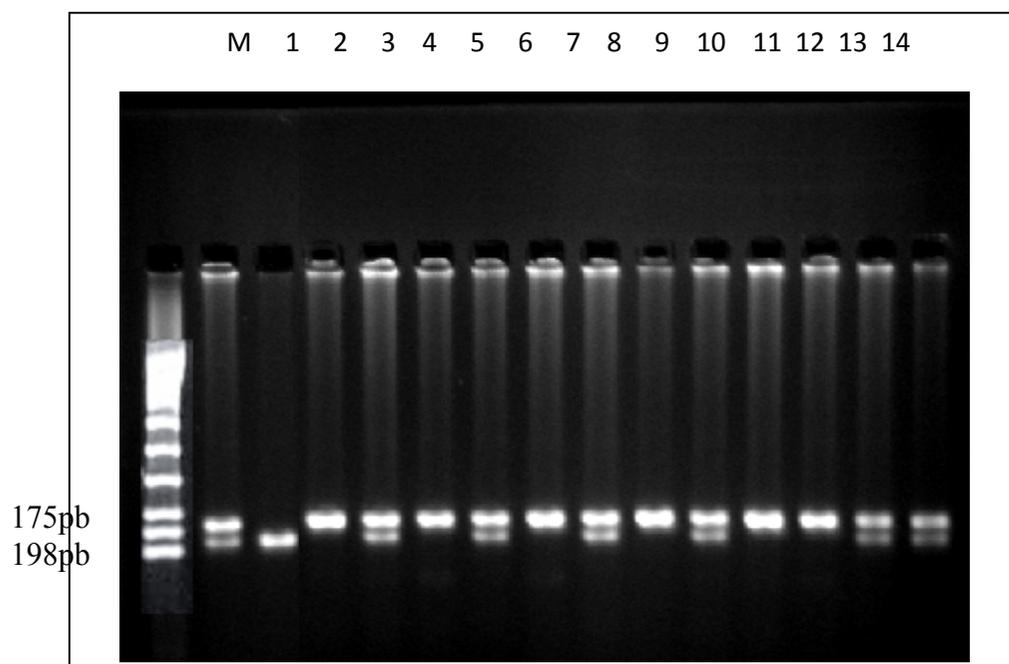


Figure 25 : Profil électrophorétique des fragments digérés par l'enzyme *HinfI* sur gel d'agarose 3%

3.14. Analyse statistique

Les résultats de tous les échantillons obtenus ainsi que tous les paramètres considérés ont été traités par le logiciel Epi info version 6.0. Différentes méthodes, ainsi que différents tests ont été utilisés dans cette étude [348].

3.14.1. Statistique descriptive

Dans cette étude nous avons utilisé:

Les variables quantitatives sont décrites par la moyenne \pm 1 écart type.

- Des comparaisons de moyenne avec formulation de l'hypothèse nulle, la comparaison de deux proportions observées.

$$\varepsilon = \frac{(X_a - X_b)}{\sqrt{\frac{sa^2}{n_a} + \frac{sb^2}{n_b}}}$$

n_a et n_b sont les tailles de deux échantillons

ε = écart réduit

sa^2 / n_a et sb^2 / n_b variances de la moyenne dans le groupe A et B

La valeur ε calculée est comparée à la valeur lue dans la table de l'écart réduit.

- Si $\varepsilon < 1.96$, la différence n'est pas significative au seuil de 5% et on ne peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre X_a et X_b (Où p_1 et p_2 pour des proportions).
- Si $\varepsilon \geq 1.96$ la différence est significative au risque $\alpha = 0.05$, on peut conclure que X_1 (ou p_1) est statistiquement différent de X_2 (ou p_2).

3.14.2. Tests de comparaison de variances

L'égalité des variances est la condition de base pour les tests de comparaison de moyennes. C'est le test de L'ANOVA.

Nous avons utilisé donc L'ANOVA en cas de distribution normale. Dans le cas où les variances différentes, objectivées grâce au test d'homogénéité des variances de Bartlett, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney.

3.14.3. L'enquête analytique

Dans l'enquête analytique: pour étudier la relation entre un facteur d'exposition et la maladie, et en plus des tests déjà cités nous avons :

- Comparer la moyenne de la variable mesurant l'exposition chez les malades et les non malades.
- Nous avons créé des classes et utilisé des méthodes qualitatives. Ces méthodes permettent de décrire la relation entre le facteur d'exposition et la maladie de manière plus concrète et permet l'utilisation de méthodes statistiques plus simples. Le test utilisé dans ces conditions est le χ^2 [348].

3.14.4. Calcul de l'Odds ratio

Pour calculer l'odds ratio nous avons établi un tableau de contingence : Il est présenté sous forme de tableau croisé 2x2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

	Malades	Témoins	
Exposée (E+)	a	b	a + b
Non exposés (E-)	c	d	c + d
	a + c	b + d	Total

$$\text{OR} = a * d / b * c$$

L'Odds ratio représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population (prévalence <5%). Dans ce cas l'Odds ratio peut être une bonne approximation du risque relatif que donnerait une enquête de cohorte pour la population.

Pour déterminer s'il existe une stabilité épidémiologique, on a utilisé trois tests statistiques :

- En cherchant à tester l'hypothèse nulle H_0 selon laquelle il n'y aurait pas d'association entre la maladie et le facteur de risque
- l'hypothèse nulle est formulée d'une seule manière qui est ($H_0: OR=1$).
- On a utilisé la méthode de Mantelet Haenszel pour calculer un Odds lié à un facteur en ajustant simultanément sur plusieurs autres:

Trois valeurs de Khi carré χ^2 sont données : les valeurs de p sont données pour un degré de liberté.

- Le test du χ^2 sans correction :

$$N = \frac{[(a*d) - (b*c)]^2}{[(a+b)*(c+d)*(a+c)*(b+d)]}$$

- Le test du χ^2 de Mantel- Haenszel :

$$N = (N-1) \frac{[(a*d) - (b*c)]^2}{[(a+b)*(c+d)*(a+c)*(b+d)]}$$

- La correction de Yates :

$$N = \frac{[|(a*d) - (b*c)| - 0.5*N]^2}{[(a+b)*(c+d)*(a+c)*(b+d)]}$$

- Le test de Fisher est calculé pour le tableau, et les résultats des deux tests unilatéral et bilatéral sont donnés dans les cas où une case du tableau est inférieure à 5.

3.14.5. Les intervalles de confiance

Les intervalles de confiance : ont été calculés par la méthode de Cornfield. L'approche estimative de l'analyse statistique vise à quantifier l'effet étudié et le degré de certitude de cette estimation grâce à un intervalle de confiance, qui identifie généralement une fourchette de valeurs situées de part et d'autre de l'estimation et l'on peut être sûr à 95% de trouver la valeur réelle. L'intervalle de confiance pour les Odds ratio a été calculé à partir de l'approximation de Fleiss.

3.14.6. Choix de la "p value "

Le seuil critique a priori est de 0.05 (risque α). Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative pour apparemment arbitraire est nécessaire pour l'homogénéité de la présentation des résultats. L'usage a retenu de manière consensuelle l'ensemble des seuils (0.05, 0.01, 0.001) qui représentent des risques raisonnables pour prendre une décision.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Répartition des sujets selon la pathologie et le sexe

Cette étude cas témoin regroupe 187 sujets dont 124 témoins et 63 patients remplissant les critères du diagnostic de M.A probable. Répartis comme suit:

- 124 Témoins dont 62 Femmes et 62 Hommes.
- 63 M.A dont 30 Femme et 33 Homme.

Tableau III : répartition des sujets selon la pathologie et le sexe

	F	M	Total
ALZ	30	33	63
Témoins	62	62	124
Total	92	95	187

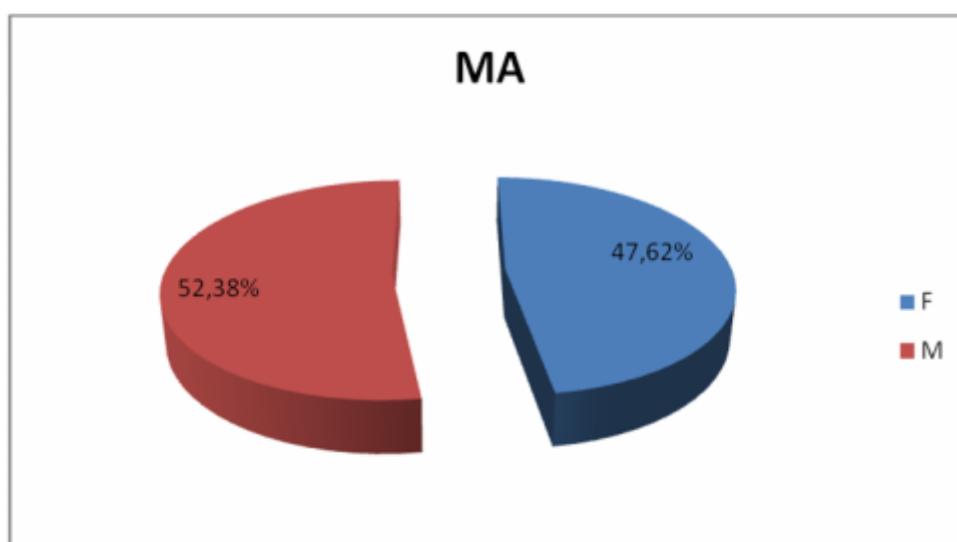


Figure 26 : répartition des malades selon le sexe

Dans notre étude on ne retrouve pas de prédominance du sexe masculin par rapport au sexe féminin.

Selon plusieurs études, Les femmes ont un risque plus élevé de développer une maladie d'Alzheimer que les hommes [257]. Cependant dans l'étude Paquid, l'incidence de la

maladie d'Alzheimer était, avant 80 ans, plus élevée chez les hommes que chez les femmes, alors que c'est l'inverse après 80 ans [340].

Cette différence d'incidence en fonction du sexe pourrait être expliquée par des différences biologiques et hormonales, notamment un possible effet des œstrogènes. Plusieurs études ont montré que la prise de traitement hormono-substitutifs de la ménopause semblait être associée à une réduction de plus de 50% du risque de la maladie d'Alzheimer. L'espérance de vie, plus élevée chez les femmes que chez les hommes, pourrait également expliquer les résultats observés.

Il faut noter que dans certains pays comme les États-Unis où cet écart d'espérance de vie entre hommes et femmes est moindre, l'incidence de la maladie d'Alzheimer ne varie pas selon le sexe [350].

4.2. Répartition par tranche d'âge

Les malades et les témoins sont classés en tranche d'âge de 10 ans.

Tableau IV: Répartition des malades et témoins par tranche d'âge

	<i>ALZ</i>		<i>T</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
50-59	5	8	37	29.8
60-69	13	20.6	37	29.8
70-79	31	49.2	34	27.5
80-89	13	20.6	12	9.7
90-100	1	1.6	4	3.2
TOTAL	63	100	124	100

Notre étude montre une prévalence de la MA avoisinant les 8 % dans la population âgée de moins de 60 ans ; elle augmente avec l'âge, la moitié environ (49.2%) de nos malades se trouve dans la tranche d'âge 70 -79 ans, suivi de la tranche d'âge 60-69 et 80-89 ans avec des taux de 20.6%.

L'âge moyen des sujets MA est de $73,47 \pm 7,61$ légèrement supérieur à celui des témoins qui est de $67,17 \pm 10,84$ (Tableau V).

Tableau V : Moyennes d'âge dans les groupes malades et témoins

	F	M	Moyennes
ALZ	74,68 ± 6,7	72,4 ± 8,29	73,47 ± 7,61
Témoins	68,26 ± 12,2	66 ± 9,27	67,17 ± 10,84

L'âge est sans conteste le principal facteur de risque de la MA.

Dans notre étude l'âge semble être lié à une augmentation exponentielle de la fréquence de la maladie, elle atteint un pic dans la tranche d'âge de 70-79 ans (*figure 27*).

Cet augmentation est retrouvée dans toutes les études, dont la plupart montrent que l'incidence de la MA double pratiquement par tranche d'âge de 5 ans après 65 ans, alors que l'augmentation de la prévalence en fonction de l'âge est moins rapide après 90 ans. Certains travaux suggèrent qu'un plateau pourrait être atteint pour les classes d'âges les plus élevées.

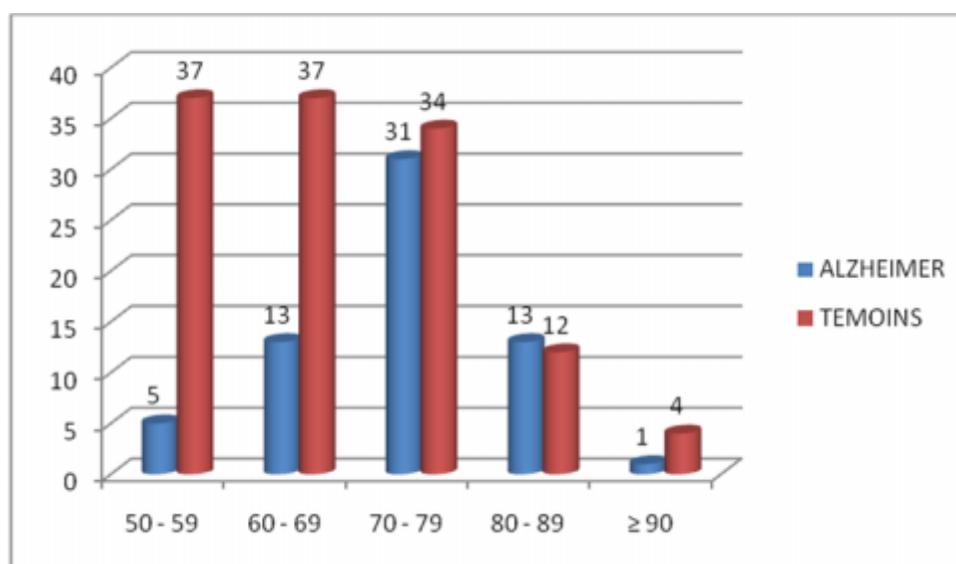


Figure 27: Répartition des malades et témoins en tranche d'âge

Ces hypothèses ; suggérant que, passé un certain âge, cette croissance exponentielle se stabiliserait. Ceci reste à discuter dans la mesure où, au-delà de 85 ans, les effectifs des études sont faibles [351].

Dans l'étude coopérative européenne le groupe de recherche EURODEM a rassemblé les résultats obtenus entre 1980 et 1990, sur 8 cohortes de sujets de plus de 65 ans [340] incluant des résultats obtenus sur la population française (étude PAQUID) [352]. La

fréquence des démences augmente avec l'âge, passant de moins de 2% entre 65 et 69 ans à plus de 30% après 90 ans.

Plusieurs études sont menées pour expliquer, comment l'âge favorise-t-il la neurodégénérescence, une augmentation marquée dans la production des radicaux libres, peut prédisposer pour les désordres apparentés à l'âge [353, 354].

4.3. MMSE, évaluation du statut cognitif et du stade de la démence

La démence comporte différents degrés de sévérité définie en fonction du score ou MMSE (mesure du déficit cognitif par le Mini-Mental State Examination), qui est une évaluation cognitive structurée et brève qui peut être appliquée au lit du malade ou en consultation par des cliniciens.

Ce test est sensible surtout aux troubles des fonctions cognitives rencontrés dans les démences et en particulier dans la maladie d'Alzheimer. Il évalue les fonctions cognitives suivantes: l'orientation spatio-temporelle, la mémoire immédiate, la concentration, le calcul mental, la mémoire de fixation (long terme), le langage et les habiletés visuoconstructives [355].

Les auteurs du test (Folstein et al, 1975) ont proposé comme limite inférieure de la normalité le score de 24/30: un score < 24 signale la présence probable d'un syndrome démentiel. Cette limite est abaissée pour les niveaux socioculturels bas [355].

En pratique, nous optons pour l'attitude suivante:

- MMSE > 27: la probabilité d'un syndrome démentiel est très faible (mais pas nulle).
- MMSE = 24-27: zone de doute.
- MMSE < 24: haute probabilité de la présence d'un syndrome démentiel.

Le score global reflète une performance dont l'interprétation nécessite de prendre en compte l'âge du sujet, l'état affectif mais surtout le niveau culturel [356].

Dans notre étude tous les témoins ont un score supérieur à 27, considérées comme cognitivement normaux ne présentant aucune forme de démence. Alors que tous nos malades ont un score inférieur à 24, et présentant des formes plus au moins avancées de démence. 60.3 % sont touchés par une démence sévère; 22.2% par une démence modérée et 17.5% sont déments légers [357].

Tableau VI: Evaluation du statut cognitif et du stade de la démence

<i>Score</i>	ALZ	%
<i>18-24</i>	11	17.5
<i>11-18</i>	14	22.2
<i>≤10</i>	38	60.3

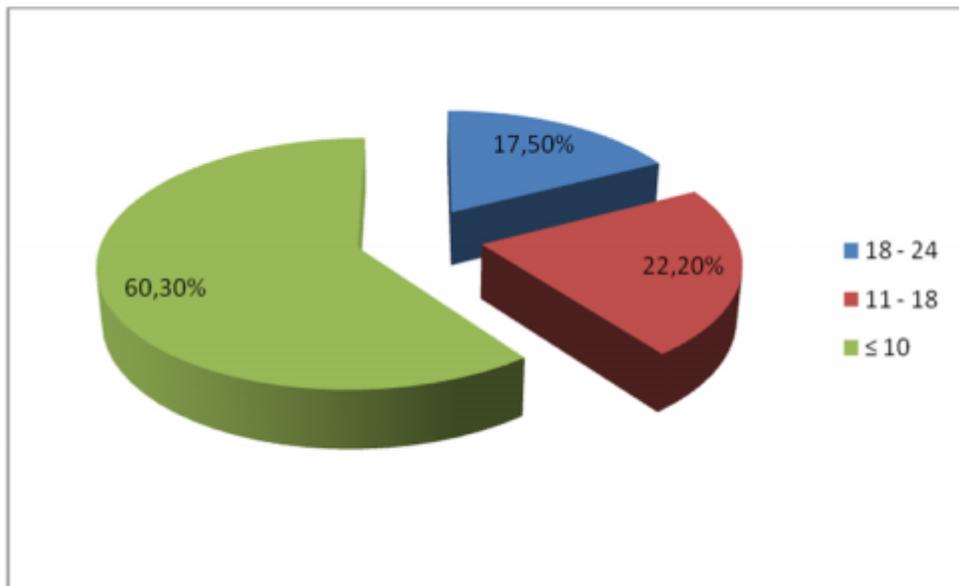


Figure 28: Evaluation du statut cognitif et du stade de la démence

4.4. Etude génétique de l'APOE

L'étude génétique du polymorphisme de l'Apo E a concerné les 124 témoins et 63 malades.

4.4.1. Les fréquences génotypiques de l'Apo E

Le tableau VII montre la comparaison des fréquences génotypiques entre les témoins et les sujets Alzheimer.

Tableau VII: Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes

	Témoins		ALZ		P
	N	(%)	N	(%)	
$\epsilon 3 / \epsilon 3$	86	69.4	27	42.9	<1%
$\epsilon 3 / \epsilon 4$	19	15.3	23	36.5	<1%
$\epsilon 2 / \epsilon 3$	17	13.7	3	4.8	ns
$\epsilon 2 / \epsilon 4$	1	0.8	4	6.3	ns
$\epsilon 4 / \epsilon 4$	1	0.8	6	9.5	<1%
Total	124	100	63	100	

*ns = non significative

La distribution génotypique de ce gène indique que $\epsilon 3/\epsilon 3$ est le génotype dominant dans le groupe témoin et dans le groupe malade, avec une fréquence de 69.4% et 42.9% respectivement, ces résultats concordent avec ceux retrouvés dans toutes les études réalisées à travers le monde.

Ainsi la prévalence du génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ est de (66.7%) Framingham (USA), (62.2%) Allemagne, (64.3%) France, (71.1%) Japon, (70,8%) Chine, (71%) en Arabie Saoudite, (69%) au Liban, (65.2%) en Hongrie, (69.84%) au Portugal, (83.1%) au Mexique, (58.7 %) en Finlande, (72.1%) au Japon, (88.2%) en Grèce, (72.1%) Soudan, (67.3%) Maroc, et (71.2%) en Tunisie [358-360].

La figure 29 montre que la distribution des fréquences génotypiques de l'apoE varie significativement entre malades et témoins.

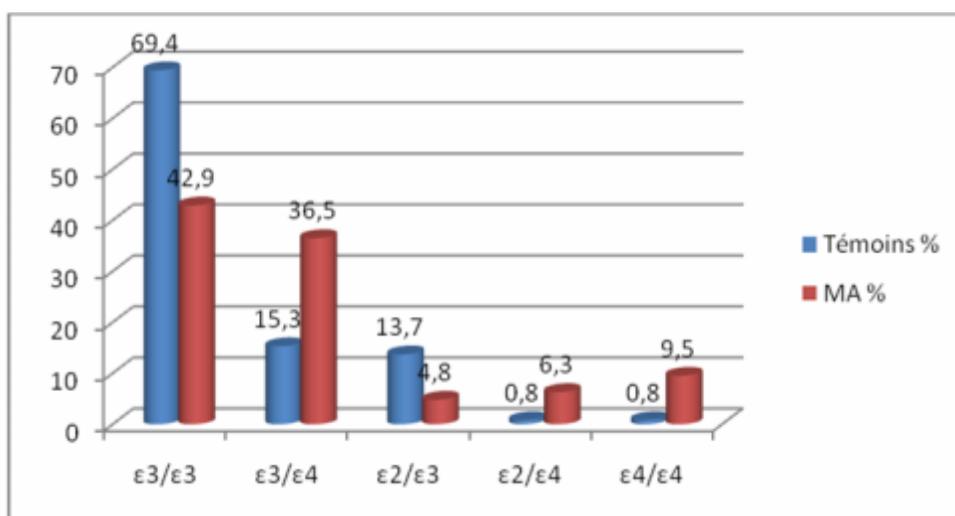


Figure 29: Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes

Dans le groupe témoin le génotype ϵ_3/ϵ_3 est suivi des génotypes ϵ_3/ϵ_4 (15.3%) et ϵ_2/ϵ_3 (13.7%); alors que les génotypes ϵ_2/ϵ_4 et ϵ_4/ϵ_4 ne sont présent que chez 1.6% de la totalité des témoins.

En revanche dans le groupe malade les fréquences génotypiques présentent un ordre décroissant différent de celui des témoins, le génotype ϵ_3/ϵ_3 le plus fréquent, suivi des génotypes ϵ_3/ϵ_4 (36.5%), ϵ_4/ϵ_4 (9.5%), ϵ_2/ϵ_4 (6.3%) et ϵ_2/ϵ_3 (4.8%).

On constate que le génotype ϵ_3/ϵ_4 est plus fréquent dans le groupe malade, il est augmenté de 21.2% par rapport aux témoins. Le génotype ϵ_4/ϵ_4 est également plus important chez les malades, il est augmenté de 8.7%. De même le génotype ϵ_2/ϵ_4 et plus important chez les malades.

Alors que dans les deux groupes on n'a pas trouvé des porteurs du génotype ϵ_2/ϵ_2 ; cependant les porteurs du génotype ϵ_2/ϵ_3 sont plus nombreux dans le groupe témoins que dans le groupe malade.

Ainsi on remarque que le nombre de malade augmente avec la présence et le nombre d'allèle de ϵ_4 , 47.7% des malades ne présentent pas des génotypes contenant ϵ_4 , alors que 52.3% présentant au moins une seule copie de l' ϵ_4 . Chez les témoins 83.1% ne possèdent pas d'allèle ϵ_4 et 16.9% seulement le possède suggérant une association entre l'allèle ϵ_4 et la MA.

Nos résultats sont en accord avec toutes les études, démontrant une association directe ou indirecte du polymorphisme de l'apoE avec la MA dans différents groupes ethniques à travers le monde.

Nos résultats concordent avec ceux d'Alan Roses et col, 1993 qui ont été les premiers à suggérer que l'allèle ϵ_4 avait une forte association avec la maladie d'Alzheimer [361].

Schmechel et col, on montrait que la fréquence de l'allèle ϵ_4 atteignait 40 % dans une population de patients atteints de formes familiales tardives de la maladie [362].

Cet association a été confirmée par de très nombreuses études cliniques et épidémiologiques, étendue aux formes sporadiques tardives ainsi qu'à certaines formes précoces.

Saunders et col ont présenté des données cliniques concernant l'association de l'apoE à la maladie d'Alzheimer, suggérant que (65%) des cas de maladie d'Alzheimer peuvent être attribué à la présence de l'allèle ϵ_4 , et le risque de la maladie d'Alzheimer est plus faible chez les sujets ayant le génotype ϵ_2/ϵ_3 [363].

Dans cette même étude 23% de cas de maladie d'Alzheimer était attribué à l'absence de l'allèle E2. Suggérant l'effet protecteur de l' $\epsilon 2$.

Après la découverte de l'association de l'allèle $\epsilon 4$ avec la maladie d'Alzheimer, la question s'est posée de savoir si cette association était spécifique de cette maladie où pouvait être retrouvée dans d'autres types de démence.

Les études d'association du gène de l'APOE avec d'autres maladies neurodégénératives ont alors conduit à suggérer que l'allèle $\epsilon 4$ est essentiellement associé à des affections présentant une amyloïdogenèse telles que les démences à corps de Lewy. A l'inverse, les maladies principalement caractérisées par une dégénérescence neurofibrillaire (la paralysie supranucléaire progressive ou les démences fronto-temporales) [364] ne sont pas associées à l'allèle $\epsilon 4$.

4.4.2. Répartition des fréquences alléliques dans la population d'étude

Le tableau VIII montre que la répartition des allèles de l'apoE est inégale sur l'ensemble des deux groupes.

Tableau VIII : Fréquences alléliques de l'Apo E dans le groupe témoin et malade

	$\epsilon 2$		$\epsilon 3$		$\epsilon 4$	
	<i>N</i>	(%)	<i>N</i>	(%)	<i>N</i>	(%)
Témoins	18	7.2	208	83.9	22	8.9
M.A.	7	5.5	80	63.5	39	31
P	<i>ns</i>		<1%		<1°/oo	

Nos résultats montrent la prédominance de l'allèle $\epsilon 3$ dans le groupe témoin avec une fréquence de (83.9%), suivie de $\epsilon 4$ (8.9%) et $\epsilon 2$ (7.2%). Alors que chez les malades on retrouve des fréquences de 63.5%, 31% et 5.5% respectivement. Cette tendance comparée aux données de la littérature, montre qu'elle est semblable aux résultats présentés par des études américaines (Rochester, Framingham), Indienne, Française, Australienne, Singapore, Brésilienne, Espagnol, des populations marocaines et tunisienne [365-367] (Tableau VIII).

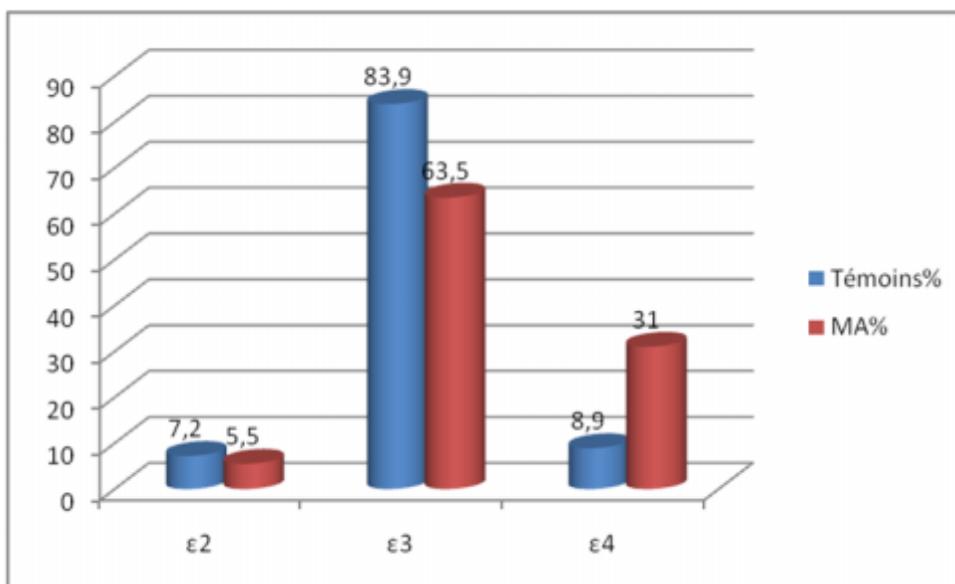


Figure 30 : Répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes

Nos résultats cependant, sont sensiblement différents de ceux rapportés dans les populations japonaises, Américaine (Boston), Iranaise (Téhéran), La Turquie (Istanbul), de Kougyo (Finlande) [368].

Ainsi la répartition des allèles de l'apoE est inégale sur l'ensemble de la population mondiale. Cette observation souligne l'importance de l'endroit géographique et le fond ethnique des sujets dans l'étude des génotypes d'APOE et leur association avec la MA.

Dans notre étude, la fréquence de l'allèle ε4 est de 31% soit quatre fois plus élevé dans le groupe malade que dans le groupe témoins (8.9 %), présentant une variation de 22.1% avec une différence significative ($p < 1\%$). Son augmentation est le résultat d'une baisse de la fréquence alléliques ε2 et ε3 dans le groupe M.A.

La fréquence de l'allèle ε4 est augmenté dans les formes tardives de la MA dans différents pays d'Europe [368], au Etats-Unis [369] et au japon [370]. Dans toutes ces études la fréquence de l'ε4 varie entre 0.10-0.18 dans la population générale, alors qu'elle est fortement augmentée entre 0.24- 0.52 chez les sujets atteints de MA (*Tableau VIII*).

En Europe de l'ouest, la fréquence de l'ε4 chez les groupes MA et dans la population générale suit un gradient décroissant nord-sud allant des pays du nord avec des prévalences de 0.2, à une prévalence de 0.1 dans les pays du bassin méditerranéen (Espagne et Italie) [132, 371]. Par conséquent la fréquence de l'allèle ε3 augmente du nord au sud pour atteindre une fréquence maximale de l'ordre de (0.849–0.898) autour des pays du bassin méditerranéen [132, 372].

L'association de l'allèle $\epsilon 4$ avec la maladie d'Alzheimer était étalée aux formes précoces et sporadiques suite aux études de Chartier-Harlin, et col [373], et ceux de Fukuda et col [374].

Malgré que nos données ne sont pas représentées, tous nos malades présentent une forme sporadique sans antécédents familiaux, avec pour la plupart d'entre eux, une manifestation tardive de la MA, ne débutant qu'après l'âge de 65 ans.

Il est important de signaler que notre étude ne retrouve pas de différence dans la fréquence de l'allèle $\epsilon 2$ entre sujets malades et témoins.

Tableau IX : Fréquences alléliques de l'Apo E dans différentes études dans le monde
[132, 371, 372].

	n	Fréquences alléliques		
		$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Finland				
Cas MA	109	0.07	0.72	0.21
Témoins	188	0.08	0.83	0.09
France				
Cas MA	675	0.04	0.61	0.35
Témoins	657	0.07	0.82	0.11
Spain				
Cas MA	116	0.03	0.60	0.37
Témoins	133	0.05	0.88	0.07
Minnesota, USA				
Cas MA	296	0.04	0.62	0.34
Témoins	463	0.10	0.78	0.12
Colombie				
Cas MA	61	0.02	0.60	0.36
Témoins	61	0.02	0.89	0.08
Japon				
Cas MA	72	0.02	0.67	0.31
Témoins	83	0.03	0.90	0.07
Sud de l'Italie				
Cas MA	173	0.03	0.69	0.28
Témoins	174	0.05	0.88	0.07
Iran				
Cas MA	105	0.0095	0.78	0.21
Témoins	129	0.027	0.91	0.06

4.4.3. Association génotypiques et alléliques et maladie d'Alzheimer

Le calcul des Odds ratio montre que les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ présentent une association significative ($p < 0.001$) vis-à-vis de la survenue de la maladie d'Alzheimer. Le risque d'association entre la maladie et l' $\epsilon 4$ est augmenté chez les individus porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ par rapport à ceux portant l'allèle $\epsilon 3$. Elle est plus élevée chez les sujets (homozygotes) avec un OR de 5.01 et les sujets $\epsilon 3/\epsilon 4$ avec un OR de 3.86.

La contribution du polymorphisme du gène de l'apo E dans la MA est suffisamment documenté et largement étudié. Et l'allèle $\epsilon 4$ est fortement associé à la MA dans toutes les études effectuées à travers le monde.

Nos résultats concordent avec toutes ces études, une méta-analyse menée par Rubinsztein et Easton (1999) qui a porté sur 3 390 patients de plus de 65 ans a montré que le risque relatif de la maladie d'Alzheimer associé à l'allèle $\epsilon 4$, calculé par rapport aux sujets homozygotes $\epsilon 3/\epsilon 3$ était de (3.18), le risque des sujets porteurs de deux allèles était de (11.57) [375].

Tableau X : Calcul des Odds ratio des sujets malades ayant un allèle $\epsilon 4$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ et $\epsilon 2/\epsilon 3$ par rapport aux témoins ayant un génotype 3/3.

	Odds ratio	P
$\epsilon 4$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$	5.01 (2.36 < OR < 10.71*)	< 0.001
$\epsilon 2$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$	1.24 (0.42 < OR < 3.59*)	ns
$\epsilon 3/\epsilon 4$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$	3.86 (1.72 < OR < 8.72*)	< 0.001
$\epsilon 2/\epsilon 3$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$	0.56 (0.12 < OR < 2.26*)	ns

* : Limites de confiance selon Cornfield à 95%

Une autre méta-analyse (de Farrer et col. 1997) a regroupé 47 études portant sur 5939 malades et 8746 témoins, chez les sujets caucasiens. Le risque de MA était significativement augmenté, les génotypes $\epsilon 2/\epsilon 4$ (OR = 2.6, 95% CI = 1.6-4.0), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (OR = 3.2, 95% CI = 2.8-3.8), et $\epsilon 4/\epsilon 4$ (OR = 14.9, 95% CI = 10.8-20.6); alors que la valeur des ORs diminuée pour les génotypes $\epsilon 2/\epsilon 2$ (OR = 0.6, 95% CI = 0.2-2.0) et $\epsilon 2/\epsilon 3$ (OR = 0.6, 95% CI = 0.5-0.8) [376].

De nombreuses études ont confirmé cette association entre l'allèle $\epsilon 4$ et la MA ainsi dans les études de Brousseau et col [377] et Higgins GA et col [378], le risque de maladie d'Alzheimer lié à l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E est augmenté d'un facteur 4 à 10.

Dans une cohorte finlandaise Strittmatter et Roses [150]. ont établi que le génotype de l'Apo E est associé au risque de développer une MA, Les sujets porteurs d'un allèle $\epsilon 4$ auraient un risque relatif de MA de 1,84 et les sujets homozygotes $\epsilon 4$ un risque de 3,3 par rapport aux sujets qui ne sont pas porteurs de cet allèle. Kivipelto et al. ont constaté que l'apoE4 était un facteur de risque indépendant de la maladie d'Alzheimer (MA), même après ajustement des facteurs de risques vasculaires (OR = 2,3 ; 95%CI = 1,1- 4,1) [379].

D'autres études ont été faites en fonction de l'âge de début et la présence de l'allèle $\epsilon 4$. Ainsi, Castelli et al [380] dans une étude cas témoins de cent patients présentant des troubles mnésiques liés à l'âge. Les patients homozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ présentent un âge de survenue des troubles plus précoce que les autres patients.

D'autres études, comme celle de Corder et ces collaborateurs [381], ont montré que la présence de l'allèle $\epsilon 4$ baisse considérablement l'âge de début de la maladie, ainsi le début est plus précoce pour les porteurs du génotype $\epsilon 4/\epsilon 4$ (50% avec âge de début de 66 ans), puis $\epsilon 3/\epsilon 4$ (50% de 73 ans) et $\epsilon 3/\epsilon 3$ (50% de 86 ans), et ceux de $\epsilon 2 /\epsilon 4$ ont un âge encore plus tardif. Des données contradictoires ont été publiées sur l'influence de l'allèle $\epsilon 4$ sur l'âge de début de la maladie. Notre étude ne retrouve pas de liaison entre l'âge et l'allèle $\epsilon 4$.

En admettant un mode de transmission autosomique dominant, Rao *et al.* ont suggéré que, dans des formes familiales tardives, la pénétrance des génotypes incluant l'allèle $\epsilon 4$ est complète chez les femmes et de l'ordre de 62 à 65 % chez les hommes [382]. Cette différence est aussi observée pour les formes sporadiques puisque le risque associé à l'allèle $\epsilon 4$ est supérieur (de l'ordre de 2 fois) pour les femmes par rapport aux hommes [373].

Dans notre étude Les sujets ayant l'allèle $\epsilon 2$ ne présentent pas de différence significative par rapport aux homozygotes $\epsilon 3/\epsilon 3$ en ce qui concerne son implication dans la MA. Ainsi que la fréquence de l'allèle $\epsilon 2$ dans notre groupe MA est de 5.5% ne diffère pas du groupe contrôle qui est de 7.2%.

L'effet protecteur de l'apoE2 n'est pas évident dans notre population d'étude. Nos résultats sont en accord avec les données obtenues en Espagne, Iran, Turquie, et Italie. De même cet effet protecteur de $\epsilon 2$ est moins évident dans l'est de l'Asie [365, 383].

L'allèle $\epsilon 4$ était établi comme un important facteur de susceptibilité pour la MA dans plusieurs groupes ethniques, mais sa contribution dans la maladie d'Alzheimer n'est pas la même dans ces différents groupes [376].

Tableau XI : Estimation de l'impact des différents génotypes du gène codant pour l'ApoE en fonction de l'origine ethnique sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer [384]

	Populations Afro-Américaines		Populations Hispaniques		Populations Japonaises		Populations Caucasiennes	
	OR	IC95%	OR	IC95%	OR	IC95%	OR	IC95%
$\epsilon 2/\epsilon 2$	2.4	[0.3-22.7]	2.6	[0.2-33.3]	1.1	[0.1-17.2]	0.6	[0.2-2.0]
$\epsilon 2/\epsilon 3$	0.6	[0.4-1.7]	0.6	[0.3-1.3]	0.9	[0.4-2.5]	0.6	[0.5-0.8]
$\epsilon 3/\epsilon 3$	1	Référence	1	Référence	1	Référence	1	Référence
$\epsilon 2/\epsilon 4$	1.8	[0.4-8.1]	3.2	[0.9-11.6]	2.4	[0.4-15.4]	2.6	[1.6-4.0]
$\epsilon 3/\epsilon 4$	1.1	[0.7-1.8]	2.2	[1.3-3.4]	5.6	[3.9-8.0]	3.2	[2.8-3.8]
$\epsilon 4/\epsilon 4$	5.7	[2.3-14.1]	2.2	[0.7-6.7]	33.1	[13.6-80.5]	14.9	[10.8-20.6]

OR : Odds ratio ; IC 95 % : intervalle de confiance à 95 %. ($\epsilon 3/\epsilon 3$ est pris comme référence).

L'impact de l'allèle $\epsilon 4$ est plus élevé chez les Japonais mais beaucoup plus faible pour d'autres ethnies, voire difficilement observable par exemple dans des populations Hispaniques. Chez les africains du sud de Sahara, des études ont montré une absence d'association de l'allèle $\epsilon 4$ avec la MA (Tableau XI).

Ces variations sont probablement expliquées à la fois par un patrimoine génétique et des facteurs environnementaux différents, qui sont mal documentés [384].

4.4.4. Répartition selon le nombre de copies

Tableau XII : répartition selon le nombre de copies de l'apoE

	ALZ	T	%ALZ	%T	OR	P
0	30	103	22.5	77.5		
1	27	20	57.4	42.6	4.64	< 0.001
1+2	33	21	61.1	38.9	5.40	< 0.001
2	6	1	85.7	14.3	20.6	< 0.001

0= $\epsilon 3/\epsilon 3 + \epsilon 2/\epsilon 3$; 1= $\epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$; 1+2= $\epsilon 2/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4$; 2= $\epsilon 4/\epsilon 4$

Après ajustement du sexe et de l'âge, les OR des sujets avec une ou deux copies de l'allèle $\epsilon 4$ étaient de (5.40), Les OR des sujets hétérozygotes de (4.64), et des homozygotes de 20.6.

Ainsi le risque est plus élevé pour les sujets porteurs de deux allèles $\epsilon 4$ que pour les porteurs d'un seul allèle. Indiquant qu'il existe un effet-dose, associé à cet allèle.

Cette effet-dose, est retrouvé dans plusieurs études, dans lesquelles le risque de développer la MA est augmenté de 2 à 3 fois pour les porteurs d'un allèle $\epsilon 4$ est de l'ordre de 10 à 15 fois pour les porteurs de deux allèles $\epsilon 4$ [385].

Plusieurs études ont prouvés que l'expression des allèles du gène APOE n'est pas similaire chez les patients et les témoins. Chez les malades de génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$, on note une augmentation relative de l'expression de l'allèle $\epsilon 4$ par rapport à l'allèle $\epsilon 3$, de l'ordre de 1,5 fois supérieure à ce qui est observé chez les témoins de même génotype [384]. Ces observations indiquent qu'outre les variations qualitatives du gène de l'APOE, des variations quantitatives de l'expression des allèles de l'APOE représenteraient aussi un déterminant.

Les données obtenues à partir des souris transgéniques APP717 exprimant 0, 1 ou 2 copies du gène de l'APOE suggèrent qu'une variation de l'expression de l'APOE chez l'homme serait un déterminant de l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. Cette observation est particulièrement intéressante puisque, chez l'homme, en ne tenant compte que de la seule combinaison des allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ et d'autres marqueurs génétiques localisés sur le locus de l'APOE, on peut mieux définir des sous populations à risque [363].

La découverte de nouveaux polymorphismes dans le promoteur du gène de l'APOE (-491 A→T, -427 C→T et -219 G→T), capables de moduler le risque de développer l'affection renforce cette hypothèse [386].

Si la plupart des études s'accordent sur l'association de ces polymorphismes à la maladie d'Alzheimer, la controverse réside dans l'origine de cette association : provient-elle uniquement du déséquilibre de liaison de ces polymorphismes avec l'allèle $\epsilon 4$, ou ceux-ci jouent-ils un rôle indépendamment de cet allèle, Une méta-analyse regroupant plus de 3 800 sujets suggère des effets propres de ces polymorphismes [387].

En outre, ces polymorphismes ont une traduction fonctionnelle et modulent l'expression de l'APOE comme le suggèrent à la fois des études *in vivo* et *in vitro* [388, 389]. Les mécanismes par lesquels ces polymorphismes entraînent la variation de l'expression de l'APOE ne sont pas élucidés. Il a été observé que ces polymorphismes sont corrélés à la quantité de dépôts amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, leurs effets étant indépendants du génotype $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ [390]. De même, dans le tissu cérébral de témoins, le nombre de plaques séniles dans deux régions de l'hippocampe (CA1 et *subiculum*) augmente de façon significative pour les individus de génotype -219 TT, bien qu'il soit difficile de déterminer si cet effet est indépendant ou non de l'allèle $\epsilon 4$ [391]. Néanmoins, ces

données confirment la validité de l'association entre expression de l'APOE et quantité de dépôts amyloïdes dans le tissu cérébral humain.

Et selon plusieurs études la maladie apparaît plus tôt chez les sujets porteurs de deux allèles $\epsilon 4$ (âge moyen de début de la maladie = 75 ans) que chez ceux qui n'en possèdent qu'un (80ans) ou aucun (85 ans). Le risque associé à l'allèle $\epsilon 4$ est moins important avant 60 ans et après 80 ans [385].

Cet impact de l'allèle $\epsilon 4$ sur la MA ne semble apparent qu'entre 40 et 90 ans et diminuerait après 70 ans. Cet allèle n'aurait aucun impact sur le risque de développer l'affection pour des individus d'âge très avancé, même si la pénétrance du génotype $\epsilon 4/\epsilon 4$ semble complète à 90 ans [384].

Dans une étude néerlandaise (Rotterdam Study) [308] Les relations entre démence et athérosclérose viennent d'être étudiées suggérant un phénomène d'interaction entre athérosclérose et Apo E dans la maladie d'Alzheimer. Le risque de maladie d'Alzheimer est multiplié par 4 chez les sujets porteurs d'au moins un allèle $\epsilon 4$ et ayant une athérosclérose, alors que le risque associé à chacun de ces éléments considéré séparément est faible [378].

Le profil cognitif en fonction du statut de l'apo E a fait lui aussi l'objet de plusieurs études chez les patients souffrant de MA, mais aussi chez les sujets cognitivement normaux. Parmi ces études celle de Lehtovirta *et al.* En 1996 [392], qui ont mis en évidence une détérioration mnésique plus importante chez les sujets homozygotes $\epsilon 4$, qui contraste avec des fonctions verbales mieux préservées et ce quel que soit l'âge de survenue des troubles. Ce qui est en faveur d'une préservation relative du fonctionnement frontal.

Smith et coll., se sont aussi intéressés à l'influence du génotype de l'apoE sur le «phénotype » cognitif de patients souffrant de MA et de DCL [393]. Ils mettent en évidence une relation entre la présence de l'allèle $\epsilon 4$ et l'importance de la détérioration mnésique chez ces patients souffrant de MA et de DCL. Ils concluent à une possible répartition des lésions cérébrales variable en fonction du statut de l'apoE.

Néanmoins, la présence de l'allèle $\epsilon 4$ serait un facteur de risque des démences de type frontal [394]. Pourtant, la distribution des apolipoprotéines E dans le cortex cérébral des patients souffrant de MA serait très hétérogène, avec des concentrations maximales dans le cervelet et des concentrations minimales dans le cortex frontal.

La compréhension de la fonction de l'apoE dans le SNC est primordiale pour appréhender son implication dans le maintien de l'intégrité du cerveau au cours du vieillissement mais aussi dans la maladie d'Alzheimer où son mécanisme d'action reste controversé. L'ensemble des résultats montre qu'il est important d'élucider le rôle

extracellulaire mais aussi intracellulaire de l'apoE sur les neurones et en particulier de déterminer son action sur le cytosquelette [395].

Corder et col ; Growdon et col ; Kurz et col ; Blacker et col ; Murphy et col, on constaté que le phénotype de la MA ne diffère pas entre les porteurs et les non porteurs de l'ε4, d'autres retrouvent que les sujets porteurs de l'allèle ε4 auraient, à âge de début égal, une évolution clinique plus lente et moins grave que les non-porteurs [385]. Ce résultat doit être confirmé dans des études prospectives sur des cas incidents de la maladie d'Alzheimer.

Ainsi l'allèle ε4 est un facteur de risque majeur de la MA. Mais la similitude clinique et cognitive entre porteurs et non porteurs de l'ε4 indique l'influence d'autres facteurs génétique et environnemental dans le phénotype de la MA.

4.5. MTHFR et la mutation C677T

Les fréquences génotypiques de la MTHFR (CC/CT/TT) et les allèles (C/T) étaient de 42.7/46.8/10.5 et 66/34% dans le groupe témoins, et 30.2/49.2/20.6 et 54.8/45.2% dans le groupe MA, respectivement.

Tableau XIII : Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la MTHFR C677T chez les sujets témoins et les sujets MA.

	Témoins		MA		P
	n	%	n	%	
CC	53	42.7	19	30.2	ns
CT	58	46.8	31	49.2	ns
TT	13	10.5	13	20.6	ns
C	164	66	69	54.8	ns
T	84	34	57	45.2	ns

Le tableau XIII, montre que 20.6% patients MA étaient homozygotes (TT) pour la MTHFR et 49.2% étaient hétérozygotes (CT), alors que pour les témoins on retrouve 10.5 TT et 46.8 CT. Il n'y avait aucune différence statistiquement significative dans la distribution des allèles et des génotypes chez les patients MA comparés aux témoins.

La distribution des allèles et des génotypes de la MTHFR C677T dans la maladie d'Alzheimer avec et sans l'allèle $\epsilon 4$ est représentée sur le (*tableau XIV*). Aucune différence significative des allèles de la MTHFR C677T et des fréquences génotypiques dans la MA entre les porteurs et non porteurs de l'allèle d'APOE $\epsilon 4$ n'ont été détectées dans tous les échantillons. La fréquence de l'allèle T et la distribution des génotypes TT dans les MA n'étaient pas significatif (T vs. C : $\text{Chi}^2 = 0.01$ $p = 0.97$; TT vs. CC + CT : $\text{chi}^2 = 0.65$, $p = 0.41$) dans les sous-groupes d'APOE $\epsilon 4$ (+).

Tableau XIV: Distribution des allèles et des génotypes de la MTHFR C677T dans la MA.

Fréquences				
alléliques et génotypiques	MA APOE $\epsilon 4$ (+)	MA APOE $\epsilon 4$ (-)	Chi ²	p
CC	08 (24.2%)	10 (33.3%)		
CT	19 (57.6%)	12 (40.0%)		
TT	06 (18.2%)	08 (26.7%)	0.65	0.41
C	35 (53%)	32 (53.3%)		
T	31 (47%)	28 (46.7%)	0.01	0.97

APOE $\epsilon 4$ (+): sujets qui possèdent 1 ou 2 copies d'allèle $\epsilon 4$; APOE $\epsilon 4$ (-): sujets qui ne possèdent pas l'allèle $\epsilon 4$.

La combinaison MTHFR/TT et génotype $\epsilon 4/\epsilon 4$ a été trouvé chez deux malades uniquement parmi les 63 MA. Nos données sont en défaveur d'une association entre la mutation de la MTHFR C677T et la MA. Cette recherche sur nos 63 patients est en accord avec trois études ayant abordé la liaison MTHFR-ApoE (45 patients MA dans Zuliani et collègues [396] ; 49 patients MA en Chapman [397] ; et 140 patients MA dans Regland [398]). Bien qu'une étude confirme l'association entre la mutation de la MTHFR C677T et la démence vasculaire [399]. Seripa et coll. n'ont trouvé aucune différence dans la distribution du polymorphisme de la MTHFR entre les cas de MA et des témoins âgés dans la cohorte américaine et la cohorte italienne [400]. Religa et coll. ont constaté que l'homocystéine plasmatique totale est augmentée chez les patients MA et dépendante du génotype de la

MTHFR T/T (homozygote pour la mutation) en présence des niveaux foliques bas ; cependant la distribution du polymorphisme de la MTHFR C677T dans la population polonaise ne diffère pas dans l'MA et les témoins [401].

L'hétérogénéité de distribution du polymorphisme C677T est de cause multifactorielle et illustre bien les interactions gène-environnement. Son effet sur l'homocystéine dépend de l'état nutritionnel, des modalités de préparation des aliments (la cuisson prolongée détruit les folates et les rend inactifs) et de l'absorption intestinale des folates (diminuée dans les maladies infectieuses). L'alimentation au Maghreb, de type méditerranéen est bien fournie en folates ; en effet, les apports quotidiens ont été estimés à 300-400 mg et sont largement suffisants pour les besoins de l'organisme [402]. Ceci peut être un facteur protecteur des effets morbides du polymorphisme étudié.

Une analyse, portant sur 6 000 individus, a indiqué que le génotype 677TT cause une augmentation de 70 % du risque de dépression [307]. Des travaux sur la démence et le déclin cognitif léger ont permis de constater qu'il existe une augmentation des taux d'homocystéine plasmatique chez un nombre significatif de patients [307]. Puisque la démence est caractérisée, entre autres, par un affaiblissement des vaisseaux sanguins qui irriguent le cerveau, le variant 677T représente donc un facteur de risque potentiel. Le lien entre le polymorphisme et la démence d'origine vasculaire ou encore la maladie d'Alzheimer n'a toutefois pas été clairement établi [18].

Une étude sur des souris dont le gène *Mthfr* est inactivé [403] provoque une altération de l'expression de plusieurs gènes du cerveau [404] et une augmentation de l'apoptose a été observée dans le cervelet [405].

4.6. Etude des autres facteurs de risque

Parmi les facteurs de risque nous avons pris en considération les plus connus et les plus quantifiables à savoir : le niveau d'éducation, le tabagisme le diabète, HTA, et l'alcool.

4.6.1. Le niveau d'étude

68.2% de nos malades sont des analphabètes suivi par 28.6 % avec un niveau primaire, et seulement 3.2% avec des niveaux secondaires et supérieurs, ces résultats montrent que le niveau d'éducation semble jouer un rôle important dans le risque de survenue de la MA. Les personnes n'ayant pas poursuivi une longue scolarité (Analphabète, Primaire) sont plus exposés à la maladie.

Tableau XV: représentant le nombre et le % des malades selon leur niveau d'étude

	MA	%
Aucun	43	68.2
Primaire	18	28.6
Secondaire	1	1.6
Supérieur	1	1.6

La plupart des études trouvent qu'un niveau d'éducation élevé paraît un facteur protecteur tout comme certaines activités sociales et de loisirs. Ainsi, les activités qui nécessitent la planification des tâches et l'initiative (jardiner, voyager, bricoler, tricoter) paraissent associées à un risque moindre de démence alors qu'aucun lien n'a pu être mis en évidence pour les activités comme la lecture, les jeux de société ou la garde de jeunes enfants. L'activité physique permettrait également de réduire les risques de développer la maladie d'Alzheimer.

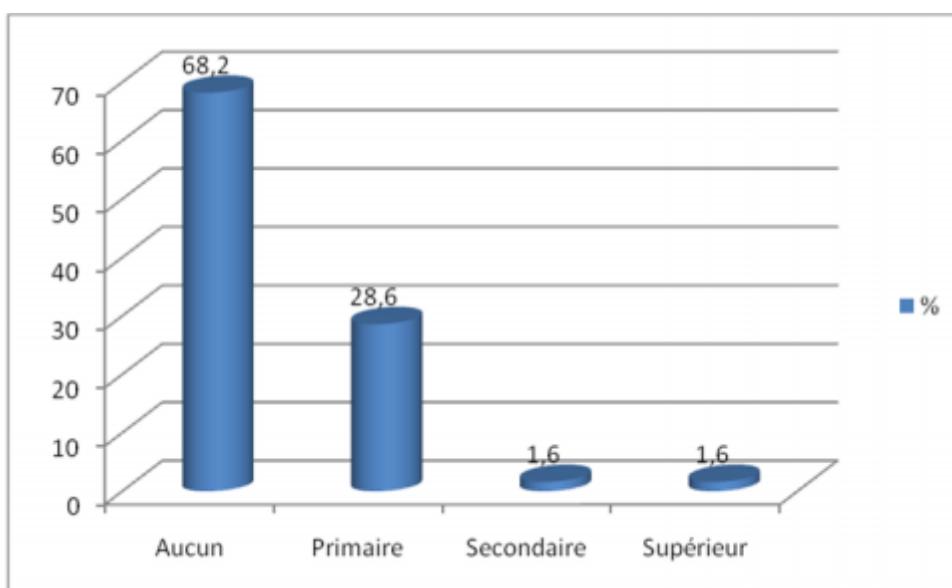


Figure 31 : répartition des malades selon leur niveau d'étude.

Nos résultats concordent avec plusieurs études transversales et la plupart des études réalisées à partir de données d'incidence qui observent une association entre un niveau bas d'éducation ou catégorie socioprofessionnelle et un risque accru de maladie d'Alzheimer,

même si certains auteurs ne retrouvent pas d'association. A lésions cérébrales égales, les symptômes cliniques de la maladie pourraient apparaître plus précocement chez les personnes ayant un bas niveau d'étude.

Dans l'étude Paquid, il a été montré que ce qui différenciait les sujets était l'obtention ou non du certificat d'études primaires, et les sujets n'ayant pas atteint ce niveau présentaient un risque accru de développer une démence (RR = 1,83) et/ou une maladie d'Alzheimer (RR = 1,81) [352].

Il est intéressant de noter que cet effet du niveau d'éducation n'explique pas le risque accru de maladie d'Alzheimer chez les femmes âgées de plus de 80 ans, puisque, dans cette génération, le niveau d'étude des femmes était beaucoup plus faible que celui des hommes.

Les sujets ayant atteint le certificat d'études pourraient avoir une capacité de réserve cérébrale leur permettant de mieux résister à la maladie, et d'en différer ainsi de 4 à 5 ans l'expression clinique.

Les occupations à l'âge adulte ne semblent pas jouer un rôle déterminant contrairement à celles effectuées durant l'enfance et l'adolescence.

4.6.2. Les traumatismes crâniens

Parmi nos malades, 13 sujets soit (20.6%) présentent des antécédents de traumatismes crâniens. Alors que 5.6% des témoins ont subi un traumatisme. Nous retrouvons une différence significative ($p < 5\%$)

Tableau XVI: Fréquence des traumatismes crâniens chez les malades et les témoins

	MA		Témoins		p
	n	%	n	%	
TC	13	20.6	7	5.6	<5%

L'association entre démence et traumatisme crânien est largement controversée. Plusieurs études ont mis en évidence un risque augmenté de maladie d'Alzheimer chez les sujets ayant des antécédents de traumatismes crâniens [406], d'autres n'ont pas retrouvé cette association [407].

Selon l'analyse européenne, le risque de maladie d'Alzheimer est multiplié par 1,8 chez les sujets ayant un antécédent de traumatisme crânien avec perte de connaissance survenu au moins un an avant le début de la démence.

En 1995, Mayeux et coll. [408] ont montré qu'un antécédent de traumatisme crânien ne serait facteur que chez les porteurs de l'allèle E4, la superproduction de protéine B amyloïde et d'interleukine 1 après un traumatisme crânien pouvant être le mécanisme biologique de cette association.

En revanche, dans une étude publiée en 1997 [409], le phénotype de l'Apo E ne modifie pas le risque de maladie d'Alzheimer associé aux antécédents de traumatisme crânien.

Les résultats obtenus à partir des données d'incidence en population des études Eurodem et de Rotterdam [410], n'ont pas retrouvé d'association significative entre traumatisme crânien et risque de maladie d'Alzheimer ou de démence, ni d'interaction entre traumatisme crânien et apolipoprotéine E [406].

4.6.3. Dépression

Parmi nos 63 malades 39.6% présentent des antécédents de dépression. Résultats qui nous permet d'envisager que des antécédents de dépression peuvent augmenter le risque de la MA ($p < 0.001$).

Tableau XVII: Fréquence de la dépression chez les malades et les témoins.

	MA		Témoins		p
	n	%	n	%	
Dépression	25	39.6	9	7.2	< 0.001

Cette association entre dépression et Alzheimer est confirmée par plusieurs études avec un risque de 1,16 à 3,50 pour les études cas-témoins et de 1,08 à 3,20 pour les études de cohorte [411].

Mais Selon Tony Jorm [411] dans une revue de la littérature, sur l'association entre dépression et démence, l'auteur pose le problème de l'interprétation de cette association. Selon lui, six hypothèses sont envisageables :

- (1) les traitements antidépresseurs sont des facteurs de risque de démence ;
- (2) la démence et la dépression ont des facteurs de risque communs ;
- (3) la dépression est un syndrome prodromique de la démence ;
- (4) la dépression est réactionnelle à des troubles cognitifs précoces ;
- (5) la dépression abaisse le niveau de détection de la démence (cognitif ou fonctionnel)
- (6) la dépression est un facteur causal de la démence.

Les quatre dernières hypothèses paraissent les plus crédibles selon Tony Jorm. Cette discussion est exemplaire et pourrait s'appliquer à beaucoup de facteurs de risque.

4.6.4. Etude des autres facteurs de risque vasculaires dans la MA

On connaît maintenant l'importance grandissante des facteurs vasculaires dans la maladie d'Alzheimer.

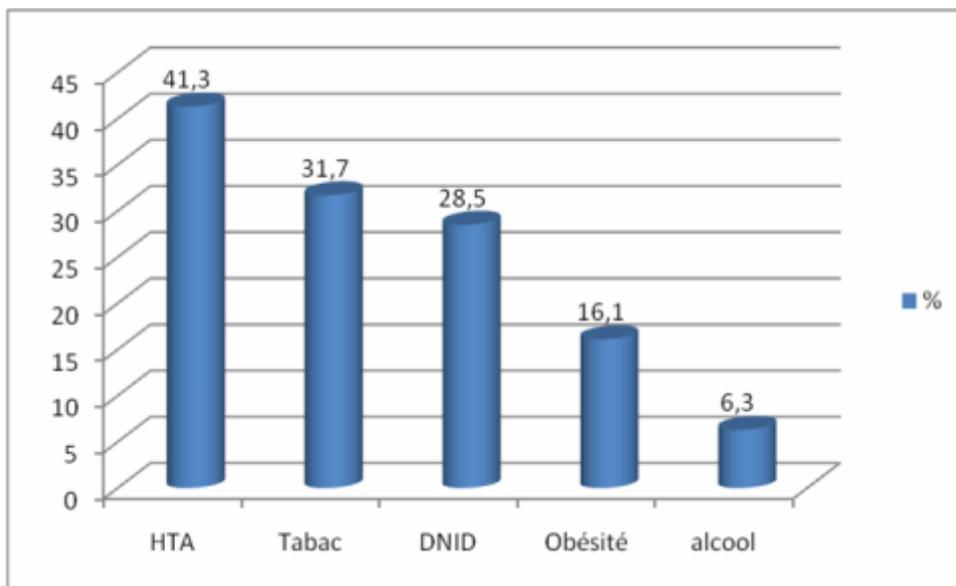


Figure 32 : fréquences des autres facteurs de risque

Casserly et Topol ont mis en évidence que la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose ont en commun des origines génétiques et des facteurs de risques environnementaux, comme l'Apo E, l'hyperhomocystéinémie, le diabète, l'hypertension, le tabagisme, l'inflammation, l'augmentation de la masse grasse et l'obésité [311].

Des données récentes suggèrent l'existence d'un lien entre le métabolisme du cholestérol et une susceptibilité à développer une MA. Kivipelto M et al, dans une étude prospective, ont mis en évidence que les sujets présentant une pression artérielle systolique élevée (≥ 160 mmhg) ou un taux sérique de cholestérol augmenté ($\geq 6,5$ mmol/l) à l'âge mûr ont une probabilité significativement plus élevée de développer ultérieurement une MA, et ce même après ajustement de l'âge, de l'indice de masse corporelle, du niveau socioculturel, des événements cardio-vasculaires et de la consommation d'alcool ou de tabac, par rapport aux sujets ayant une pression systolique normale (OR 2,3 ; IC 95% 1,0-5,5) ou un taux de cholestérol normal (OR 2,1 ; IC 95% 1,0-4,4). Les patients présentant ces deux facteurs de

risque au cours de l'âge mûr avaient un risque plus élevé de développer une MA que ceux ayant uniquement l'un des deux (OR 3,5 ; IC 95% 1,6-7,9) [314]. Il y a quelques pistes épidémiologiques mais cependant peu de preuves cliniques sur le fait qu'un taux sanguin de cholestérol bas puisse retarder l'apparition d'une MA. Deux études observationnelles ont rapporté un effet protecteur des statines sur l'incidence de la MA. L'une était une analyse transversale [412] et l'autre une étude de type cas-témoin nichée dans une cohorte [413].

Les statines modifient le métabolisme du cholestérol et diminuent également le taux de A bêta (peptide bêta amyloïde) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Une étude allemande randomisée, en double aveugle, contre placebo, a évalué l'effet d'une prise quotidienne de 80 mg de simvastatine sur 26 semaines chez des patients atteints de MA. Elle a mis en évidence une diminution significative du taux de A-béta 40 dans le LCR des patients atteints d'une MA à un stade modérée. Cette réduction de l'Abéta 40 était corrélée à la diminution de 24S-hydroxycholestérol. Ces modifications n'étaient pas retrouvées chez les patients aux stades plus sévères de la maladie [414].

Une étude longitudinale suivant 1138 sujets âgés initialement non déments a montré que les patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaires comme le diabète, l'hypertension, les pathologies cardiaques et le tabagisme sur une période de plus de 5,5 ans étaient plus à risque de développer une maladie d'Alzheimer. Avec un seul facteur de risque vasculaire, le risque relatif était de 1,7 (IC 95%: 1,1-2,4) et ce résultat augmentait avec le nombre de facteurs de risques cardiovasculaires : 2,6 (IC 95%: 1,6-3,9) pour deux facteurs de risque et 3,4 (IC 95: 2,1-5,7) pour trois ou plus. Alagiakrishnan et al. dans leur revue de la littérature ont souligné le lien probable entre la prise en charge adaptée des facteurs de risque cardiovasculaires et la prévention ou le ralentissement de la progression de la démence [415].

4.6.4.1. Le tabagisme et l'alcool

Le tableau montre la fréquence des alcooliques et des fumeurs témoins et malades.

Tableau XVIII : fréquence des fumeurs et alcooliques chez les malades et les témoins

	MA		Témoins		p
	n	%	n	%	
Fumeurs	20	31.7	12	9.6	< 1%
Alcool	4	6.3	6	4.8	ns

4.6.4.1.1. Le tabagisme

Dans notre groupe malade les fumeurs sont en nombre de 20 soit 31.7 % seulement contre 68.3% de non fumeurs. Ces résultats sont en désaccord avec différentes études épidémiologiques semblent attribuer au tabagisme un rôle protecteur vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer. Plusieurs études cas témoins ont observées que le risque de maladie d'Alzheimer semble être réduit chez les fumeurs.

Une analyse européenne du rôle du tabac dans la maladie d'Alzheimer montre un risque de maladie inférieur de 20 % chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs.

Des hypothèses biologiques pourraient renforcer cette observation, des liens entre nicotine, récepteur nicotinique et maladie d'Alzheimer ayant été décrits. Cependant, de nombreuses difficultés méthodologiques imposent la prudence dans les conclusions.

Pour ce facteur, qui est prédictif de mortalité, l'emploi du terme " protecteur " doit rester très réservé [416].

4.6.4.1.2. Alcool

Dans cette étude, 4 malades (6.3%) seulement était des consommateurs d'alcool contre 93.7% qui n'ont jamais consommait. Nos résultats ne semblent pas concorder avec plusieurs études qui trouvent que des consommations modérées d'alcool sont reconnues comme protectrices contre la maladie d'Alzheimer.

Un tel effet été mis en évidence pour les démences et la maladie d'Alzheimer dans l'étude PAQUID. Une consommation modérée de vin (2 à 4 verres de vin par jour) est associée à un risque moindre [417].

Les données de l'étude Paquid ont été analysées une seconde fois par un épidémiologiste américain reconnu [418] en tenant compte de tous les facteurs d'ajustement possibles inclus dans les données de la cohorte, en particulier les performances cognitives initiales, ainsi que de la technique d'échantillonnage : les résultats se sont révélés identiques.

Dans une autre population française de 60 à 70 ans (étude EVA), dont les sujets sont indemnes de toute démence, une consommation modérée d'alcool est associée à de meilleures performances cognitives, uniquement dans la population féminine [419].

Ces résultats ont été confirmés par la cohorte de Rotterdam, et il semble que ce soit non la consommation de vin mais plutôt celle d'alcool qui intervienne [420].

Dans d'autres études comme celle des chercheurs du Mount Sinai Hôpital de Miami Beach (États-Unis) qui se sont penchés sur 938 personnes de plus de 60 ans chez qui venait d'être diagnostiquée une probable maladie d'Alzheimer. Ils ont ensuite interrogé la famille

(conjoint, enfants) pour évaluer la consommation de tabac et d'alcool au cours de la vie. Ils ont ainsi pu observer que les buveurs réguliers (au moins trois verres par jour) souffraient d'une maladie d'Alzheimer en moyenne 4,8 ans plus tôt que ceux qui ne buvaient pas ou peu. De même les gros fumeurs (plus d'un paquet de cigarettes par jour) étaient atteints de la maladie 2,3 ans plus tôt que les non-fumeurs. Pour ceux qui avaient l'allèle e4 apolipoprotéine E, la maladie commençait 3 ans avant les autres [421].

Quant à ceux à la fois, fumeurs, buveurs, et porteurs de l'allèle e4, ils développaient la maladie 8,5 ans plus tôt que ceux qui échappaient à ces trois facteurs de risque. Les personnes qui étaient dans le premier cas de figure ont été atteintes d'Alzheimer à 68,5 ans, contre 77 ans pour les seconds [421].

Selon plusieurs auteurs la consommation d'alcool, aiguë ou chronique, interfère avec le fonctionnement cérébral. En dehors des états confusionnels liés aux intoxications aiguës ou au sevrage, l'intoxication éthylique chronique est responsable de nombreux syndromes neuropsychiatriques : déficits cognitifs d'intensité variable pouvant réaliser un tableau démentiel, encéphalopathie de Wernicke, syndrome de Korsakoff, maladie de Marchiafava Bignami et atrophie cérébelleuse [422].

Quoiqu'il en soit, ces études d'observation ne permettent pas de conclure formellement à un lien de causalité.

4.6.4.2. Le diabète

Notre étude révèle que 28.5 % des malades sont diabétiques.

Tableau XIX: fréquence du diabète chez les malades et les témoins.

	MA		Témoins		p
	n	%	n	%	
DNID	18	28.5	15	12	< 1%

Des études épidémiologiques et immunohistochimiques attirent l'attention sur la contribution des glucides à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Ainsi Plusieurs études convergent pour démontrer que le diabète accroît le risque de développer une maladie d'Alzheimer.

Des produits terminaux de glycation ont été détectés dans les plaques séniles extracellulaires qui contiennent des agrégats de protéines amyloïdes et dans les enchevêtrements neurofibrillaires à l'intérieur du cytoplasme des neurones [199].

Dans la Rotterdam Study qui a porté sur plus de 6 000 personnes âgées de 55 à 99 ans, [420], Le DNID double pratiquement le risque de maladie d'Alzheimer.

La Honolulu-Asia Aging Study a également mis en évidence que le diabète était associé à la maladie d'Alzheimer et que cette association était particulièrement forte avec les patients porteurs de l'allèle e4 de l'apolipoprotéine E [188].

Jusqu'à présent, il n'a pas été mis clairement en évidence que les traitements du diabète puissent diminuer l'incidence de la maladie d'Alzheimer. Deux études d'intervention ont néanmoins suggéré qu'une prise en charge optimale de la glycémie pouvait améliorer les fonctions cognitives de patients diabétiques [423].

Notre étude retrouve une différence significative indiquant une relation probable entre DNID et MA.

4.6.4.3. L'hypertension artérielle (HTA)

Parmi nos 63 malades (41.3 %) sont hypertendus.

Tableau XX : fréquence de l'HTA chez les malades et les témoins.

	MA		Témoins		p
	n	%	n	%	
HTA+	26	41.3	39	31.5	ns

Cette relation entre l'efficacité cognitive et les valeurs de pression artérielle ont fait l'objet de nombreux travaux.

Notre étude montre que l'HTA est plus fréquente chez les malades, cependant il n'existe pas de différence significative.

Une étude récente menée chez 700 sujets âgés présentant déjà une maladie d'Alzheimer indique une aggravation plus importante des troubles cognitifs chez les hypertendus que chez les normo-tendus (Odds ratio = 1,6, IC 95 % = 1,0-2,7) [424].

Les études longitudinales sont les plus informatives puisqu'elles étudient le retentissement de l'hypertension chronique sur les fonctions cognitives. Leurs résultats sont concordants et la plupart d'entre elles indiquent un lien entre l'hypertension et l'altération cognitive. En particulier, l'hypertension à l'âge moyen de la vie est un paramètre fortement prédictif d'une détérioration cognitive ultérieure.

Ainsi, plus la pression artérielle initiale est élevée, moins bon est le fonctionnement cognitif ultérieur.

Dans l'étude de Framingham [424], les fonctions cognitives sont corrélées de façon négative aux valeurs initiales de pression artérielle systolique et diastolique mesurées 12 à 14 ans plus tôt.

La *Honolulu-Asia Aging Study* [425] retrouve une augmentation significative du déclin cognitif après 25 ans de suivi (RR = 2,45, IC 95 % = 1,42-4,25) chez les hypertendus en comparaison aux normo-tendus.

Des données similaires ont été notées dans la cohorte d'Uppsala [426] : les fonctions cognitives évaluées à l'âge de 70 ans sont moins bonnes chez les patients dont les pressions artérielles sont élevées à l'âge de 50 ans.

En France, l'étude EVA [427] a montré un risque de déclin cognitif augmenté par 2,8 (IC 95 % = 1,6-5,0) chez des hypertendus âgés au terme d'un suivi de seulement 4 ans.

Un travail récent portant sur une analyse de 10963 sujets de la cohorte ARIC [428] a retrouvé la même corrélation entre la présence d'une hypertension artérielle et la survenue d'une altération cognitive 6 ans plus tard.

L'hypertension expose non seulement au risque de déclin cognitif, mais aussi au risque de démence toutes causes confondues. Une relation est retrouvée entre la pression artérielle mesurée à l'âge de 70 ans et l'incidence de la démence (vasculaire ou Alzheimer) 9 à 15 ans plus tard [312].

Ainsi, les valeurs de pression artérielle à l'âge de 70 ans sont plus élevées chez les patients qui vont développer une démence entre 79 et 85 ans, en comparaison à ceux qui ne développent pas de démence. Plusieurs autres travaux ont démontré une augmentation du risque de démence chez les hypertendus en comparaison aux normo-tendus.

Une récente étude franco australienne suivant 1241 sujets âgés hypertendus, a montré que le traitement antihypertenseur était associé à un risque plus faible de MA (OR- 0,58 ; IC 95% 0,42-0,81). Les inhibiteurs calciques notamment étaient associés à une diminution du risque d'apparition d'une MA [429]. Dans notre étude (41.3%) de nos malades sont hypertendus, ce résultat nous permet de suggérer une corrélation entre HTA et la MA.

4.6.4.4. L'obésité

Notre étude ne montre pas de lien entre l'obésité et la maladie d'Alzheimer

Tableau XXI : fréquence de l'obésité chez les malades et les témoins.

	MA		Témoins		p
	n	%	n	%	
< 25	33	52.4	78	62.9	ns
<Surpoids	20	31.7	28	22.6	ns
Obésité	10	15.9	18	14.5	ns

Cependant, à l'occasion de la Conférence Internationale de l'Association Alzheimer sur la Maladie d'Alzheimer (AAICAD) qui s'est déroulée à Honolulu, des chercheurs de l'Institut Karolinska ont présenté leur recherche sur le gène FTO (Fat Mass and Obesity associated), associé à l'obésité simple et morbide, et son implication dans la contraction de la maladie d'Alzheimer et de la démence. Selon leurs études, le risque augmenterait avec la présence de ce premier gène et d'un second appelé APOE (Apolipoprotéine E) déjà connu pour son rôle dans la maladie [430].

Le gène FTO affecte l'indice de masse corporelle, le niveau de leptine, parfois appelée "hormone de la faim" ainsi que le taux de diabète. Ces facteurs de risque cardiovasculaire sont aussi associés à la maladie d'Alzheimer.

Les chercheurs ont suivi 1003 personnes âgées de plus de 75 ans pendant 9 ans en ayant pris soin de relever la présence ou non des deux gènes FTO et APOE et la corrélation est importante. Cependant, l'un des points encore non éclaircis repose sur l'indépendance des deux risques. Le mécanisme qui associe le gène FTO à la maladie d'Alzheimer et à la démence peut être différent de son implication dans l'obésité, rapporte Caroline Graff de l'Institut Karolinska.

Ces premiers résultats, qualifiés de "fascinants" par Maria Carrillo, directrice des relations scientifiques et médicales à l'Association Alzheimer, requièrent cependant la confirmation d'autres chercheurs pour être validés.

4.7. Etude du Profil lipidique

Le tableau montre la différence des moyennes des différents paramètres lipidiques entre le groupe MA et la population témoin dans les deux sexes séparément.

On retrouve une différence significative pour le cholestérol et le cholestérol LDL chez les hommes tandis que pour le cholestérol HDL la différence est présente dans les deux sexes.

Tableau XXII : Comparaison des Moyennes des paramètres lipidiques (mg/dl) dans l'Alzheimer et Chez les témoins

	Hommes		Femmes	
	Témoins	MA	Témoins	MA
Chol	175 ± 37	191 ± 37*	182 ± 39	187 ± 39
TG	117 ± 57	129 ± 72	119 ± 67	122 ± 37
C-HDL	44 ± 07	37 ± 08*	47 ± 08	42 ± 08*
C-LDL	110 ± 32	122 ± 29*	115 ± 34	114 ± 34

* : p<0.05

Le lien entre marqueurs biologiques du métabolisme lipidique et risque de maladie d'Alzheimer est controversé.

Pendant les 15 dernières années, plusieurs études épidémiologiques suggèrent que des taux élevés de cholestérol plasmatique peuvent contribuer dans la pathogenèse de la MA, ainsi, les individus ayant des taux élevés de cholestérol plasmatique, sont plus susceptible de développer une MA.

Le profil lipidique générale des malades de notre étude concorde avec celui de plusieurs études, dans lesquelles les patients MA ont des taux élevés de cholestérol plasmatique total, et du cholestérol-LDL [391], avec de bas niveaux d'HDL [431], en comparaison avec des témoins du même âge.

Ce profil métabolique (des taux élevés de cholestérol plasmatique et du cholestérol LDL, et des taux bas du cholestérol HDL) est communément trouvé chez les patients atteints d'athérosclérose [431].

4.7.1. Le cholestérol

Nos résultats montre une augmentation modeste du taux de cholestérol chez les hommes malades par rapport aux témoins, on remarque qu'il y a une différence significative (p<0.05) chez les hommes alors qu'on ne retrouve pas cette différence chez les femmes.

L'association entre le taux de cholestérol total et la MA reste incertaine et demeure un sujet de controverse, elle est faible dans certaines études et n'est pas évidente dans d'autres. De ce fait nos résultats sont compatibles avec certaines données bibliographiques et ne le sont pas avec d'autres.

L'apolipoprotéine E, allèle epsilon 4, qui intervient dans le métabolisme du cholestérol, est identifiée depuis longtemps comme un facteur de risque génétique de la

maladie d'Alzheimer. Kivipelto et al., dans une cohorte finlandaise, ont constaté que l'ApoE4 était un facteur de risque indépendant de la maladie d'Alzheimer (MA), même après ajustement des facteurs de risques vasculaires (OR 2,3 ; IC 95%: 1,1- 4,1). Ils ont mis en évidence que l'allèle E4 de l'apolipoprotéine E, un taux élevé de cholestérol à l'âge mûr et une pression systolique élevée étaient des facteurs de risque indépendants de MA [379]. Une étude a montré que parmi les porteurs du phénotype E4, la consommation, même modérée, de graisses saturées à l'âge mûr pouvait augmenter le risque d'apparition d'une MA et qu'une prise en charge diététique pouvait modifier ce risque [432].

Des taux élevés de cholestérol ont été associés à l'augmentation du risque de MA dans différentes études prospectives et cas témoins.

Ainsi la légère augmentation du cholestérol total que nous avons retrouvé et compatible avec plusieurs études, dont celle de Marwan et col, qui ont étudié le profil lipidique chez 167 malade MA et 27 témoins non déments, le profil été caractérisé par une augmentation légère du cholestérol total, des LDL et des TG [433].

Une autre étude récente réalisée en 2006 par K. Hall et col ; sur une population nigérienne, a retrouvé qu'une augmentation des taux du cholestérol total et des LDL était associé à l'augmentation du risque de l'MA indépendamment du polymorphisme de l'ApoE [434].

Une étude de Lesser en 2001 sur une cohorte de personnes d'âge très avancé résident à une maison de retraite académique, suivit pendant une période de 7 ans et demi, et autopsié après leurs décès, les personnes avec les taux les plus élevés de cholestérol présentaient un diagnostic positive de MA certaine en post-mortem [435].

La plupart des autres études qui ont associé le CT à la MA, ont constaté que c'était plutôt les taux élevés du CT pendant l'âge moyen et mûr de la vie qui augmentait le risque de développement de la MA ultérieurement.

Ainsi dans une enquête récente, qui s'est penchée sur 9752 hommes et femmes qui ont bénéficié d'un bilan de santé entre 1964 et 1973, à l'âge de 40-45 ans et ont ensuite été suivis jusqu'en 1994, 504 personnes de ce groupe ont été touchés par la maladie d'Alzheimer et 162 d'une démence vasculaire. Les résultats montrent que ceux ayant eu en milieu de vie, les taux les plus élevés de cholestérol ont 50 % de risque en plus d'être atteint en vieillissant de la maladie d'Alzheimer par rapport à ceux ayant le taux le plus faible [436].

Une autre étude finlandaise rétrospective a retrouvée cette association entre les taux élevés de TC à l'âge mûr et l'augmentation du risque de MA à un âge plus avancé [437].

Les concentrations plasmatiques élevées de cholestérol ne sont associées que de façon inconstante au risque d'apparition d'une démence et de la MA [438].

Une méta-analyse récente de sept études épidémiologiques a montré que la prise d'hypolipémiants, considérés de façon globale quelle que soit la nature pharmacologique de la molécule, n'était pas significativement associée à une diminution du risque d'apparition d'une démence [439, 440]. De plus, il a été suggéré que la réduction du cholestérol plasmatique, par régime et/ou médicament hypolipémiant, était associée à des troubles psychologiques tels que la dépression ou l'agressivité, pouvant altérer les performances cognitives [441]. En revanche, la prise de statines représente un facteur protecteur significatif vis-à-vis du risque d'apparition d'une démence $RR = 0,43$ [IC95 % 0,31–0,62] [412].

Deux études observationnelles ont rapporté un effet protecteur des statines sur l'incidence de la MA. L'une était une analyse transversale [412], et l'autre une étude de type cas-témoin nichée dans une cohorte. Les statines modifient le métabolisme du cholestérol et diminuent également le taux de A bêta (peptide bêta amyloïde) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Une étude allemande randomisée, contre placebo, a évalué l'effet d'une prise quotidienne de 80 mg de simvastatine sur 26 semaines chez des patients atteints de MA. Elle a mis en évidence une diminution significative du taux de A-béta 40 dans le LCR des patients atteints d'une MA à un stade modérée. Cette réduction de l'Abéta était corrélée à la diminution de 24S hydroxycholestérol. Ces modifications n'étaient pas retrouvées chez les patients aux stades plus sévères de la maladie [412].

Cette association entre l'hypercholestérolémie et la MA, n'a pas été retrouvée dans l'étude cohorte de Framingham en 2003 [442] et par la Honolulu – Asia Aging Study [443].

En même temps, des études complètement contradictoires de celle qui vient d'être citée trouvent que des taux élevés de cholestérol étaient associés à une réduction du risque de la MA.

Les données de la ILSA « the Italian Longitudinal Study on Aging », qui a étudié une population de 2963 déments aucune association entre le cholestérol et la progression vers la démence n'a été trouvée. Néanmoins dans cette étude multivariée, des niveaux élevés d'éducation et des taux élevés de cholestérol paraient avoir un effet protecteur [437]. Ces résultats étaient confirmés par de nombreuses autres études prospectives, dans lesquelles une association inverse mais légèrement significative été retrouvé, indépendamment du génotype de l'ApoE [444].

Ainsi une étude de cohorte prospective et randomisée menée sur 4316 participants de plus de 65 ans des taux élevés de cholestérol total étaient associés à la diminution de l'incidence de MA après ajustement du génotype de l'apoE et les facteurs cardiovasculaires [441].

Une autre étude de cohorte de Mielke et col (2005), a trouvé qu'une augmentation des taux de cholestérol à 70, 75 et 79 ans était associée avec une réduction du risque de démence entre 79 et 88 ans, ainsi des taux élevés de cholestérol à l'âge avancé étaient associés avec la réduction du risque de démence [445].

Il y a quelques pistes épidémiologiques mais cependant peu de preuves cliniques sur le fait qu'un taux sanguin de cholestérol bas puisse retarder l'apparition d'une MA.

Mais d'après ces quatre dernières études il est probable que des taux élevés de cholestérol puissent avoir un rôle protecteur contre les démences et les DCL, alors que la plupart des études expérimentales montrent que des taux élevés de cholestérol accélèrent la production de l'A β dans MA en modifiant le métabolisme de l'APP et en favorisant son clivage par la bêta sécrétase [446].

Il paraît improbable que les mécanismes associés à la protection contre le déclin cognitif soit en relation avec la cascade amyloïde.

En effet le cholestérol est une molécule essentielle pour plusieurs processus biologiques ainsi elle peut avoir plusieurs effets bénéfiques comme son rôle de précurseur des hormones stéroïdiennes (œstrogènes, androgènes et vitamine D) et de maintien de l'intégrité structurale et la modulation de la fluidité des membranes cellulaires, ainsi qu'il est un élément essentiel pour le maintien de l'intégrité synaptique et la neurotransmission [447]. Tous ces processus sont compromis avec l'âge, et il a été montré qu'ils sont perturbés pendant la MA. De plus, les études *in vitro* ont suggéré que le cholestérol agit comme un antioxydant ainsi il peut avoir un effet protecteur pendant la pathogenèse des démences [448], probablement en captant les pro-oxydants pour créer l'oxystérols, qui sont moins toxiques que les radicaux libres.

4.7.2. Le cholestérol HDL

Notre étude montre une légère diminution des taux du cholestérol HDL ($p < 0.05$) chez les malades, dans les deux sexes, par rapport aux témoins.

Nos résultats sont en accord avec plusieurs études, comme celle de Merched et col, qui ont noté que la diminution des HDL sériques était corrélée avec la sévérité de la MA, et que des taux élevés de cholestérol HDL étaient associés à une diminution significative du risque de démence, ces résultats ont été confirmés par l'étude PAQUID en France [449].

Dans une autre étude de Henrike Wolf, en étudiant des patients de 75-85 ans, des taux bas de cholestérol HDL ont été fortement associés à une atrophie globale et hippocampique, et un plus grand risque de démence, indépendamment des lésions cérébrovasculaires. Ces résultats reflètent le rôle central des HDL comme des transporteurs des lipides dans le cerveau. Des taux sériques élevés peuvent paraître protecteurs contre la démence et la MA [450].

Nos résultats tendent à confirmer celle de plusieurs autres études épidémiologiques, montrant une association entre des taux bas de cholestérol HDL et MA. Mais Les rapports associant l'HDL au risque de MA sont inconstant.

Ainsi Dans une large étude prospective de cohorte de G. Li et col, les taux de cholestérol étaient obtenus pendant une période de 5 ans avant l'apparition des démences, les résultats ont confirmé une importante association entre des taux élevés de TC et d'HDL à l'âge mûr et l'apparition d'une démence ou une MA [451].

L'étude de Honolulu (Asia Aging Study) [443] a montré que des taux élevés de C-HDL à l'âge moyen entre (45 à 60 ans) ou à l'âge mûr, était associé à l'augmentation de la densité des plaques neutritiques et des dégénérescences neurofibrillaires chez des hommes américano-asiatiques.

Une étude de Sabbagh et col de 2004, qui ont examiné le profil lipidique de 153 sujets MA, a montré qu'une augmentation significative des taux de C-HDL, et des taux plus bas de TG et de TC été significativement associé à la MA [452].

4.7.3. Le cholestérol LDL

Nos résultats montrent une légère augmentation des taux du cholestérol-LDL $p < 0.05$ par rapport aux témoins et uniquement chez les hommes.

Le rôle et la relation entre les taux d'LDL et la MA non pas était parfaitement clarifié, plusieurs groupes ont montré qu'une augmentation des LDL était associée à l'augmentation du risque de MA. D'autres ont obtenue des résultats variables.

Ainsi nos résultats sont en accord avec plusieurs études, comme celle de Yu-Min Kuo qui, dans une analyse du profil lipidique, et du polymorphisme de l'apoE de 64 malades MA confirmé par le diagnostic de certitude en post mortem, et 36 contrôles, les individus avaient des taux significativement élevés de C-LDL ($P < 0.006$), comparé au contrôles. Cette association été indépendante du génotype de l'apoE.

L'étude de Silverman qui a étudié 226 résidents d'une maison de retraite, l'analyse a trouvée que les sujets MA avait des taux significativement plus élevés de C-LDL $p < 0.05$ par

rapport au sujets présentant d'autres types de démences, et par rapport au sujets non déments [453].

Plusieurs autres travaux ont confirmé que des taux élevés de C-LDL étaient associés à l'augmentation du risque de MA comme celle de Lehtonen and Luutonen [454]. Lesser et al 2001[435].

Une étude de Romas et al. 1999 [455] rétrospective de 2 ans, ne retrouve pas d'association entre LDL, HDL et MA. Une autre étude rétrospective de 7 ans ne retrouve pas aussi d'association entre des taux de C-LDL et la MA [456, 457].

D'autres études comme celle de Caramelli et al en 1999; Bonarek et col en 2000 n'ont pas trouvé d'association, et deux études additionnelles de Scacchi et al, 1998 Czyzewski et col 2001, ont rapporté une association inverse entre le cholestérol LDL et MA, les patients avaient des taux bas de C-LDL comparé aux témoins avec des démences vasculaires et d'autres non déments [436].

4.7.4. Les triglycérides

Dans notre étude aucune différence entre les niveaux des triglycérides plasmatiques n'est observée entre malades et témoins.

Nos résultats concordent avec plusieurs études, comme celle Adunsky et al., 2002; Merched et al., 2000; Reitz et al., 2004; Romas et al., 1999; Suryadevara et al., 2003; Yoshitake et al., 1995) qui ne retrouvent aucune association entre les taux des triglycérides et la MA [436].

Alors que des taux élevés de triglycérides étaient rapportés dans quelques études de patients MA. (Étude de Cankurtaran et col 2005 et Sabbagh et col 2004) [458].

Dans une étude de Kotter l'examen de 75 patients souffrant d'une forme précoce de MA comparé à une population souffrant de démence vasculaire n'a pas trouvé de différence de TC entre MA et les démences. Alors que des taux élevés de triglycérides étaient fortement associés à la démence vasculaire chez les hommes, ces résultats supportent des études ultérieures associant les TG avec les démences vasculaires chez les hommes [459].

Dans une récente étude de Braydon et col de 2006, qui ont mesuré les taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides chez 3 modèles de souris transgéniques présentant la MA, les taux de CT n'étaient pas significativement différents entre les souris sauvages et mutées. Alors qu'une augmentation considérable des VLDL précède la déposition du peptide amyloïde dans deux modèles de ces souris MA présentant des taux élevés de peptide amyloïde sérique [460].

Ainsi La relation entre de profil lipidique et la MA n'est pas encore parfaitement clarifié, les différents groupes de recherche à travers le monde ont obtenues des résultats variables et le plus souvent complètement contradictoires. La fluctuation des résultats peut être due à la difficulté de diagnostic de démence et la variation des moyennes d'âges des différentes cohortes. Le tableau XX résume quelques une de ces études.

Malgré que toutes ces études sont contradictoires, il apparait de plus en plus évident que l'élévation du taux de cholestérol, particulièrement sous sa forme LDL peut augmenter le risque et influencer l'expression de l'MA [461, 462].

Un grand nombre d'études, effectuées sur plusieurs populations à travers le monde ont tenté d'investiguer l'influence du génotype de l'apoE sur le statu lipidique sérique et le risque de la démence, et ont donnés des résultats fluctuants et très controversés.

Notre étude ne retrouve pas une association significative entre le polymorphisme de l'ApoE et la variation du profil lipidique, ce qui peut s'expliquer par la taille réduite de l'échantillon.

Tableau XXIII: Résumé de quelques études associant le profil lipidique et la MA [436, 458 et 461]

Référence	Sujets	diagnostic	Résultats
Jarvik et al. (1995)	206 cas MA 276 témoins	MA	Le début de la MA et plus précoce chez ceux qui sont porteurs de l'allèle e4 et des taux élevée CT.
Kuusisto et al. (1997)	980 personnes âgées de 69 à 78 ans (349 hommes, 631 femmes), De l'ouest de Finlande ; 46 cas MA	MA	Des taux bas de CT était associés à l'augmentation du risque de développement de l'MA ultérieurement Indépendamment du génotype de l'apoE.
Notkola et al. (1998)	444 hommes, de 70–89 ans, Survivant d'une cohorte finlandaise d'étude de 7 pays	Incidence de MA	Des taux élevé de cholestérol pendant le jeune âge ou l'âge mure augmente le risque de développer l'MA pendant un âge plus avancé.
Boston et al. (1999)	222 cas MA 34 VaD	MA	Aucune différence dans les taux de CT n'a été retrouvée.

Romas et al. (1999)	140 témoins 1449 sujets caucasien, afro-américain et Hispanique Residents a new-work Agées 75.8 + 6.4	MA	Des taux bas de CT sont associés avec l'augmentation de l'incidence de l'MA, indépendamment du génotype de l'ApoE.
Evans et al. (2000)	524 sujets Afro-Américains ayant un âge supérieur à 65 ans	Démence	L'augmentation des taux du CT été associé avec l'augmentation du risque de l'MA dans le groupe non porteurs de l'allèle e4. Aucune association n'a été retrouvée chez les porteurs de l'e4.
Kivipelto et al. (2001a)	1449 sujets âgés de 65 à 79 ans	Incidence De démence, de la MA, et de DV	L'augmentation des taux de TC et la pression artérielle pendant l'âge moyen et particulièrement la combinaison de ces deux facteurs augmente le risque de l'MA.
Bonarek et al. (2000)	Etude cas témoin de 334 français âgées tous de plus de 73 ans et qui ont participé l'étude PAQUID 37 cas déments 297 non déments	Incident MA	Aucune augmentation du TC n'a été détectée. Et l'augmentation des taux du HDL-C été associée a une diminution significative du risque de démence indépendamment du risque de l'apoE.
Kalmijn et al. (2000)	3734 (80%) âgés de 71 a 93 ans ayant participé dans une étude de cohorte 8006 personnes d'origine américano-japonaise	MA	Après ajustement du sexe de l'âge du niveau d'éducation, de l'DCL, aucune association n'as été retrouvée entre les taux des TG et du cholestérol totale et la MA.
Kivipelto et al. (2002)	1449 sujets Agés de 65 à 79 ans	Incidence de la MA	Des taux élevée de TC et l'augmentation de la pression artérielle pendant l'âge moyen augmenté le risque de développement de la MA pendant l'âge adulte Indépendamment du statut de l'apoE.

Solfrizzi et al. (2002)	61 cas MA 63 témoins	MA	Des taux bas de TC et les concentrations sérique de l'apolipoprotéine A était fortement associé avec l'augmentation du risque de l'MA indépendamment de l'apoE et du sexe.
Tan et al. (2003)	1026 sujets de l'étude Framingham d'âge moyen de 78.1 + 5.3 ans	Incidence MA	Le CT été pas associé au risque de l'MA
Reitz et al. (2004)	4316 personnes assistées médicalement, âgées plus de 65 ans et résidant au nord de Manhattan, New York	Incidence MA	Des taux élevée de TC était associés a une diminution de l'incidence de l'MA après ajustement de l'apoE et les facteurs vasculaires.
Dufouil et al. (2005)	Une étude de cohorte De 9294 sujets sélectionnés dans trois villes françaises Bordeaux, Dijon, Montpellier	Incidence de la démence de la MA et des DV	Des taux élevée de cholestérol été associée l'augmentation des risque de démence mais de pas de la MA.
Mielke et al. (2005)	Un totale de 392 individus, 166 hommes est 226 femmes de 70 ans résidant à Göteborg in	Incidence de démence	Dans cette étude longitudinal de 18 ans une association entre des taux élevé de cholestérol et la diminution du risque de l'MA été observé.

4.8. Insuline, Cortisol et Homocystéine

Nous retrouvons une augmentation significative ($p < 0.01$) de l'insulinémie ainsi que de l'homocystéine ($p < 0.05$) entre malades et témoins. Par contre on ne retrouve pas de différence significative concernant le cortisol (*tableau XXIV*).

Tableau XXIV : Variations de l'insuline, cortisol, et homocystéine

	Témoins	MA
Insuline ($\mu\text{U/ml}$)	6.85 \pm 6.45	10.1 \pm 13.1**
Cortisol ($\mu\text{g/dl}$)	19.56 \pm 13.6	17.13 \pm 7.35
Homocystéine ($\mu\text{mol/l}$)	17.4 \pm 8.6	23.8 \pm 10.2*

* $p < 5\%$, ** $p < 1\%$

❑ **Insuline et maladie d'Alzheimer**

L'augmentation de l'insulinémie est en accord avec les publications récentes dans ce domaine d'investigation.

Plusieurs études basées sur la population ont mis en évidence un lien entre le diabète de type 2 et une augmentation du risque de développer une démence, tant la maladie d'Alzheimer que la démence vasculaire. L'une des études a constaté un risque plus grand pour les personnes atteintes de diabète de type 2 insulino-dépendantes par rapport à celles qui utilisaient des hypoglycémifiants oraux ; ces deux derniers groupes étaient exposés à un risque plus élevé de MA par rapport aux personnes non atteintes de diabète [186]. Alors que, dans un premier temps, le lien entre le diabète de type 2 et la démence vasculaire semblait être plus uniforme que la relation entre le diabète de type 2 et l'Alzheimer [463], une étude récente a révélé des données plus nettes pour le diabète et l'Alzheimer 'pur' [464].

Toutefois, lors du diagnostic, il est difficile de distinguer la démence vasculaire de l'Alzheimer *in vivo*. Les données scientifiques suggèrent également qu'une mutation du gène ApoE, l'allèle $\epsilon 4$ d'ApoE, le principal facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer, pourrait avoir un impact plus fort sur le risque de démence chez les personnes atteintes de diabète. En effet, les conclusions d'études basées sur la population indiquent que les personnes atteintes de diabète et porteuses de l'ApoE 4 sont les plus susceptibles de développer la maladie d'Alzheimer par rapport aux personnes non atteintes de diabète et non porteuses de l'ApoE 4 [465].

Toujours dans le même contexte une étude menée par Fumiko et al (2008), suggèrent qu'avoir le diabète et l'allèle d'APOE $\epsilon 4$ augmente le risque pour la MA dans une large mesure que si chaque facteur contribuait au risque d'une manière additive. De même, le risque pour les MA a augmenté dans ceux avec le diabète et l'APOE $\epsilon 4$, mais ce risque a été légèrement atténué après ajustement des facteurs de risque cardiovasculaires, race blanche, et sexe masculin [466].

Une association positive entre le diabète et le risque de la MA a été rapportée par Luchsinger et Mayeux [467], un rapport récent de l'étude de Framingham a trouvé l'association seulement dans les sous-groupes spécifiques incluant que les hommes, ceux avec une tension artérielle systolique plus élevée, et possédant également APOE $\epsilon 4$ [468]. APOE $\epsilon 4$ a été montré, dans diverses cohortes, de modifier l'association des facteurs de risque cardiovasculaires de la démence ou du déclin cognitif [308, 469, 470]. Dans un rapport précédent de la cohorte CHS, Haan et al [470] ont montré qu'une interaction significative entre APOE $\epsilon 4$ et le diabète augmenté le taux du déclin cognitif mesuré par le MMSE modifié. L'hypertension est un autre

facteur de risque vasculaire important dans les maladies cardiovasculaires, telle que la démence, les lésions de la substance blanche, et atrophie de l'hippocampe [312, 313, 471, 472, 473]. L'hypertension contribue également dans la modification de l'association du diabète avec le déclin cognitif [474], l'atrophie cérébral [475], et la démence [472].

Les modèles animaux de 'diabète induit' suggèrent un effet neurodégénératif direct du diabète. La plupart des études montrent des résultats sur l'hippocampe – la zone associée à l'apprentissage et à la mémoire et la première structure affectée par la neurodégénérescence de la maladie d'Alzheimer. Une étude post-mortem a constaté que les personnes atteintes de diabète, et en particulier les personnes atteintes de diabète porteuses de l'ApoE 4, étaient plus sujettes aux plaques dans la région hippocampique, à la dégénérescence neurofibrillaire dans le cortex et dans l'hippocampe et qu'elles étaient plus exposées au risque d'angiopathie amyloïde cérébrale [188] – qui se caractérise par un dépôt de la protéine associée à l'Alzheimer sur les parois des vaisseaux sanguins du cerveau. Une étude récente impliquant plus de 1000 personnes a révélé que les personnes atteintes de diabète étaient plus exposées à l'atrophie corticale, indépendamment de l'hypertension, du cholestérol total, du tabagisme, de l'IMC, de la maladie coronarienne et des facteurs sociodémographiques que les personnes non atteintes de la condition [189].

Il est intéressant de souligner que l'on a récemment découvert que l'obésité abdominale était davantage associée au risque de démence que l'obésité totale [476]. Même chez les personnes qui affichent un poids sain, l'obésité abdominale augmente le risque de démence. Récemment, une étude de cohorte à grande échelle, qui s'est penchée sur l'obésité en milieu de vie, a révélé des résultats similaires en termes de risque de démence et de maladie d'Alzheimer [477].

Un modèle expliquant les liens potentiels entre insulino-résistance, hyperinsulinémie et genèse de la MA a récemment été proposé par l'équipe de Craft [478]. Cette hypothèse ne s'applique pas forcément à tous les patients atteints de MA. Les conditions favorisantes que sont l'hyperinsulinisme et l'insulino-résistance se potentialisent et se renforcent mutuellement.

Le mérite d'un article récent de Farris et al, paru en (2003), d'apporter de nouvelles données passionnantes sur le rôle de l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) (insulisine) [479]. Il apparaît donc possible qu'un déficit en insulisine peut contribuer à l'apparition de certaines formes de la maladie d'Alzheimer. D'ailleurs, certaines études épidémiologiques (mais pas toutes) ont montré que les patients atteints de diabète de type 2 avaient un risque plus élevé de développer une maladie d'Alzheimer indépendamment de

tout facteur vasculaire. Ces affections sont sans doute multigéniques et un hypofonctionnement de l'IDE pourrait n'être qu'un facteur de risque parmi d'autres. Mais l'association entre IDE et maladie d'Alzheimer est intéressante quand on pense au rôle maintenant bien démontré, au moins chez les rongeurs, des signaux insuliniques ou « insuline-like » sur le vieillissement [480]. C'est ainsi que des souris femelles, mais non mâles, dont le gène du récepteur de l'IGF1 a été invalidé, vivent un tiers plus longtemps que les souris sauvages. De même, la longévité des souris est augmentée de 18 % par l'invalidation du récepteur de l'insuline spécifiquement dans le tissu adipeux.

❑ **Cortisol et maladie d'Alzheimer**

Notre étude ne trouve pas de relation entre la MA et le taux de cortisol (*tableau XXIV*). Une étude récente de Chehab et al. (2007), sur le statut hormonal du cortisol et du sulfate de déhydroépiandrostérone chez une population tunisienne âgée, qui a étudiée l'association entre cortisol et DHEA-S, d'une part, et l'âge, le sexe, le style de vie, l'état de santé, comprenant l'indice de masse corporelle (IMC), l'activité physique et les indicateurs de tabagisme, d'autre part. Dans cette population qui se rapproche de la nôtre, ils ont observé que les concentrations en cortisol n'ont pas changé avec le vieillissement. Néanmoins, les concentrations du DHEA-S diminuent avec l'âge chez les deux sexes. Cependant, le rapport cortisol/DHEA-S augmente avec le vieillissement. Leurs résultats ont indiqué que les niveaux du DHEA-S ne sont affectés, ni par l'activité physique, ni par le poids. Il s'avère également que le tabagisme pourrait ne pas affecter le niveau du DHEA-S. Des corrélations ont été trouvées entre DHEA-S et IMC, puis entre DHEA-S et cholestérol, triglycérides et calcium. Dans leur population, le vieillissement est associé à un niveau stable du cortisol et un niveau diminué du DHEA-S. Cependant, un rapport cortisol/DHEA-S élevé accélère l'occurrence de maladies telle que le diabète, l'athérosclérose, la démence et l'ostéoporose. Généralement, l'insuffisance adrénaline, marquée par un affaiblissement cognitif, des désordres immunitaires, un dysfonctionnement sexuel et une dépression, peut être corrigée par un remplacement du DHEA-S [481].

Dans une autre étude, les auteurs ont montré que les niveaux de cortisol ne sont pas liés à l'âge mais sont associés à la présence de la démence. Réciproquement, les niveaux de DHEAS sont liés à l'âge, et ne sont pas associés à la présence de la démence [482]. Des concentrations du cortisol et de l'ACTH ont été décrites pour être altérées avec l'âge [483] et dans la MA [484].

Le cortisol et le DHEAS influence les processus relatifs à l'âge du métabolisme énergétique, de la distribution des dépôts lipidiques, de la fonction immunitaire, de la neurodégénérescence et peuvent jouer un rôle important dans le vieillissement humain [485].

Leblhuber et al, (1993), ont montré qu'il se produit chez les sujets normaux une corrélation négative de DHEAS par rapport à l'âge, alors qu'aucune diminution significative du taux du cortisol plasmatique n'a été détectée [486]. D'autres études ont montré que les niveaux de cortisol et ACTH sont très élevés chez les sujets âgés, alors que d'autres révèlent une rupture de l'axe *hypothalamo*-hypophyso-surrénalien présent dans le syndrome démentiel [487]. Des études précédentes ont montré une relation entre un rapport élevé de cortisol/DHEAS et les altérations cognitives [485]. Rudman et al. (1990) ont montré un intervalle normal de DHEAS plasmatique pour une communauté indépendante d'hommes de plus de 60ans, et des niveaux bas ou inférieurs à la normale dans des résidents d'une maison de repos [488]. Cette différence peut être attribuée au manque d'activité physique dans les communautés en maison, et il est important de noter qu'un taux de mortalité élevé a été associé à des niveaux bas de DHEAS [489].

❑ Homocystéine et maladie d'Alzheimer

Notre étude retrouve une augmentation de l'homocystéine (tHcy) chez les malades par rapport aux témoins. Ces résultats corroborent la quasi-totalité des études prospectives réalisées au cours de la dernière décennie. Ils plaident en faveur du caractère indépendant de l'homocystéine en tant que facteur de risque de la maladie d'Alzheimer.

D'autre part, une analyse ayant concerné 2611 sujets (l'étude de Framingham) a montré qu'une augmentation de 5 $\mu\text{mol/l}$, au delà de 13 $\mu\text{mol/l}$, de l'homocystéine plasmatique majore de 40 % le risque d'évolution vers la maladie d'Alzheimer. La même étude a révélé une évolution parallèle entre le risque accru de démence chez les sujets ayant un taux élevé en homocystéine plasmatique et celui de la mortalité cardiovasculaire. Les auteurs ont attribué à ces observations l'existence de liens indirects entre l'hyperhomocystéinémie et la maladie d'Alzheimer. Ces liens seraient, d'une part, l'athérosclérose en tant que facteur de risque de démence, et d'autre part, l'homocystéine responsable d'un effet toxique sur les neurones de l'hippocampe [253].

Beaucoup d'investigateurs ont rapporté des taux plus élevés de tHcy chez les sujets âgés. Kark et al, ont mesuré les taux plasmatiques moyens d'homocystéine dans une population juive habitant à Jérusalem. Parmi les personnes âgées de 75 ans et plus, ces taux étaient de 15.5 et 14.5 $\mu\text{mol/l}$ chez les hommes et les femmes, respectivement [490]. Nygard

et al, [491] ont étudié 16.176 sujets sains, non-institutionnalisés à Hordaland, en Norvège et les taux plasmatiques moyens de tHcy trouvés étaient de 12.9 et 11.6 $\mu\text{mol/l}$ parmi les hommes et les femmes dont l'âge est de 65-67 ans, respectivement. Jacques et al, [492] ont rapporté les taux plasmatiques moyens de tHcy, qui étaient de $13.0 \pm 8.0 \mu\text{mol/l}$ chez les hommes et de $11.4 \pm 6.5 \mu\text{mol/l}$ chez les femmes parmi des sujets en bonne santé, âgées de 70-79 ans participant à la troisième enquête nationale d'examen de santé et de nutrition, Etats-Unis. Clarke et al, [493] dans leur étude cas témoins en Angleterre, a trouvé des taux de tHcy plasmatique de $15.3 \pm 8.4 \mu\text{mol/l}$ chez les 164 patients MA et $13.2 \pm 4.0 \mu\text{mol/l}$ parmi les 108 témoins. Seshadri et al, [253] trouve qu'un taux d'homocystéine plasmatique supérieur à 14 $\mu\text{mol/l}$ est associé à un doublement du risque de la maladie d'Alzheimer. McCaddon et al, [494], trouvent également que le tHcy est significativement plus élevé chez les MA que les témoins. Cependant, Postiglione et al, [495] ne pouvaient pas confirmer ces résultats chez 74 patients MA et 74 témoins en Italie. Aucune association entre le taux plasmatique de tHcy et le risque de MA n'ont été trouvés chez les sujets résidant à Cleveland, USA, même les taux aient été plus élevés, mais pas de manière significative, parmi les patients MA comparés aux témoins [496]. Dans une autre étude à laquelle ont participé 79 patients MA et 156 témoins de trois villages arabes du nord d'Israël, le tHcy était significativement plus élevé chez les patients MA ($20.6 \pm 8.7 \mu\text{mol/l}$) que chez les témoins ($16.4 \pm 6.5 \mu\text{mol/l}$) ($p=0.03$) [497].

Une récente étude Algérienne de Mohamed Makrelouf et al, (2007) sur l'homocystéine et le génotypage de l'apolipoprotéine E, dont les groupes d'étude sont composés de 126 sujets âgés de 33 à 79 ans répartis comme suit: diabète ($n = 24$), dyslipidémie ($n = 23$), lupus érythémateux ($n = 21$), démence de type d'Alzheimer ($n = 19$), thrombose veineuse ($n = 13$), infarctus du myocarde ($n = 9$) et un groupe témoin ($n = 17$) a conclu que l'augmentation de l'homocystéine ne semble pas être influencée par le polymorphisme génétique de l'apolipoprotéine E. Elle constitue ainsi un facteur de risque indépendant dans les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives [498].

CONCLUSION

5. CONCLUSION

Dans ce travail on a étudié le polymorphisme génétique de l'apoE et la MTHFR sur un groupe de 124 témoins d'âge moyen de 67,17 et 63 patients remplissant les critères du diagnostic de M.A probable, d'âge moyen de 73,47.

Le gène de l'apolipoprotéine E constitue le seul facteur de susceptibilité génétique reconnu. Nos fréquences génotypiques et alléliques confirment l'hypothèse d'un effet délétère de l'apoE4 par rapport à l'apoE3, cependant, les effets de l'allèle ϵ 4 ne sont souvent mis en évidence chez l'homme qu'avec un effectif important de patients et les effets demeurent discrets jusqu'à un âge avancé. En revanche le rôle protecteur de cet allèle ϵ 2 dans la maladie n'est pas évident et reste à démontrer.

Le lien fort entre l'allèle epsilon4 de l'APOE et de la maladie d'Alzheimer a amené certains chercheurs à proposer l'utilisation de ce marqueur dans le dépistage de la maladie d'Alzheimer. Le génotype de l'apoE, peut être considéré comme un complément au diagnostic clinique de la MA chez les sujets déments, chez lesquels la découverte d'un allèle epsilon4 a une valeur prédictive positive de 94 à 98 %. Son intérêt est plus grand au début de la maladie d'Alzheimer, lorsque le diagnostic clinique est moins sûr. Dans ce cas, la découverte d'un allèle epsilon4 ajoute au moins 5 à 10 % de sûreté au diagnostic.

La mutation C677T du gène de la MTHFR ne montre aucune différence significative entre les témoins et les MA. Cependant, il y avait une tendance discrète de la présence de l'allèle T de la MTHFR chez les patients MA ajustés à l'effet de l'allèle ϵ 4, mais ne révèle aucune association.

En parallèle à ces deux études génétiques nous avons contribué à l'évaluation de certains paramètres physiologiques et biochimiques comme facteur de risque dans la MA (l'HTA, le diabète, niveau d'étude, les antécédents de traumatismes crâniens, la consommation d'alcool et le tabagisme, etc...).

Ces facteurs de risques ne peuvent en aucun cas être assimilés directement à des causes de la maladie, vu que certains patients ne présentent aucun de ces facteurs.

En attendant la découverte de marqueurs biologiques prédictifs de la survenue de la maladie, une meilleure connaissance de ses facteurs permet de mieux identifier les sujets à risque, qui, dès lors, pourront bénéficier plus précocement des investigations diagnostiques et de la mise en route d'un traitement symptomatique.

La confirmation de liens spécifiques entre déterminants vasculaires et maladie d'Alzheimer permettrait peut-être l'extension de procédures de traitement et de prévention des maladies cardiovasculaires aux démences. Les effets apparemment protecteurs des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des thérapeutiques hormono-substitutives chez la femme nécessitent une attention particulière dans la mesure où ils pourraient, à l'échelle d'une population, réduire l'impact du fléau qui risquent de constituer les démences.

La connaissance des différents facteurs de risque de cette maladie reste donc primordiale dans le but non seulement de mieux comprendre la pathogénie de la maladie mais aussi de la prévenir afin d'en diminuer l'incidence.

En Algérie cette maladie est fréquente aussi bien que partout dans le monde, on estime à 100 000 le nombre de cas de maladie d'Alzheimer. Par contre, la prise en charge mérite d'être améliorée en multipliant les consultations et aussi en formant les praticiens (généralistes ou spécialistes) qui vont permettre un diagnostic plus précoce. Multiplier aussi les structures d'accueil de jour pour ces patients atteints de maladie d'Alzheimer et développer la formation des aidants (parents ou proches) qui auront à prendre en charge ces patients à domicile. Le mouvement associatif peut apporter un plus dans ce domaine.

PERSPECTIVES

Cette étude doit être poursuivie par d'autres études cas témoins et de cohorte en utilisant un plus grand nombre d'échantillons.

Ceci permettra de faire une étude multivariée, absente dans cette étude, qui appréciera davantage la relation entre les différents facteurs de risque.

La relation entre facteurs de risque cardiovasculaire et maladie d'Alzheimer doit être plus approfondie en étudiant les polymorphismes impliqués dans les risques vasculaires (Interleukines, NO-synthases, Paraoxonase, Enzyme de conversion de l'angiotensine etc...)

Les progrès considérables rapportés ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie et des mécanismes moléculaires de la maladie permettront certainement de développer des stratégies diagnostiques.

Le dosage de certains paramètres comme le peptide A β et/ou la protéine Tau doivent faire l'objet d'étude dans notre population.

Les oligomères de peptides A β dans le LCR paraissent représenter le marqueur le plus pertinent. Cependant, un test diagnostique pourra difficilement être utilisé en routine tant qu'il reposera sur une ponction lombaire.

En conséquence, le développement et la validation des ces marqueurs ou de marqueurs dérivés dans le compartiment sanguin ou dans des modèles cellulaires périphériques circulants représente un pré requis incontournable pour l'utilisation plus large de ces paramètres biologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES

- [1]. Bozoki A, Giordani B, Heidebrink JL, Berent S, Foster NL. Mild Cognitive Impairment Predict dementia in non demented elderly patient with memory loss. *Arch Neurol.* 2001; **58**: 411- 416.
- [2]. Brookmeyer R, Gray S, and Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health.* 1998; **88**: 1337 – 1342.
- [3]. Liberopoulos E, Miltiadaous G, Hatzivassiliou M, Ayrton N, Bairaktarie, Cariolou M, Elisa M: Apolipoprotein E polymorphism in northwestern GREECE Frequency and effect on lipid parameters. *Annals of clinical laboratory science.* 2004; **34**: 347-354.
- [4]. Wang J. C., Kwon J. M., Shah P., Morris J. C., and Goate A: Effect of *APOE* genotype and promoter polymorphism on risk of Alzheimer's disease. *Neurology.* 2000; **55**: 1644 – 1649.
- [5]. Lambert J. C., Araria-Goumidi L., Myllykangas L., Ellis C., Wang J. C., Bullido M. J., Harris J. M., Artiga M. J., Hernandez D., Kwon J. M., Frigard B., Petersen R. C., Cumming A. M., Pasquier F., Sastre I., Tienari P. J., Frank A., Sulkava R., Morris J. C., St. Clair D., Mann D. M., Wavrant-DeVrière F., Ezquerra-Trabalón M., Amouyel P., Hardy J., Haltia M., Valdivieso F., Goate A. M., Pérez-Tur J., Lendon C. L., and Chartier-Harlin M. C. Contribution of *APOE* promoter polymorphisms to Alzheimer's disease risk. *Neurology.* 2002; **59**: 59 – 66.
- [6]. Faith M. Harris, Walter J. Brecht, Qin Xu, Ina Tesseur, Lisa Kekonius, Tony Wyss-Coray, Jo Dee Fish, Eliezer Masliah, Paul C. Hopkins, Kimberly Searce-Levie, Karl H. Weisgraber, Lennart Mucke, Robert W. Mahley, and Yadong Huang: Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioural deficits in transgenic mice. *PNAS.* 2003; **100**: 10966-10971.
- [7]. McEwen, B.S: Protective and damaging effects of stress mediators. *New Engl. J. Med.* 1998; **238**: 171–179.
- [8]. Lupien SJ; Schwartz G; Ying Kin NG; Fiocco A; Wan N; Pruessner JC; Meaney MJ; Vasavan Nair N P. The Douglas Hospital Longitudinal Study of Normal and pathological Aging Summary of findings. *Rev Psychiatr Neurosci.* 2005; **30**: 328-334.
- [9]. Sapolsky RM : Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol.* 1999 Sep; **34**(6):721-32.
- [10]. Boushey J, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA.* 1995; **274**: 1049-57.

- [11]. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Eng J Med.* 1998; **338**: 1042-50.
- [12]. Mills JL, McParthin JM, Kirke PN, *et al.* Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet.* 1995; **345**: 114-51.
- [13]. Goddijn-Wessel TAW, Wouters MGAJ, van der Molen EF, *et al.* Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynaecol.* 1996; **66**: 23-9.
- [14]. Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris JC. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril.* 1998; **69**: 152-4.
- [15]. Eskes TKAB. Folates and the fetus. *Eur J Obstet Gynecol.* 1997; **71**: 105-11.
- [16]. Smith AD, Clarke R, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Reland PM. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for histopathologically-confirmed Alzheimer's disease. *Neth J Med.* 1998; **52**: S16.
- [17]. Regland B, Andersson M, Abrahamsson L, Bagby J, Dyrehag LE, Gottfries CG. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumat.* 1997; **26**: 301-7.
- [18]. Ueland PM, Rozen R (eds). MTHFR polymorphisms and disease. Georgetown: *Landes Bioscience/Eurekah.com.* 2005: 210 p.
- [19]. Mudd SH, Uhlenhof BW, Freeman JM, *et al.* Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972; **46**: 905-12.
- [20]. Goyette P, Sumner JS, Milos R, *et al.* Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet.* 1994; **7**: 195-200.
- [21]. Frosst, P., Blom, Hj., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, CA., Matthews, RG., Boers, GJH., den Heijer, M., Kluijtmans, LAJ., van den Heuvel, L & Rozen, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995; **10**: 111-3.
- [22]. Tran P, Leclerc D, Chan M, *et al.* Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome.* 2002; **13**: 483-92.

- [23]. Sifi Y, Ramdane S, Mezahem A, Ramdane M, Sifi K, Abadi N, Benlatreche C, Hamri A. Maladie d'Alzheimer : Expression clinique et facteurs de risques génétiques et environnementaux. Résultats Préliminaires d'une étude longitudinale de population (Nord Constantinois). Communication orale : 2^{ème} journée internationale de psychiatrie – Constantine. Communication orale : journée de psychiatrie de l'hôpital militaire régionale universitaire de Constantine (15 Mai 2005).
- [24]. Hebert LE, Scherr PA, Bienas JL, Bennet DA, Eyans DA: Alzheimer's Disease in the U.S population. Prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*. 2003; **60**: 1119-1122.
- [25]. Geldmacher D. S., Whitehouse P. J: Current Concepts: Evaluation of Dementia. *N Engl J Med*. 1996; **335**:330-336.
- [26]. Kuller LH. Dementia epidemiology research: it is time to modify the focus of research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006 Dec; **61(12)**:1314-8.
- [27]. Chandra V, Pandav R, Dodge HH, Johnston JM, Belle SH, DeKosky ST, Ganguli M. Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study; *Neurology*. 2001; **57(6)**: 985-989.
- [28]. Hendrie HC. Lessons learned from international comparative cross cultural studies on dementia. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2006 Jun; **14(6)**: 480-8.
- [29]. Shadlen MF, Larson EB, Yukawa M. The epidemiology of Alzheimer's disease and vascular dementia in Japanese and African-American populations: the search for etiological clues. ; Department of Medicine, Harborview Medical Center, School of Pharmacy, University of Washington, Seattle, USA. *Neurobiol Aging*. 2000; **21(2)**:171-181.
- [30]. Wancata J, Musalek M, Alexandrowicz R, Krautgartner. Number of dementia sufferers in Europe between the years 2000 and 2050. *M. Eur Psychiatry*. 2003 Oct; **18(6)**: 306-313.
- [31]. Taux de patients belges atteints de la maladie d'Alzheimer [archive] sur Le centre hospitalier chrétien (CHC) [archive]. Consulté le 14 janvier 2006.
- [32]. N° 2454 - Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées au nom de l'Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé [archive] (rapporteuse : Mme Cécile Gallez).
- [33]. Ramarosan H, Helmer C, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Dartigues JF. Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over : Résultats mis à jour du programmes PAQUID cohort] ; PAQUID. ; Unité INSERM 330, Université Victor Segalen Bordeaux II. *Rev Neurol (Paris)*. 2003 Apr; **159(4)**: 405-11.
- [34]. C, Pasquier F, Dartigues JF. Epidemiology of Alzheimer disease and related disorders. *Helmer Med Sci (Paris)*. 2006 Mar; **22(3)**: 288-96.

- [35]. Coudere, A. La recherche de marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer. *Annales de biologie Clinique*. Volume 58, Numéro 5, 581-93, Septembre-Octobre 2000, Revues générales.
- [36]. F, Lebert, F, Pasquier. Signes et symptômes comportementaux et psychologiques de la démence. *Encycl Med Chir (Elsevier Paris) Neurologie*. 1999; **17-057**, A35, 7p.
- [37]. Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé (inpes). Maladie d'Alzheimer : Un outil d'éducation pour la santé du patient ; Dossier de presse. 10 mars 2005.
- [38]. Guériot-Milandre C, Semprez C, Poncet M. Aspects cliniques et diagnostic de la maladie d'Alzheimer. *Médecine Thérapeutique*. 1997; **3**: 343-352.
- [39]. Mc Khann GM, 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.
- [40]. Pasquier F. Early diagnosis of dementia: neuropsychology. *J Neurol*. 1999 Jan; **246**(1): 6-15.
- [41]. Pasquier, F. Bail, L. Lebert, F. Pruvo, J.P. and Petit, H. Determination of medial temporal lobe atrophy in early Alzheimer's disease with computed tomography. *Lancet*. 1994; **343**: 861-862.
- [42]. David S. Geldmacher and Peter J. Whitehouse, Jr. Differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1997; **48**: 2S-9S.
- [43]. Simchowicz, T. Histologische studien uber die senile demenz [Histologic studies of senile dementia]. *Histopathology*. 1910; **4**: 267.
- [44]. Kosik, K. S., Joachim, C. L., and Selkoe, D. J. Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; **83**: 4044-4048.
- [45]. Terry RD, Masliah E, and Salmon DP, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991; **30**: 572-80.
- [46]. Lise Lückner, Frédérique Hovaguimian, Arnaud Naville, Fabienne Groebli. La maladie d'Alzheimer : parcours du combattant. Faculté de Médecine de Genève - Immersion en communauté - Juin 2003.
- [47]. Divry, P. Etude histochimique des plaques séniles. *J Neurol Psychiatry*. 1927; **27**: 643-657.

- [48]. Charles Duyckaerts. Laboratoire de Neuropathologie Escourolle, La Salpêtrière. Maladie d'Alzheimer. Etat des lieux et perspectives. 2006.
- [49]. Allsop, D., Landon, M., and Kidd, M. The isolation and amino acid composition of senile plaque core amyloid. *Brain Res.* 1983; **259**: 348–352.
- [50]. Allsop, D., Landon, M., Kidd, M., Lowe, J. S., Reynolds G. P., and Gardner, A. Monoclonal antibodies raised against a subsequence of senile plaque core protein react with plaque cores, plaque periphery and cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1986; **68**: 252–256.
- [51]. Michel Goedert: Neuronal localization of amyloid beta protein precursor mRNA in normal human brain and in Alzheimer's disease. *The EMBO Journal.* 1987; vol.6 no.12 pp.3627-3632.
- [52]. Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, & Wasco W. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 1996; **3** (3): 159-168.
- [53]. Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, & Bigl V. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol.* 1998; **56** (5): 541-569.
- [54]. LeBlanc AC, Chen HY, Autilio-Gambetti L, & Gambetti P. Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures. *FEBS Lett.* 1991; **292** (1-2): 171-178.
- [55]. Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, & Patel AJ. Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997; **47** (1-2): 147-156.
- [56]. Selkoe DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 1998; **8** (11): 447-453.
- [57]. Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, & Masters CL. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int.* 2000; **36** (3): 175-184.
- [58]. Daigle I & Li C. apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; **90** (24): 12045-12049.
- [59]. van den Hurk WH, Bloemen M, & Martens GJ. Expression of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein APP in *Xenopus laevis*. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001; **97** (1): 13-20.
- [60]. Mileusnic R, Lancashire CL, Johnston AN, & Rose SP. APP is required during an early phase of memory formation. *Eur J Neurosci.* 2000; **12** (12): 4487-4495.

- [61]. Bush AI, Pettingell WH Jr., de Paradis M, Tanzi RE & Wasco W. The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily. *J Biol Chem*. 1994; **269** (43): 26619-26621.
- [62]. 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** (6): 661-669.
- [63]. Mills J & Reiner PB. Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *J Neurochem*. 1999; **72** (2): 443-460.
- [64]. Checler F, Alves da Costa C, Dumanchin-Njock C, Lopez-Perez E, Marambaud P, Paitel E, Petit A, & Vincent B. Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines. *Médecine/Sciences*. 2002; **18** (6-7): 717-724.
- [65]. Vassar R. beta-Secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; **54** (12): 1589-1602.
- [66]. Eckman EA, Eckman CBA. β -degrading enzymes : modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans*. 2005; **33**: 1101-5.
- [67]. Sabrina Florent-Bechard, Ihsen Youssef, Catherine Malaplate-Armand, Violette Koziel, Brigitte Leininger-Muller, Badreddine Kriem, Jean-Luc Olivier, Thierry Oster, Thierry Pillot. Acide docosahexaénoïque et maladie d'Alzheimer : des raisons d'espérer ? *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. Janvier-Février 2007 ; Vol **14**, N°1 : 16-24.
- [68]. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, & Black RA. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*. 1998; **273** (43): 27765-27767.
- [69]. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, & Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; **96** (7): 3922-3927.
- [70]. Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, et al. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. 1995, **269**, 970-973.
- [71]. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning of a novel gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer disease. *Nature*. 1995, **375**, 754-760.
- [72]. Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2002; **110** (10): 1375-1381.

- [73]. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, & Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol.* 2003; **70** (1): 1-32.
- [74]. Dodart JC, Mathis C, & Ungerer A. The beta-amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes. *Rev Neurosci.* 2000; **11** (2-3): 75-93.
- [75]. De Strooper B and Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* 2000; **113** (Pt 11): 1857-1870.
- [76]. Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, & Prochiantz A. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development.* 2004; **131** (9): 2173-2181.
- [77]. Joachim CL, Selkoe DJ. The seminal role of β -amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1992; **6**: 7-34.
- [78]. Lin H, Bhatia R, Lal R. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *Faseb J.* 2001; **15**: 2433-44.
- [79]. Luc Buée and André Delacourte. Tauopathie et maladie d'Alzheimer, un processus dégénératif à part entière. *Psychologie et Neuropsychiatrie du vieillissement.* Décembre 2006. Synthèse. Volume 4, N°4, 261-73.
- [80]. Terry RD. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; **59**: 1118-9.
- [81]. Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; **33**: 95-130.
- [82]. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 2001; **24**: 1121-59.
- [83]. Sergeant N, Delacourte A, Buée L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 2005; **1739**: 179-97.
- [84]. Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Watzet A, Maurage CA, Lebert F, et al. None overlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 2002; **59**: 398-407.
- [85]. Brion JP. Immunological determinants of tau proteins are present in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Arch Biol (Brux).* 1985; **95**: 229-35.

- [86]. Delacourte A, 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**: 173-86.
- [87]. 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**: 519-26.
- [88]. Wei ML, Memmott J, Screatton G, Andreadis A. The splicing determinants of a regulated exon in the axonal MAP tau reside within the exon and in its upstream intron. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000; **80**: 207-18.
- [89]. Rademakers R, Melquist S, Cruts M, Theuns J, Del-Favero J, Poorkaj P, et al. High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet.* 2005; **14**: 3281-92.
- [90]. Van Swieten JC, Rosso SM, van Herpen E, Kamphorst W, Ravid R, Heutink P. Phenotypic variation in frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004; **17**: 261-4.
- [91]. Kiachopoulos, S., A. Bracher, et al. "Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor." *J Biol Chem.* 2005; **280**(10): 9320-9.
- [92]. Bolton, D. C., M. P. McKinley, et al. "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." *Science.* 1982; **218**(4579): 1309-11.
- [93]. Veerhuis, R., R. Boshuizen, et al. "Amyloid associated proteins in Alzheimer's and prion disease." *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; **4**(3): 235-48.
- [94]. Rezaie, P., C. Pontikis, et al. "Expression of cellular prion protein in the frontal and occipital lobe in Alzheimer's disease, diffuse Lewy body disease, and in normal brain: an immunohistochemical study." *J Histochem Cytochem.* 2005; **53**(8): 929-40.
- [95]. Schwarze-Eicker, K., K. Keyvani, et al. "Prion protein (PrPc) promotes beta-amyloid plaque formation." *Neurobiol Aging.* 2005; **26**(8): 1177-82.
- [96]. Zékri, O. Pharmacologie de la maladie d'Alzheimer. 1999; Rennes.
- [97]. Jia, J.P., J.M. Jia, et al. "Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia." *Chin Med J (Engl).* 2004; **117**(8): 1161-4.
- [98]. Selkoe, D. J. "Images in neuroscience. Alzheimer's disease: from genes to pathogenesis." *Am J Psychiatry.* 1997; **154**(9): 1198.

- [99]. Bennett, G., T. Ballard, et al. "Effect of neuropeptides on cognitive function." *Exp Gerontol.* 1997; **32**: 451-469.
- [100]. Shore B, Shore VG. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separations of species differing in protein components. *Biochemistry.* 1973; **12**: 502-7.
- [101]. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (Washington DC)* .1988; **240**: 622–630.
- [102]. Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet.* 1981; **33**: 11-24.
- [103]. Wetterau J. R., Aggerbeck L. P., Rall S. C. Jr., and Weisgraber K. H. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 6240–6248.
- [104]. Weisgraber KH, Mahley RW. Characterization of apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Methods Enzymol.* 1986; **129**: 145-66.
- [105]. Innerarity TL, Friedlander EJ, Rall SC, Weisgraber KH, and Mahley RW. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments. *J. Biol. Chem.* 1983; **258**: 12341-12347.
- [106]. Weisgraber KH, Innerarity TL, Harder KJ, Mahley RW, Milne RW, Marcel YL, and Sparrow JT. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Monoclonal antibody inhibition of binding. *J. Biol. Chem.* 1983; **258**: 12348-12354.
- [107]. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, and Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 22453-22459.
- [108]. 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**: 1817-22.
- [109]. Olaisen, B., P. Teisberg, et al. "The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man." *Hum Genet.* 1982; **62**(3): 233-6.
- [110]. Das SK, Majumder PP, Majumder TK, Haldar B. Studies on vitiligo. II. Familial aggregation and genetics. *Genet Epidemiol.* 1985; **2**: 255–262.
- [111]. Paik, Y. K., D.J. Chang, C.A. Reardon, G.A. Davies, RW. Mahley and J.M. Taylor: Nucleotide sequence and structure of the human apoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1985; **82**:3445.

- [112]. Rousseaux S, Guerber F, Valenti K, Hadjian AJ. Le polymorphisme de l'apoprotéine E: Intérêt, détermination simple par PCR. *Revue Française des laboratoires*, Nov. 1992, N°244 : 89.
- [113]. Utermann G. Genetic polymorphism of apolipoprotein E – impact on plasma lipoprotein metabolism. In: Crepaldi G, Tiengo A, Baggio G, editors. *Diabetes, obesity and hyperlipidemias*. New York: Elsevier, 1985; p1-28.
- [114]. Margolis. Personal Communication. Baltimore, Med., 4/10/1982.
- [115]. Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM et al. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: Implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet*. 2000; **67**: 881-900.
- [116]. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes and phenotypes. *J Lipid Res*. 1982; **23**: 911-4.
- [117]. Utermann G, Steinmetz A, Weber W. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet*. 1982; **60**: 344-51.
- [118]. Ordovas JM, Litwack-Klein L, Wilson PWF, Schaefer MM, Schaefer EJ. Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of apoE1 and apoE5 isoforms. *J Lipid Res*. 1987; **28**: 371-80.
- [119]. Tsuchiya S, Yamanouchi Y, Onuki M et al. Frequencies of apolipoproteins E5 and E7 in apparently healthy Japanese. *J Hum Genet*. 1985; **30**: 271-8.
- [120]. De Knijff P, Van Den Maagdenberg AMJM, Stalenhoef AFH et al. Familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein E3-Leiden in an extended multigeneration pedigree. *J Clin Invest*. 1991; **88**: 643-55.
- [121]. Menzel HJ, Kladetzky RG, Assmann G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Arteriosclerosis*. 1983; **3**: 310-315.
- [122]. Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults. The CARDIA Study. *Coronary Artery Risk development in Young Adults*. *Am J Epidemiol*. 1998; **148**: 859-868.
- [123]. Mastana SS, Calderon R, Pena J, Reddy PH, Papiha SS. Anthropology of the apolipoprotein E apo E gene: low frequency of apo E4 allele in Basques and in tribal Baiga populations of India. *Ann Hum Biol*, 1998; **25**: 137-43.

- [124]. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988 Jan–Feb; **8** (1):1–21.
- [125]. Couderc R, Bailleul S. Apolipoprotein E and its alleles in healthy subjects and in atherosclerosis. *Am Biol Clin (Paris)*.1998; **56**: 651-9.
- [126]. Kamboh MI, Weis KM and Ferred ME. Genetics studies of human apolipoproteins: XVI apoE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of Yucatan peninsula. Mexico. *Clin Genet*. 1991; **29**: 26-32.
- [127]. Gamboa R, Hernandez-Pacheco G, Hesiquio R, Zuniga J, Masso F, Montano LF, Ramos-Kuri M, Estrada J, Granados J, Vargas-Alarcon G. Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum Biol*, 2000; **72**: 975-981.
- [128]. Crews DE, Kamboh MI, Mancilha-Carvalho JJ, Kottke B. Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and H polymorphisms in Yanomami Indians of northwestern Brazil: associations with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism. *Hum Biol*. 1993; **65**: 211-224.
- [129]. Scacchi, R., R.M. Corbo, O. Rickards et al. Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador. *Hum. Biol*. 1997; **69**: 375-382.
- [130]. Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC, *et al*. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*. 1994; **54**: 643-9.
- [131]. Vasanthi Narayanaswami, Samuel S. W. Szeto, and Robert O. Ryan. Lipid Association-induced N- and C-terminal Domain Reorganization in Human Apolipoprotein E3. *The Journal of biological chemistry*. 2001; Vol. 276, No. **41**, Issue of October 12, pp. 37853–37860.
- [132]. Corbo R.M., Scacchi R., Mureddu L., Mulas G., Alfano G. Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. *Ann. Hum. Genet*. 1995; **59**: 197–209.
- [133]. Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Sing CF, Kessling AM, Davignon J. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arterioscler thromb*. 1991; **11**: 1100-10.
- [134]. Chun-Fang Xu CF, Talmud PJ, Angelico F, Del Ben M, Savill J, Humphries E. Apolipoprotein E polymorphism and plasma lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels in Italian children. *Genetic Epidemiology*. 1991; Volume 8, Issue **6**, pages 389–398.
- [135]. Zannis VI, vanderSpek J and Silverman D. Intracellular modifications of human apolipoprotein E. *J. Biol. Chem*. Oct, 1986; Vol. 261, Issue **29**: 13415-13421.

- [136]. Wernette-Hammond ME, Lauer SJ, Corsini A, Walker D, Taylor JM and Rall Jr SC. Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. *J. Biol. Chem.* 1985; Vol. 264, Issue **15**: 9094-9101.
- [137]. Nakai M, Kawamata T, Taniguchi T, Maeda K, Tanaka C. Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia. *Neurosci Lett.* 14 Jun 1996; **211**(1): 41-4.
- [138]. Boyles J K, Pitas R E, Wilson E, Mahley R W, and Taylor J M. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest.* 1985 October; **76**(4): 1501–1513.
- [139]. Metzger, J.O., Mahler, R., Schmidt, A. Electron transfer initiated free radical additions of perfluoroalkyl iodides and diiodides to alkenes. *Liebigs Ann.* 1996; 1851-1854.
- [140]. Ronald B. DeMattos, Robert P. Brendza, John E. Heuser, Malca Kierson, John R. Cirrito, John Fryer, Patrick M. Sullivan, Anne M. Fagan, Xianlin Han and David M. Holtzman. Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochemistry International.* November-December 2001; Volume 39, Issues **5-6**: Pages 415-425.
- [141]. Holtzman D M, Pitas R E, Kilbridge J, Nathan B, Mahley R W, Bu G, and Schwartz A L. 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 October 10; **92**(21): 9480–9484.
- [142]. Narita, Masaaki; Bu, Guojun; Holtzman, David M.; Schwartz, Alan L. The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein, a Multifunctional Apolipoprotein E Receptor, Modulates Hippocampal Neurite Development. *Journal of Neurochemistry.* February 1997; **68**(2):587-595.
- [143]. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS and Goldstein JL. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* Jun 1990; Vol. 265, Issue **18**: 10771-10779.
- [144]. Marques MA, Tolar M, Harmony JA, Crutcher KA. A thrombin cleavage fragment of apolipoprotein E exhibits isoform-specific neurotoxicity. *Neuroreport.* 1996 Nov 4; **7**(15-17): 2529-32.
- [145]. Namba Y., Tomonaga M., Kawasaki H., Otomo E., and Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 1991; **541**: 163–166.
- [146]. Wisniewski T. and Frangione B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci. Lett.* 1992; **135**: 235–238.

- [147]. Schmechel D. E., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Crain B. J., Hulette C. M., Joo S. H., Pericak-Vance M. A., Goldgaber D. and Roses A. D. Increased Amyloid β -Peptide Deposition in Cerebral Cortex as a Consequence of Apolipoprotein E Genotype in Late-Onset Alzheimer Disease. *PNAS* (Oct. 15, 1993); Vol. 90, No. 20: 9649-9653.
- [148]. Beffert and Poirier J. Apolipoprotein E, Plaques, Tangles and Cholinergic Dysfunction in Alzheimer's disease. *Bioartificial Organs: Science, Medicine, and Technology*. January 1996; Volume 777 Page 166-174.
- [149]. Naslund J., Thyberg J., Tjenberg L. O., Wernstedt C., Karlstrom A. R., Bogdanovic N., Gandy S. E., Lannfelt L., Terenius L., and Nordstedt C. Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron*. 1995; 15: 219–228.
- [150]. Wisniewski et al., 1993, Strittmatter W J, and Roses A D. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*. March 1996; Vol. 19: 53-77.
- [151]. Strittmatter W. J., Saunders A., Schmechel D., Peirce-Vance M., Englhild J., Salvesen O. S., and Roses A. D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993a; 90: 1977–1981.
- [152]. Bales KR, Verina T, Dodel RC, et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet*. 1997; 17: 263-4.
- [153]. Zhou Z., Smith J. D., Greengard P., and Gandy S. Alzheimer amyloid-b peptide forms denaturant-resistant complex with type E3 but not type E4 isoform of native apolipoprotein E. *Mol. Med*. 1996; 2: 175–180.
- [154]. Aleshkov S., Abraham C. R., and Zannis V. I. Interaction of nascent apoE2, apoE3, and apoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide b (1– 40). Relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1997; 36: 10571–10580.
- [155]. Uchihara T, Duyckaerts C, He Y, et al. ApoE immunoreactivity and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett*. 1995; 195: 5-8.
- [156]. 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: 10571-80.
- [157]. Puttfarcken P.S., Manelli A.M., Falduto M.T., Getz G.S., and LaDu M.J. Effects of apolipoprotein E on neurite out-growth and β -amyloid-induced toxicity in developing rat primary hippocampal cultures. *J. Neurochem*. 1997; 68: 760-769.

- [158]. Guy linder, abrégé de biochimie alimentaire, 4^{ème} édition 1999, Masson.
- [159]. Adlersberg, D., Inborn errors of lipid metabolism; clinical, genetic, and chemical aspects. *AMA. Arch Pathol.* 1955; **60**:481-492.
- [160]. Brown, M. S., Kovanen, P. T., and Goldstein, J. L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science.* 1981; **212**:628-635.
- [161]. Hobbs, H. H., Brown, M. S., and Goldstein, J. L., Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992; **1**:445-66.
- [162]. Heizmann, C., Kirchgessner, T., Kwiterovich, P. O., Ladias, J. A., Derby, C., Antonarakis, S. E., and Lusis, A. J., DNA polymorphism haplotypes of the human lipoprotein lipase gene: possible association with high density lipoprotein levels. *Hum. Genet.* 1991; **86**:578-584.
- [163]. Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM, Wootton SA. Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [13C] alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br J Nutr.* 2003; **90**: 311-21.
- [164]. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. For the nutrition committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002; **106**: 2747-57.
- [165]. Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: a hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med.* 1999; **26**: 1346-55.
- [166]. Mann RK, Beachy PA. Cholesterol modification of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2000; **1529**: 188-202.
- [167]. Vanier MT. Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem Res.* 1999; **24**: 481-9. - McNamara DJ. Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2000; **1529**: 310-20.
- [168]. Danik M, Champagne D, Petit-Turcotte C, Beffert U, Poirier J. Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Crit Rev Neurobiol.* 1999; **13**: 357-407. - Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol.* 2001; **12**: 105-12.

- [169]. Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. 2001; **294**: 1354-7. - Pfrieger FW. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta*. 2003; **1610**: 271-80.
- [170]. Nägler K, Mauch DH, Pfrieger FW. Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol*. 2001; **533**: 665-79.
- [171]. Breckenridge WC, Morgan IG, Zanetta JP, Vincendon G. Adult rat brain synaptic vesicles. II. Lipid composition. *Biochim Biophys Acta*. 1973; **320**: 681-6.
- [172]. Klopfenstein DR, Tomishige M, Stuurman N, Vale RD. Role of phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell*. 2002; **109**: 347-58.
- [173]. Becher A, White JH, McIlhinney RA. The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J Neurochem*. 2001; **79**: 787-95.
- [174]. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*. 2001; **12**: 105-12.
- [175]. jarvik,G.P et al. interaction of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, and sex in prediction of Alzheimer disease in case control study. *Neurobiology*. 1995; **45**: 1092 - 1096.
- [176]. Fernandes, M.A. et al. Effect of apolipoprotein E on blood lipid composition and membrane platelet fluidity in Alzheimer disease.*biochim.biophys. Acta*. 1999; **1454**: 89-96.
- [177]. Vazquez M., Merlos M., Adzet T., Laguna J.C. Influence of lipid profile and fatty acid composition on the oxidation behaviour of rat and guinea pig low density lipoprotein. *Comp. Biochem. Physiol., B Biochem. Mol. Biol*. 1998; **119**: 311–316.
- [178]. Notkola, I.M., Sulkava, R., Pekkanen, J., Erkinjuntti, T., Ehnholm, C., Kivinen, P., Tuomilehto, J., Nissinen, A. Serum total cholesterol, apolipoprotein E e4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*. 1998; **17**: 14–20.
- [179]. Gibson Wood W, Eckert GP, Igbavboa U, Muller WE. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2003; **1610**: 281–90.
- [180]. Igbavboa U, Avdulov NA, Schroeder F, Wood WG. Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice. *J Neurochem*. 1996; **66**: 1717–25.

- [181]. Hayashi H, Igbavboa U, Hamanaka H, et al. Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Neuroreport*. 2002; **13**: 383–86.
- [182]. Wahrle S, Das P, Nyborg AC, et al. Cholesterol-dependent gammasecretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis*. 2002; **9**: 11–23.
- [183]. Craft S, et al., Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; **28**(6): p. 809-22.
- [184]. Watson, G.S., et al., Insulin increases CSF Abeta42 levels in normal older adults. *Neurology*. 2003; **60**(12): p. 1899-903.
- [185]. Ott A, Stolk RP, Hofman A, van Harskamp F, Grobbee DE, Breteler MM. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam study. *Diabetologia*. 1996; **39**: 1392-7.
- [186]. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Neurology*. 1999; **53**: 1937-42.
- [187]. Messier C, Gagnon M. Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behav Brain Res*. 1996; **75**: 1-11.
- [188]. Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes*. 2002; **51**: 1256-62.
- [189]. Korf ES, White LR, Scheltens P, Launer LJ. Brain aging in very old men with type 2 diabetes: the Honolulu-Asia aging study. *Diabetes Care*. 2006; **29**: 2268-74.
- [190]. Grandhee S, Monnier V. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-links pentosidine. *J Biol Chem*. 1991; **266**: 11649-53.
- [191]. Odetti P, Aragno I, Garibaldi S, Valentini S, Pronzato MA, Romandi R. Role of advanced glycation end products in aging collagen. *Gerontology*. 1998; **44**: 187-91.
- [192]. Smith MA, Taneda S, Richey PL, et al. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; **91**: 5710-4.
- [193]. Munch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*. 1997; **23**: 134-43.
- [194]. Munch G, Cunningham AM, Riederer P, Braak E. Advanced glycation endproducts are associated with Hirano bodies in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1998; **796**: 307-10.

- [195]. Durany N, Munch G, Michel T, Riederer P. Investigation on oxidative stress and therapeutical implications in dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1999; **249** (suppl. 3): 68-73.
- [196]. Dickson DW, Sinicropi S, Yen SH, *et al*. Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1996; **17**: 733-43.
- [197]. Horie K, Miyata T, Yasuda T, *et al*. Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; **236**: 327-32.
- [198]. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000; **1502**: 139-44.
- [199]. Frey J. Y a-t-il du sucre dans l'Alzheimer ? *Annales de Biologie Clinique*. Volume 59, Numéro **3**, Mai - Juin 2001, 253-7, Revues générales.
- [200]. Tabarin A., Corcuff J.-B., Roger P. Physiologie et exploration des sécrétions de cortisol et d'androgènes par la glande corticosurrénale. *Encycl Med Chir (Paris, France), Endocrinologie-Nutrition*. 1993; **10-014-B-10**: 9 p.
- [201]. Hammond G.L., Smith C.L., Underhill D.A. Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991; **40**: 755-762.
- [202]. Antoni F.A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev*. 1986; **7**: 351-378.
- [203]. Lupien SJ. *Et al*. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci* 1998 May; **1**(1):69-73.
- [204]. Yehuda S. Omega-6/Omega-3 Ratio and brain related functions. *World review of Nutrition and Dietetics*, vol.92
- [205]. Morgan CA, Wang S, Mason J, Southwick SM, Fox P, Hazlett G, Charney DS, Greenfield G *Biol. Hormone profiles in humans experiencing military survival training. Psychiatry* 2000 May 1; **47**(10):891-901.
- [206]. School of Biological Sciences, Macquarie University, North Ryde, N.S.W., Australia. The physiological measurement of acute stress (public speaking) in bank employees. *Int J Psychophysiol*; VOL 5, ISS **4**, 1987, P265-73.
- [207]. Troxler RG. Human Stress Response and Its Possible Relationship to Disease. *Dental Clinics of North America*, Vol. 30, No. **4**, pages S11-S27, 60 references, 1986.

- [208]. Hourri J.-J, Acar V, Nguyen Petzold B, Pradeau D, Guyon F. La DHEA : aspects biochimiques, physiopathologiques, cliniques et pharmaceutiques. *Journal de Pharmacie Clinique*. Volume 21, Numéro 1: 31-8, Mars 2002, Pharmacothérapie.
- [209]. Blacher J, Czernichow S, Horellou MH, et al. Homocystéine, acide folique, vitamines du groupe B, et risque cardiovasculaire. *Arch Mal Cœur Vaiss*. 2005; 98: 145-52.
- [210]. Zittoun J. Homocystéine et pathologie vasculaire. *Revue hématologie*. 1998; 4: 7-16.
- [211]. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals: Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem*. 1984; 259: 9508-9513.
- [212]. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. 6th Ed. McGraw-Hill Information Services Co., New York, 1989; 3006 pp. in two volumes (A4 253-1253-1253-1).
- [213]. Ibels LS, Stewart JH, Mahony JF, Neale FC, Sheil AGR. Occlusive arterial disease in uraemic and haemodialysis patients and renal transplant recipients. *Qu J Med*. 1977; 66: 197-214.
- [214]. Kutzback C, Stokstad ELR. Feedback inhibition of methylene tetrahydrofolate reductase in rat liver by S-adenosyl-methionine. *Biochimica Biophysica Acta*. 1967; 139: 217-220.
- [215]. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem*. 1995; 41: 340-342.
- [216]. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem*. 1998; 44: 1833-1843.
- [217]. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DE, Bmlø HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH. Homocysteine and its disulfide derivatives: A suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1704-1706.
- [218]. Jacobsen DW. Practical chemistry of homocysteine and other thiols. In homocysteine in health and disease. 2001; Cambridge University Press. pp 9-20.
- [219]. Kang S, Wong PWK, Becker N. Protein-bound homocysteine in normal subjects and in patients with homocystinuria. *Pediatr Res*. 1979; 13: 1141-1143.
- [220]. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem*. 1985; 31: 624-628.

- [221]. Soo-Sang Kang, Paul WK, Wong, Jiemin Zhou, and Heron Y. Cook. Total homocysteine in plasma and amniotic fluid of pregnant women. *Metabolism Clinical and Experimental*. 1986; **35**(10): 889-91.
- [222]. David JL. L'hyperhomocystéinémie facteur du risque thromboembolique veineux. *Louvain Med*. 2000; **119**: S191-S196.
- [223]. Isber S. The role of poor nutritional status and hyperhomocysteinemia in complicated pregnancy in Syria. 2006; Thesis dissertation for awarding the degree of doctor of theoretical medicine.
- [224]. Kuo HK, Sorond FA, Chen JH, Hashmi A, Milberg WP, Lipsitz LA. The role of homocysteine in multisystem age-related problems: a systematic review. *J Gerontol Med Sci* 2005; 60 A, **9**: 1190-1201.
- [225]. Morris MC, Schneider JA, Tangney CC. Thoughts on B-vitamins and dementia. *J Alzheimers Dis* 2006; **9**: 429-433.
- [226]. Schneider JA, Tangney CC, Morris MC. Folic acid and cognition in older persons. *Expert Opin Drug Saf* 2006; **5**: 511-522.
- [227]. Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol* 2006; **5**: 949-960.
- [228]. Sachdev PS. Homocysteine and brain atrophy. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; **29**: 1152-1161.
- [229]. Troen A, Rosenberg I. Homocysteine and cognitive function. *Semin Vasc Med* 2005; **5**: 209-214.
- [230]. Luchsinger JA, Tang MX, Miller J, Green R, Mehta PD, Mayeux R. Relation of plasma homocystéine to plasma amyloids-beta. *Neurochem Res* 2006; Dec 27. Epub ahead of print.
- [231]. Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000; **51**: 357-375.
- [232]. Stabler SP. B12 and nutrition. In: Banerjee R ed, *Chemistry and Biochemistry of B12*. New York, John Wiley & Sons, 2000.
- [233]. Shane B. Folate chemistry and metabolism. In: Baily LB ed, *Folate in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 1995; 1-22.
- [234]. Wagner C. Biochemical role of folate in cellular metabolism. In: Baily LB ed, *Folate in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, 1995: 23-42.

- [235]. Lipton SA, Kim WK, Choi YB et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5923-5928.
- [236]. Kruman II, Culmsee C, Chan SL et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000; **20**: 6920-6926.
- [237]. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002; **22**: 1752-1762.
- [238]. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S et al. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003; **14**: 32-42.
- [239]. Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci* 2005; **28**: 195-204.
- [240]. Pacheco-Quinto J, Rodriguez de Turco EB, Derosa S et al. Hyperhomocysteinemic Alzheimer's mouse model of amyloidosis shows increased brain amyloid beta peptide levels. *Neurobiol Dis* 2006; **22**: 651-656.
- [241]. Haan MN, Miller JW, Aiello AE, Whitmer RA, Jagust WJ, Mungas DM, Allen LH, G. Homocysteine, B vitamins, and the incidence of dementia and cognitive impairment: results from the Sacramento Area Latino Study on Aging. *Am J Clin Nutr*. 2007 Feb; **85** (2): 511-7.
- [242]. Clarke R, Birks J, Nexo E, Ueland PM, Schneede J, Scott J, Molloy A, Evans JG Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults. *Am J Clin Nutr*. 2007 Nov; **86**(5): 1384-91.
- [243]. Luchsinger JA, Tang MX, Miller J, Green R, Mayeux R. Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer's disease in the elderly. *Arch Neurol* 2007; **64**: 86-92.
- [244]. Morris MC, Evans DA, Schneider JA, Tangney CC, Bienias, JL, Aggarwal NT. Dietary folate and vitamins B12 and B6 not associated with incident Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006; **9**: 435-443.
- [245]. Kado D, Karlamangla AS, Huang MH et al. Homocysteine versus the vitamins folate, B6, and B12 as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur Studies of Successful Aging. *Am J Med* 2005; **118**: 161-167.

- [246]. Morris MC, Evans DA, Bienias JL et al. Dietary folate and vitamin B12 intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. *Arch Neurol* 2005; **62**: 641-645.
- [247]. Corrada MM, Kawas CH, Hallfrisch J, Muller D, Brookmeyer R. Reduced risk of Alzheimer's disease with high folate intake: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Alzheimers Dement* 2005; 11-18.
- [248]. Mooijaart SP, Gussekloo J, Frolich M et al. Homocysteine, vitamin B-12, and folic acid and the risk of cognitive decline in old age: the Leiden 85-Plus study. *Am J Clin Nutr* 2005; **82**: 866-871.
- [249]. Tucker KL, Qiao N, Scott T, Rosenberg I, Spiro A III. High homocysteine and low B vitamins predict cognitive decline in aging men: the Veterans Affairs Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 2005; **82**: 627-635.
- [250]. Ravaglia G, Forti P, Maioli F et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer's disease. *Am J Clin Nutr* 2005; **82**: 636-643.
- [251]. Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Miller J, Green R, Mayeux R. Plasma homocysteine levels and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 2004; **62**: 1972-1976.
- [252]. Teunissen CE, Blom AH, van Boxtel MP J et al. Homocysteine: a marker for cognitive performance? A longitudinal follow-up study. *J Nutr Health Aging* 2003; **7**: 153-159.
- [253]. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF et al. Plasma homocysteine as a risk factor dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; **346**: 476-483.
- [254]. Wang HX, Wahlin A, Basun H, Fastbom J, Winblad B, Fratiglioni L. Vitamin B(12) and folate in relation to the development of Alzheimer's disease. *Neurology* 2001; **56**: 1188-1194.
- [255]. Bryan J, Calvaresi E, Hughes D. Short-term folate, vitamin B-12 or vitamin B-6 supplementation slightly affects memory performance but not mood in women of various ages. *J Nutr* 2002; **132**:1345-1356.
- [256]. Fioravanti M, Ferrario E, Massaia M, Cappa G, Rivolta G, Grossi E et al. Low folate levels in the cognitive decline of elderly patients and efficacy of folate as a treatment for improving memory deficits. *Arch Gerontol Geriatr* 1997; **26**: 1-13.
- [257]. Sommer BR, Hoff AL, Costa M. Folic acid supplementation in dementia: a preliminary report. Proceedings of the 11th Annual Meeting of the American Association for Geriatric Psychiatry 1998; Mar 8-11, San Diego 1998.

- [258]. Clarke R, Harrison G, Richards S, Vital Trial Collaborative Group. Effect of vitamins and aspirin on markers of platelet activation, oxidative stress and homocysteine in people at high risk of dementia. *J Intern Med* 2003; **254**: 67-75.
- [259]. Malouf R, Grimley Evans. Vitamin B6 for cognition (review). The Cochrane Library 2006; Issue 3.
- [260]. Malouf R, Grimley Evans J, Areosa Sastre A. Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia (review). The Cochrane Library 2005; Issue 3.
- [261]. Eussen SJ, de Groot LC, Joosten LW et al. Effect of oral vitamin B12 with or without folic acid on cognitive function in older people with mild vitamin B12 deficiency: a randomized, placebo, controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006; **84**: 361-370.
- [262]. McMahon JA, Green TJ, Skeaff CM, Knight RC, Mann JI, Williams SM. A controlled trial of homocysteine lowering and cognitive performance. *N Eng J Med* 2006; **354**: 2764-2772.
- [263]. Durga J, van Boxtel MPJ, Schouten EG et al. Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults. A randomised, double blind, controlled trial. *Lancet* 2007; **369**: 208-216.
- [264]. Miner SE, Evroski J and Cole DE. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem.*1997; **30**: 189-201.
- [265]. Monika GOS and Agnieszka SP. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet.* 2002; **43** (4): 511-524.
- [266]. Mathhews RG, Sheppard C, Goulding C. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr.* 1998; **157** (suppl. 2): S54-S59.
- [267]. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost.* 1997; **78**: 523-6.
- [268]. Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Themolabile methylenetetrahydrofolate reductase : an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 1991; **48**: 536-45.
- [269]. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* 1998; **9**: 652-656.

- [270]. Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, Rozen R. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet.* 1996; **59**: 1268-75.
- [271]. Yamanda K, Chen Z, Rozen R, and Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; **98**: 14853-14858.
- [272]. Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquard T, Harms E, Koch HG. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000; **8**: 725-729.
- [273]. Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. Prevalence of the mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet.* 1998; **78**: 332-335.
- [274]. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ, Jr. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *Am J Hum Genet.* 1997; **60**: 229-30.
- [275]. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 1258-60.
- [276]. O'Leary, Daly L, Murray S, Conley M, Mayne P, Kirke OPN, Mills JL, Molloy AM, Brody LC, Smith VB and Scott JM. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case control study. *BMJ.* 2004; **328**: 1535-1536.
- [277]. Kostulas K, Crisby M, Huang WX, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischaemic stroke and in carotid artery stenosis. 1998; **28**: 285-289.
- [278]. Jerbi Z, Abdennebi M, Douik H, Ben Romdhane H, Harzallah L, Guemira F, Ghanem. Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Ann Biol Clin.* 2005; **63(5)**: 487-91.
- [279]. van der Put N.M.J., Trijbels F.J.M., van den Heuvel L.P., Blom H.J., Steegers-Theunissen R.P.M., Eskes T.K.A.B., Mariman E.C.M., den Heijer M., Frosst P., Rozen R. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *The Lancet.* 1995; Volume 346, Issue **8982**, Pages 1070 – 1071.
- [280]. Jacques PF, Bostom A G, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation Between Folate Status, a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase, and Plasma Homocysteine Concentrations. *Circulation.* 1996; **93**: 7-9.

- [281]. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, Refsum H. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (>40 mmol/l). The Hordaland homocysteine study. *J Clin Invest.* 1996; **98**: 2174–83.
- [282]. Selhub J, Miller JH. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr.* 1992; **55**: 131–138.
- [283]. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation.* 1998; **98**: 2520–6.
- [284]. Nelen WLD, Blom HJ, Thomas CMG, Steegers EAP, Boers GHJ, Eskes TKAB. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr.* 1998; **128**: 1336–1341.
- [285]. Molloy AM, Daly S, Mills JL, et al. Thermolabile variant of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet.* 1997; **349**: 1591–3.
- [286]. Van der Put NMJ, Van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Mariman ECM, Den Heyer M, Blom HJ (). Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the C677T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med.* 1996; **74**: 691–694.
- [287]. VanderPut M, Vandermolene F, Kluijtmans A, HEIL SG, TRIJBELS JM, Eskes TK, Vanoppenraaij, Emmerzaald, Banejee R, Blomh J. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural tube defects and vascular disease. *Q. J. Med.* 1997; **90**: 511–517.
- [288]. Eskes TK. Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: Review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; **124**: 130 – 133.
- [289]. Krugman II, Kumaravel TS, Lohani A, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002; **22**: 1752– 62.
- [290]. Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, et al. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 12915–20.
- [291]. The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. A meta-analysis. *JAMA.* 2002; **288**: 2015–22.

- [292]. Kalaria R. Similarities between Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2002; **203–204**: 29–34.
- [293]. Morita H, Taguchi JI, Kurihara H, *et al.* Genetic polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation.* 1997; **95**: 2032-6.
- [294]. Kou MC, Wang L, Liang KJ, Wu MJ. Genotyping 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase for patients with coronary artery disease in southern Taiwan. *J Food Drug Anal.* 2001; **9**: 173-7.
- [295]. Meleady R, Ueland Per M, Blom H, *et al.* Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: The European concerted action project. *Am J Clin Nutr.* 2003; **77**: 63-70.
- [296]. Botto LD, Mastroiacovo P. Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defects. *Clin Genet.* 1998; **53**: 456-9.
- [297]. De Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, *et al.* The C677T mutation of the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet.* 1998; **35**: 1009-13.
- [298]. Levine AJ, Sigmund KD, Ervin CM, *et al.* The methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T Polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; **9**: 657-63.
- [299]. Shen H, Spitz MR, Wang LE, Hong WK, Wei Q. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and risk of lung cancer : a case - control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; **10**: 397-401.
- [300]. Campbell IJ, Baxter SW, Eccles DM, Choong DYH. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002; **4**: R14.
- [301]. Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Toru M. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. *Am J Med Genet.* 1997; **74**: 526-8.
- [302]. Regland B, Germgard T, Gottfries CG, Grenfeldt B, Koch-Schmidt AC. Homozygous thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in schizophrenia-like psychosis. *J Neural Transm.* 1997; **104**: 931-41.
- [303]. Ulvik A, Volbert SE, Hansen S, Giselfoss R, Jellum E, Ueland PM. Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677 CT and methionine synthase 2756 AG polymorphisms : a study of 2168 case-control pairs from the JANUS cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; **13**: 2175-80.

- [304]. Matsushita S, Muramatsu T, Arai H, Matsui T, Higuchi S. The frequency methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation varies with age in the normal population. *Am J Hum Genet.* 1997; **61**: 1459-60; [letter].
- [305]. Heijmans BT, Gussekloo J, Kluit C, *et al.* Mortality risk in men is associated with a common mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene (MTHFR). *Eur J Hum Genet.* 1999; **7**: 197-204.
- [306]. Guillen M, Corella D, Portoles, Gonzalez JI, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 C > T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol.* 2001; **17**: 255-61.
- [307]. Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism - clinical implications. In: Fuchs J, Podda M, eds. *Encyclopedia of medical genomics and proteomics.* New York: Taylor and Francis Group, 2005. DOI: 10.1081/E-EDGP-120030861.
- [308]. Hofman A, Ott A, Breteler MMB, *et al.* Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam study. *Lancet.* 1997; **349**: 151-54.
- [309]. Dela Torre JC. Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. *Annals of the New York Academy of sciences.* 2002; **977**:196- 215.
- [310]. Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease: The NUN study. *JAMA.* 1997; **277**: 813-7.
- [311]. Casserly I and Topol E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol and misfolded proteins. *Lancet.* 2004; **363**: 1139- 1146.
- [312]. Skoog I, Lernfeldt B, Landahl S *et al.* 15- year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet.* 1996; **347**: 1141-1145.
- [313]. Launer LJ, Ross GW, Petrovich H, *et al.* Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu- Asia aging study. *Neurobiol. Aging.* 2000; **21**(1):49-55.
- [314]. Mila Kivipelto, Eeva-Liisa Helkala, Mikko P Laakso, Tuomo Hanninen, Merja Hallikainen, Kari Alhainen, Hilikka Soininen, Jaakko Tuomilehto and Aulikki Nissinen. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal population based study. *BMJ.* 2001; **322**:1447-1451.
- [315]. Hanon O, Pequignot R, Seux ML *et al.* relationship between antihypertensive drug therapy and cognitive function in elderly hypertensive patients with memory complaints. *J Hypertens.* 2006; **10**: 2101- 2107.

- [316]. Friedland RP, Fritish T, Smyth KA, et al. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with health control group members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; **98**: 3440-45.
- [317]. Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol*. 2001 Mar; **38**(3):498-504.
- [318]. Jeandel C, Nicolas MB, Nabet- Belleville F et al. Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 1989; **35**: 275-82.
- [319]. Morris MC, Evans DA, Bienias JL et al. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer's disease in a biracial community study. *JAMA*. 2002; **287**: 3230-37.
- [320]. Masaki KH, Losonczy KG, Izmirlian G et al. Association of Vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology*. 2000; **54**: 1265 -72.
- [321]. Kalimijn S, Launer LJ, Ott A et al. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam study. *Ann. Neurol*. 1997; **42**: 776-82.
- [322]. OMS (WHO/IPCS); 1991: extrait de Global Mercury Assessment (*ONU; Mercury Program, chap 4*).
- [323]. Pendergrass JC, Slevin JT, Haley BE, Duhr EF. HgEDTA complex inhibits GTP interactions with the E-site of brain beta-tubulin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993 Oct; **122**(2): 273-80.
- [324]. Thompson CM, Markesbery WR, Ehmann WD, Mao YX, Vance DE. Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*. 1988 spring; **9**(1):1-7.
- [325]. Ehmann WD, Markesbery WR, Alauddin M, Hossain TI, Brubaker EH. Brain trace elements in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*. 1986 spring; **7**(1):195-206.
- [326]. Pendergrass JC, Haley BE, Vimy MJ, Winfield SA, Lorscheider FL. Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: similarity to a molecular lesion in Alzheimer diseased brain. *Neurotoxicology*. 1997; **18**(2): 315-24.
- [327]. Hock C, Drasch G, Golombowski S, Müller-Spahn F, Willershausen-Zönnchen B, Schwarz P, Hock U, Growdon JH, Nitsch RM. Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 1998; **105**(1): 59-68.
- [328]. Lorscheider FL, Vimy MJ, Summers AO, Zwiers H. ; The dental amalgam mercury controversy--inorganic mercury and the CNS; genetic linkage of mercury and antibiotic resistances in intestinal bacteria. *Toxicology*. 1995 Mar 31; **97**(1-3):19-22.

- [329]. Leong CC, Syed NI, Lorscheider FL. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury. *Neuroreport*. 2001 Mar 26; **12(4)**:733-7.
- [330]. Fonte J, Miklossy J, Atwood C, Martins R. The severity of cortical Alzheimer's type changes is positively correlated with increased amyloid-beta Levels: Resolubilization of amyloid-beta with transition metal ion chelators. *J Alzheimers Dis*. Avril 2001; **3(2)**: 209-219.
- [331]. Blacker D, Haines JL, Rodes L, Terwedow H, Go RC, Harrell LE, Perry RT, Bassett SS, Chase G, Meyers D, Albert MS, Tanzi R. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. 1. *Neurology*. Janvier 1997 Jan; **48(1)**:139-47.
- [332]. Olarte L, Schupf N, Lee JH, Tang MX, Santana V, Williamson J, Maramreddy P, Tycko B, Mayeux R. Apolipoprotein E epsilon4 and age at onset of sporadic and familial Alzheimer disease in Caribbean Hispanics. *Arch Neurol*. Novembre 2006; **63(11)**:1586-90.
- [333]. Aggarwal NT, Wilson RS, Beck TL, Bienias JL, Berry-Kravis E, Bennett DA. ; The apolipoprotein E epsilon4 allele and incident Alzheimer's disease in persons with mild cognitive impairment. *Neurocase*. Février 2005; **11(1)**: 3-7.
- [334]. Bush AI. Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. Nov-Dec 2002; **23(6)**:1031-8.
- [335]. Armstrong RA, Winsper SJ, Blair JA. Aluminium and Alzheimer's disease: review of possible pathogenic mechanisms. *Dementia*. 1996 Jan-Feb; **7(1)**: 1-9.
- [336]. Reusche E. Argyrophilic inclusions distinct from Alzheimer neurofibrillary changes in one case of dialysis-associated encephalopathy. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1997; **94**, 612-616.
- [337]. Rondeau V, Commenges D, Jacqmin-Gadda H, Dartigues JF. Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: an 8-year follow-up study. *Am J Epidemiol*, 2000 Jul 1; **152** (1): 59-66.
- [338]. Flaten, T. Aluminum as a risk factor in Alzheimer's disease, with an emphasis on drinking water. *Brain Research Bulletin*. May 15, 2001; vol. **55** (2), pp. 187-196.
- [339]. Gatz M, Svedberg P, Pedersen NL, Mortimer JA, Berg S, Johansson B. Education and the risk of Alzheimer's disease: findings from the Study of Dementia in Swedish Twins. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 2001; **56**: P292-P300.
- [340]. Letenneur L, Gilleron V, Commenges D, Helmer C, Orgogozo JM, Dartigues JF. Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1999; **66**: 177-83.
- [341]. Helmer C, Letenneur L, Rouch I, et al. Occupation during life and risk of dementia in French elderly community residents. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; **7**: 303-309.

- [342]. Kordower JH, Chu Y, Stebbins GT, DeKosky ST, Cochran EJ, Bennett D, Mufson EJ. Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann Neurol*. 2001 Feb; **49** (2): 202-13.
- [343]. Schmidt ML, Zhukareva V, Newell KL, Lee VM and Trojanowski JQ. Tau isoform profile and phosphorylation state in dementia pugilistica recapitulate Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; **101**: 518-524.
- [344]. Michelle Cussenot. Principes des techniques de biologie moléculaire, 1999 ; édition Denis TAGU.
- [345]. Masson D, Mainard f, Auget j.l, Chivot l. Effect of precipitation and centrifugation conditions on high density lipoprotein cholesterol measured with phosphotungstate-magnesium reagent. *Clin.chem.* 1992; **38/1**:148.
- [346]. Friedwald, W.T., Levy, R.I. and Fredrickson, D.S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; **18**: 499-502.
- [347]. Bienvenu, T., Monier, C et al. Les techniques d'extraction d'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Ann, biol. Clin.* 1999; **57**: 77 -84.
- [348]. Boston, P., Dennis, M.S., Jagger, C. Factors associated with vascular dementia in an elderly community population. *Int. J. Psychiatry*. 1999; **14**: 761–766.
- [349]. Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, et al. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. *Neurology*. 2000; **54** (suppl 5): S10-5.
- [350]. Edland SD, Rocca W, Petersen RC, Cha RH, Kokmen E. The incidence of Alzheimer's disease does not vary by gender in Rochester, MN. *Neurobiol Aging*. 2000; **21**: S203.
- [351]. Ritchie K, Kildea D. Is senile dementia « age-related » or « ageing-related »? Evidence from meta-analysis of dementia prevalence in the oldest old. *Lancet*. 1995; **346**: 931-4.
- [352]. Stern RG, Mohs RC, Davidson M, et al. A longitudinal study of Alzheimer's disease: measurement, rate, and predictors of cognitive deterioration. *Am J Psychiatry*. 1994; **151**: 390-6.
- [353]. Cortopassi, G.A., Wong, A. Mitochondria in organism ageing and degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; **1410**:183–193.
- [354]. Chun Shi a, b, Kaihua Guo a, David T. Yew b, Zhibing Yao a, E. Lucy Forster b, Huaqiao Wang a, Jie Xu a. Effects of ageing and Alzheimer's disease on mitochondrial function of human platelets. *Experimental Gerontology*. June 2008; Volume 43, Issue 6: Pages 589-594.

- [355]. Ivanoiu A. Sémiologie de la maladie d'Alzheimer et des démences non-Alzheimer évaluation des troubles démentiels. 2003; **122**: S110-S131.
- [356]. Derouesne C., Poitreneau J., Hugonot L., Kalafat M., Dubois B., Laurent B. Minimal state examination (mmse). A practical tool for evaluating cognitive status. 1999, vol. 28, n°21, pp. 1141-1148.
- [357]. American Psychiatric Association. Critères diagnostiques (Traduction française par J.D. Guelfi et col.). 2000, Masson, Paris.
- [358]. Lan Chen, MB, Larry Baum, PHD. Apolipoprotein E Genotype and Its Pathological Correlation in Chinese Alzheimer's disease With Late Onset. *Hum Pathology*. October 1999; Volume 30, Issue **10**: Pages 1172-1177.
- [359]. G. Friedman A, Ruth Gabizon B. Apolipoprotein EE4 allele, a risk factor for late onset nonfamilial Alzheimer's disease among Israeli Jews. *Gerontology and Geriatrics*. 1997; **24**: 175-181.
- [360]. Myron F. Weiner, Gloria Vega, Richard C. Risser. Apolipoprotein Ee4, Other Risk Factors, and Course of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*. 1 March 1999; Volume 45, Issue **5**: Pages 633-638.
- [361]. Roses, A. D.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993; **261**: 921-923.
- [362]. Srivastava RA, Srivastava N, Aversa M, Lin RC, Korach KS, Lubahn DB & Schonfeld G. Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor alpha-mediated pathway. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 33360–33366.
- [363]. Corder E. H., Saunders A. M., Risch N. J., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell Jr P. C., Rimmler J. B., Locke P. A., Conneally P. M., Schmechel K. E., Small G. W., Roses A. D., Haines J. L. & Pericak-Vance M. A. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics*. 1994; **7**:180 – 184. Doi: 10.1038/ng0694-180.
- [364]. Hardy J. Apolipoprotein E in the genetics and epidemiology of Alzheimer's disease. *Am J Med Genet*. 1995; **60**: 456-60.
- [365]. Asad Vaisi Raygani, Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease in Tehran, Iran. *Neuroscience Letters*. 2005; **375**: 1–6.
- [366]. Sandro Sorbi. ApoE allele frequencies in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. August 1994; Volume 177, Issues **1-2** , Pages 100-102.
- [367]. Rosa Adroer, Pilar Santacru. Apolipoprotein E4 allele frequency in Spanish Alzheimer and control cases. *Neuroscience Letters*. 1995; **189**: 182-186.

- [368]. Deiana L., Pes G.M., Carru C., Errigo A., Pettinato S., Carcassi C., Baggio G., Contu L. Lack of influence of apolipoprotein E4 on lipoprotein levels in the island population of Sardinia. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998; **28**: 290–294. G.B.
- [369]. 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. Association of apolipoprotein E allele e4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 1993; **43**: 1467-1472.
- [370]. Frisoni L. G.B., Govoni S., Geroldi C., Bianchetti A., Calabresi L., Franceschini G., Trabucchi M. Gene dose of the ϵ_4 allele of apolipoprotein E and disease progression in sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1995; **37**: 596–604.
- [371]. Gerdes L.U., Klausen I.C., Sihm I., Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet. Epidemiol.* 1992; **9**: 155–167.
- [372]. Corbo R.M., Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE E4 a 'thrifty' allele? *Ann. Hum. Genet.* 1999; **63**: 301–310.
- [373]. Chartier-Harlin, M.-C., Parfitt, M., Legrain, S., Perez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vidal, O., Roques, P., Gourlet, V., Fruchart, J-C., Delacourte, A., Rossor, M. and Amouyel, P. Apolipoprotein E, e4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Human Mol. Genet.* 1994; **3**: 569- 574.
- [374]. Fukuda, R., Nagata, K., Isse, K., Ueki, A. and Kazamatsuri, H. Association of apolipoprotein E4 with sporadic Alzheimer's disease is more pronounced in early onset type. *Neurosci. Lett.* 1994; **175**: 74-76.
- [375]. Rubinsztein DC and Easton DF. Apolipoprotein E genetic variation and Alzheimer's disease. A meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2000 Jul-Aug; **11**(4): 238.
- [376]. 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. *J. Am. Assoc.* 1997; **278**: 1349-1356.
- [377]. 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. *Neurology.* 1994; **44**: 342-344.
- [378]. Higgins GA, Large CH, Rupniak HT, Barnes JC. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: a review of recent studies. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; **56**: 675-685.

- [379]. Mila Kivipeito, Eeva-Liisa Helkala, Mikko P.Laakso, Tuomo Hanninen, Merja Hallikainen, Kari Alhainen et al. Apolipoprotein E4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer's disease. *Ann Intern Med.* 2002; **137**:149-155.
- [380]. Castelli RJ, Graff-Radford NR, Reiman EM, Weaver A, Osborne D, Lucas J, et al. Preclinical memory decline in cognitively normal apolipoprotein E-epsilon4 homozygotes. *Neurobiology.* 1999; **53(1)**: 201-7.
- [381]. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993; **261**: 921.
- [382]. Bickeboller H, Campion D, Brice A, et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am J Hum Genet.* 1997; **60**: 439-46.
- [383]. Ki Woong Kima, Jin Hyeong Jhoo, Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease in Koreans. *Neuroscience Letters.* 1999; **277**: 145-148.
- [384]. Marie-Christine Chartier-Harlin, Louisa Araria-Goumidi, Jean-Charles Lambert Les formes tardives de la maladie d'Alzheimer : de la génétique à la biologie. *medecine/sciences.* 2002; **18**: 709-16.
- [385]. Berr C. Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer, le concours médical – 06-06-98-120-22.
- [386]. Lambert JC, Perez-Tur J, Dupire MJ, et al. Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 1997; **6**: 2151-4.
- [387]. Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, et al. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet.* 1998; **18**: 69-71.
- [388]. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, et al. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett.* 1998; **421**: 105-8.
- [389]. Lambert JC, Brousseau T, Defosse V, et al. Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations-the ECTIM study. *Hum Mol Genet.* 2000; **9**: 57-61.
- [390]. Lambert JC, Mann D, Goumidi L, et al. Effect of the APOE promoter polymorphisms on cerebral amyloid peptide deposition in Alzheimer's disease. *Lancet.* 2001; **357**: 608-9.

- [391]. Norum K.R., Berg T., Helgerud P, Drevon C.A. Transport of cholesterol. *Physiol Rev.* 1983; **63**:1343-1419.
- [392]. Lehtovirta M, Soïinen H, Helisalml S, Mannermaa A, et al. Clinical and neuropsychological characteristics in familial and sporadic Alzheimer's disease: relation to apolipoprotein E polymorphism. *Neurology.* 1996; **46**: 413-9.
- [393]. Pirttila T, Soïinen H, Heininen O, Lehtimaki T, et al. Apolipoprotein E levels in brains from Alzheimer disease patients and controls. *Brain Res.* 1996 ; **722** : 71-7.
- [394]. Stevens M, Van Duijn CM, De Kniff P, et al. Apolipoprotein E gene and sporadic frontal lobe dementia. *Neurology.* 1997; **48**:1526-9.
- [395]. Ignatius M J, Gebicke-Härter P J, Skene J H, Schilling J W, Weisgraber K H, Mahley R W, and Shooter E M. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 February; **83**(4): 1125–1129.
- [396]. Zuliani, G., Ble, A., Zanca, R., Munari, M.R., Zurlo, A., Vavalle, C., Atti, A.R. and Fellin, R. Genetic polymorphisms in older subjects with vascular or Alzheimer's dementia. *Acta Neurol. Scand.* 2001; **103**: 304–308.
- [397]. Chapman, J., Wang, N., Treves, T.A., Korczyn, A.D. and Bornstein, N.M. ACE, MTHFR, Factor V Leiden, and APOE polymorphism in patients with vascular and Alzheimer's dementia. *Stroke.* 1998; **29**:1401–1404.
- [398]. Regland, B., Blennow, K., Germgerd, T., Kech-Schmidt, A.C. and Gottfries, C.G. The role of the polymorphic genes Apolipoprotein E and Methylene-tetrahydrofolate reductase I the development of dementia of the Alzheimer type. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1999; **10**: 245–251.
- [399]. Pollak, R.D., Friedlander, Y., Pollak, A., Idelson, M., Bejarano- Achache, I. and Blumenfeld, A. Ethnic differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in healthy Israeli populations. *Genet Test.* 2000; **4**: 309–311.
- [400]. Seripa D, Forno GD, Matera MG et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms in two genetically and diagnostically distinct cohort of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging.* 2003; **24**: 933-939.
- [401]. Religa D, Styczynska M, Peplonska, B et al. Homocysteine, apolipoproteine E and methylenetetrahydrofolate reductase in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2003: **16**: 64-70.

- [402]. Abdelmoula MS, Bettaieb R, Fekih M, *et al.* Le statut en folates, vitamine B12 et homocystéine du drépanocytaire tunisien. *Rev Maghr Pédiatr.* 2002; **XII**: 291-4.
- [403]. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, *et al.* Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet.* 2001; **10**: 433-43.
- [404]. Chen Z, Ge B, Hudson TJ, Rozen R. Microarray analysis of brain RNA in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and hyperhomocysteinemia. *Brain Res Gene Expr Patterns.* 2002; **1**: 89-93.
- [405]. Chen Z, Schwahn BC, Wu Q, *et al.* Postnatal cerebellar defects in mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase. *Int J Dev Neurosci.* 2005; **23**: 465-74.
- [406]. Mayeux R, Ottman R, Tang M, *et al.* Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. *Ann Neurol.* 1993; **33**: 494-501.
- [407]. Li G, Shen Y, Li Y, Chen C, Zhou Y, Silverman J. A case control study of Alzheimer's disease in China. *Neurology.* 1992; **42**: 1481-8.
- [408]. Mayeux R, Ottman R, Maestre G *et coll.* Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995; **45**: 555-557.
- [409]. O'Meara SE, Kukull WA, Sheppard L *et coll.* Head injury and risk of Alzheimer's disease by apolipoprotein E genotype. *Am J Epidemiol.* 1997; **146**: 373-384.
- [410]. Zekry D., Hauw J.J. and Gold G. Mixed dementia: epidemiology, diagnosis, and treatment, *J. Am. Geriatr. Soc.* 2002; vol 50, n°8: pp. 1431-1438.
- [411]. Jorm AF. Is depression a risk factor for dementia or cognitive decline: a review. *Gerontology.* 2000; **46**: 219-27.
- [412]. Wolozin B, Wellman W, Rousseau P, Celesia G.G and Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer's disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 2000; **57**(10):1439-43.
- [413]. Jick H, Zornberg G. L, Jick S. S, Seshadri S, and Drachman D. A. Statins and the risk of Dementia. *Lancet.* 2000. **356**(9242): 1627-31.
- [414]. Simons M, Schwarzler F, Lutjohann D, von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, Wormstall H, Hartmann T, Schulz JB. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Neurol.* 2002 Sep; **52**(3): 346-50.

- [415]. Alagiakrishnan K, McCracken P, Feldman H. Treating vascular risk factors and maintaining vascular health: Is this the way towards successful cognitive ageing and preventing cognitive decline? *Postgrad Med J.* 2006; **82** (964): 101- 5.
- [416]. Riggs JE. Smoking and Alzheimer's disease. Protective effect or differential survival bias. *Lancet.* 1993; **342**: 793-794.
- [417]. Oogogozzo JM, Dartigues JF, Lafont S et coll. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community based study in the Bordeaux area. *Rev Neurol.* 1997; **153**: 185-192.
- [418]. Lemeshow S, Letenneur L, Dartigues JF, Lafont S, Orgogozo JM, and Commenges D. Illustration of analysis taking into account complex survey considerations: the association between wine consumption and dementia in the Paquid study. *Am J Epidemiol.* 1998; **148**: 298-306.
- [419]. Dufouil C, Ducimetière P, Alperovitch A for the EVA Study Group. Sex differences for association between alcohol consumption and cognitive performance. *Am J Epidemiol.* 1997; **146**: 405-412.
- [420]. Ruitenberg A, Swieten JC, Hofman A, Breteler MMB. Alcohol consumption and risk of dementia: results from the Rotterdam study. *Neurobiol Aging.* 2000; **21**: 1129.
- [421]. Breteler M.M. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective. *Neurobiol. Aging.* 2003; **21**: pp. 153–160.
- [422]. Amira Pierucci-Lagha, Christian Derouesné, alcool et vieillissement. *Psychologie & Neuropsychiatrie du vieillissement.* Décembre 2003; Volume 1, Numéro 4: 237-49.
- [423]. Gradman TJ, Laws A, Thompson LW, Reaven GM. Verbal learning and/or memory improves with glycemic control in older subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc.* 1993; **41**:1305-1312.
- [424]. Elias M.F., Wolf P.A., d'Agostino R.B., Cobb J., White L.R. "Untreated blood pressure level is inversely related to cognitive functioning: the Framingham Study". *Am J Epidemiol.* 1993; **138**: 353-64.
- [425]. Launer J., Masaki K., Petrovitch H., Foley D., Havlik R.J. "The association between midlife blood pressure levels and late-life cognitive function. The Honolulu-Asia Aging Study". *JAMA.* 1995; **274**: 1846-51.
- [426]. Kilander L., Nyman H., Boberg M., Hansson L., Lithell H. "Hypertension is related to cognitive impairment: a 20-year follow-up of 999 men". *Hypertension.* 1998; **31**: 780-6.

- [427]. Tzourio C., Dufouil C., Ducimetiere P., Alperovitch A. "Cognitive decline in individuals with high blood pressure: a longitudinal study in the elderly. EVA Study Group. *Epidemiology of Vascular Aging*". *Neurology*. 1999; **53**: 1948-52.
- [428]. Knopman D., Boland L.L., Mosley T., Howard G., Liao D., Szklo M., McGovern P., Folsom A.R. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. "Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults". *Neurology*. 2001; **56**: 42-8.
- [429]. Breteler M.M. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective. *Neurobiol. Aging*. 2000; **21**: pp. 153–160.
- [430]. Origine : BE Suède numéro 16 (26/07/2010) - Ambassade de France en Suède / ADIT - <http://www.bulletins-electroniques.com>.
- [431]. Lipoprotéines et métabolisme lipidique par L. Lagrost, D. Masson, J. Chapman Tiré de: « L'athérosclérose - Physiologie, diagnostics, thérapeutiques », Jean-François Toussaint, Marie-Paule Jacob, Laurent Lagrost, John Chapman, Sous l'égide de la Société Française d'Athérosclérose
- [432]. Laitinen MH, Ngandu T, Rovio S, et al. Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population- based study. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006; **22**(1): 99- 107.
- [433]. Marwan N. Sabbagh, Joanne Ceimo, H. Reza Zahiri, William V. Gaul, D. Larry Sparks. The lipid profile in the Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. July 2004; Volume 25, Supplement 2, Page S352.
- [434]. Hall K., Murrell J., Ogunniyi A., Gureje O., Dickens J., Evans R., Smith-Gamble V., Unverzagt F.W., Shen J., and Hendrie H. Cholesterol, APOE genotype, and Alzheimer disease an epidemiologic study of Nigerian Yoruba. *Neurology*. 2006; **66**:223–227.
- [435]. Lesser G., Kandiah K., Libow L.S., Likourezos A., Breuer B., Marin D., Mohs R., Haroutunian V. Elevated Serum Total and LDL Cholesterol in Very Old Patients with Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2001; vol. 12, n°2, pp. 138-145
- [436]. Francesco Panzaa, Alessia D'Introno, Anna Maria Colacicco, Cristiano Capurso, Gianfranco Pichichero. Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain research reviews*. 2006; **51**: 275–292.
- [437]. Kuusisto, J., Koivisto, K., Mykkanen, L., Helkala, E.L., Vanhanen, M., Hanninen, T., Kervinen, K., Kesaniemi, Y.A., Riekkinen, P.J., Laakso, M. Association between features of the insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E4 phenotype: cross sectional population based study. *BMJ*. 1997; **315**: 1045–1049.

- [438]. Agathe Raynaud-Simon. Nutrition, démences vasculaires et maladie d'Alzheimer. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. December 2004; Volume 18, Issue 4 : Pages 181-188.
- [439]. Renvall M.J, Spindler A.A et al. Nutritional status of free-living Alzheimer's patients. *Am J Med Sci*. 1989; **298** (1): 20-7.
- [440]. Goodwin J.S., Goodwin J.M. and Garry P.J. Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population. *JAMA*. 1983; **249**: pp. 2917–2921.
- [441]. Christiane Reitz., Ming-Xin Tang., Jose Luchsinger., Richard Mayeux. Relation of Plasma Lipids to Alzheimer Disease and Vascular Dementia. *Arch. Neurol.* 2004; **61**: 705-714.
- [442]. Tan ZS, Seshadri S, Beiser A, Wilson PW, Kiel DP, Tocco M et al. Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch Intern Med*. 2003; **163**: 1053–1057.
- [443]. Kalmijn, S., Foley, D., White, L., Burchfiel, C.M., Curb, J.D., Petrovitch, H., Ross, G.W., Havlik, R.J., Launer, L.J. Metabolic cardiovascular syndrome and risk of dementia in Japanese–American elderly men. The Honolulu–Asia aging study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; **20**: 2255–2260.
- [444]. Romas, S.N., Tang, M.X., Berglund, L., Mayeux, R. APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology*.1999; **53**: 517–521. Panza, F., D'Introno, A., Colacicco, A.M., Capurso, C., Pichichero, G., Capurso, S.A., Capurso, A., Solfrizzi, V. Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res*. 2006; **51**: 275–292.
- [445]. Mielke, M.M., Zandi, P.P., Sjogren, M., Gustafson, D., Ostling, S., Steen, B., Skoog, I. High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology*. 2005; **64**: 1689–1695.
- [446]. Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., Simons, K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; **95** (11): 6460–6464.
- [447]. Koudinov, A.R., Koudinova, N.V. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J*. 2001; **15**: 1858–1860.
- [448]. Vatassery, G.T., Smith, W.E., Quach, H.T., Lai, J.C. In vitro oxidation of vitamin E, vitamin C, thiols and cholesterol in rat brain mitochondria incubated with free radicals. *Neurochem. Int*. 1995; **26**: 527–535.

- [449]. Bonarek M, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, Iron A, Dubroca B, Dartigues JF. Relationships between cholesterol, apolipoprotein E polymorphism and dementia: a cross-sectional analysis from the PAQUID study. *Neuroepidemiology*. 2000; **19**:141–8.
- [450]. Henrike Wolf, Anke Hensel, Thomas Arendt, Miia Kivipelto, Bengt Winblad, Hermann-Josef Gertz. Association between serum HDL cholesterol and hippocampal volume: the link to Alzheimer's disease? *Ann Neurol*. 25 Oct 2004; **56**(5): 745-749. Doi: 10.1002/ana.20289.
- [451]. Li, J.B. Shofer, W.A. Kukull, E.R. Peskind, D.W. Tsuang, J.C.S. Breitner, W. McCormick, J.D. Bowen, L. Teri, G.D. Schellenberg, and E.B. Larson. Serum cholesterol and risk of Alzheimer disease A community-based cohort study. *Neurology*. 2005; **65**:1045-1050.
- [452]. Marwan Sabbagh, H. Reza Zahiri, Joanne Ceimo, Kimbal Cooper, William Gaul, Donald Connor, D. Larry Sparks Is there a characteristic lipid profile in Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's disease*. 2004; Volume 6, Number 6 : 585-589.
- [453]. Gershon T. Lesser, Michal Schnaider Beeril, Michael A. Rapp, Leslie S. Libow, Dushant P. Purohit1, Chaim Tarshish, Vahram Haroutunian.. Serum total and LDL cholesterol are associated with Alzheimer's disease neuropathological diagnosis in the very old. *Alzheimer's and Dementia*. Volume 2, Issue 3, Pages S155-S156.
- [454]. Lehtonen, A., Luutonen, S. High-density lipoprotein cholesterol levels of very old people in the diagnosis of dementia. *Age Ageing* 2001; **15**: 267–270.
- [455]. Romas, S.N., Tang, M.X., Berglund, L., Mayeux, R. APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology*. 1999; **53** : 517–521.
- [456]. Yoshitake, T., Kiyohara, Y., Kato, I., Ohmura, T., Iwamoto, H., Nakayama, K., Ohmori, S., Nomiya, K., Kawano, H., Ueda, K., et al. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Neurology*. 1995 Jun; **45**(6):1161-8.
- [457]. Fujishima, M and Kiyohara, Y. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov; **977**:1-8.
- [458]. Francesco Panza. Serum total cholesterol as a biomarker for Alzheimer's disease: Mid-life or late-life determinations. *Experimental Gerontology*. 2006; **41**: 805–806.
- [459]. Kötter, HU., Hampel, H., and Möller HJ. Total serum cholesterol and triglycerides in patients with Alzheimer's disease and healthy controls. *Neurobiol. Aging*. 1996; **17**(suppl. 4): S95-S96.

- [460]. Braydon L. Burgess, Sean A. McIsaac, Kathryn E. Naus, Jeniffer Y. Chan, Gavin H.K. Tansley, Jing Yang, Fudan Miao, Colin J.D. Ross, Miranda van Eck, Michael R. Hayden, William van Nostrand, Peter St. George-Hyslop, David Westaway and Cheryl L. Wellington. Elevated plasma triglyceride levels precede amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse models with abundant A β in plasma. *Neurobiol. Disease*. October 2006; Volume 24, Issue 1: Pages 114-127.
- [461]. Panza F., Solfrizzi V., D'Introno A., Colacicco A., Santamato A., Seripa D., Pilotto A., Capurso A. and Capurso C. Higher total cholesterol, cognitive decline, and dementia. *Neurobiol. Aging*. April 2009; Volume 30, Issue 4: Pages 546-548.
- [462]. Yu-Min Kuo, Mark R. Emmerling, Charles L. Bisgaier, Arnold D. Essenburg. Heather C. Lampert, Denise Drumm, and Alex E. Roher. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998; **252**: 711–715.
- [463]. Hassing LB, Johansson B, Nilsson SE, et al. Diabetes mellitus is a risk factor for vascular dementia, but not for Alzheimer's disease: a population based study of the oldest old. *Int Psychogeriatr*. 2002; **14**: 239-48.
- [464]. Xu WL, Qiu CX, Wahlin A, et al. Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study. *Neurology*. 2004; **63**: 1181-6.
- [465]. Qiu C, Kivipelto M, Aguero-Torres H, et al. Risk and protective effects of the APOE gene towards Alzheimer's disease in the Kungsholmen project: variation by age and sex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; **75**: 828-33.
- [466]. Fumiko Irie, Annette L. Fitzpatrick, Oscar L. Lopez, Lewis H. Kuller, Rita Peila, Anne B. Newman, Lenore J. Launer. Enhanced Risk for Alzheimer Disease in Persons with Type 2 Diabetes and APOE ϵ 4. *Arch Neurol*. 2008; **65**(1): 89-93.
- [467]. Luchsinger JA, Mayeux R. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2004; **6**(4): 261-266.
- [468]. Akomolafe A, Beiser A, Meigs JB, et al. Diabetes mellitus and risk of developing Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2006; **63**(11):1551-1555.
- [469]. Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D. Cerebrovascular disease, the apolipoprotein e4 allele, and cognitive decline in a community-based study of elderly men. *Stroke*. 1996; **27**(12): 2230-2235.
- [470]. Haan MN, Shemanski L, Jagust WJ, Manolio TA, Kuller L. The role of APOE epsilon4 in modulating effects of other risk factors for cognitive decline in elderly persons. *JAMA*. 1999; **282**(1):40-46.

- [471]. Petrovitch H, White LR, Izmirilian G, et al. Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS, Honolulu-Asia Aging Study. *Neurobiol Aging*. 2000; **21**(1):57-62.
- [472]. Korf ES, White LR, Scheltens P, Launer L. Midlife blood pressure and the risk of hippocampal atrophy: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension*. 2004; **44**(1):29-34.
- [473]. van Dijk EJ, Breteler MM, Schmidt R, et al. The association between blood pressure, hypertension, and cerebral white matter lesions: cardiovascular determinants of dementia study. *Hypertension*. 2004; **44**(5):625-630.
- [474]. Elias PK, Elias MF, D'Agostino RB, et al. NIDDM and blood pressure as risk factors for poor cognitive performance: The Framingham Study. *Diabetes Care*. 1997; **20**(9):1388-1395.
- [475]. Schmidt R, Launer LJ, Nilsson LG, et al. Magnetic resonance imaging of the brain in diabetes: the Cardiovascular Determinants of Dementia (CASCADE) Study. *Diabetes*. 2004; **53**(3): 687-692.
- [476]. Whitmer RA, Haan MN, Gunderson EP, et al. Central obesity in midlife and risk of dementia three decades later. *Neurology*. 2009 Mar 17; **72**(11): 1030-1.
- [477]. Whitmer RA, Gunderson EP, Quesenberry CP, et al. Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Curr Alzheimer Res*. 2007; **4**: 103-9.
- [478]. Craft, S., Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: age- and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. *Neurobiol Aging*. 2005; **26** Suppl 1: p. 65-9.
- [479]. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *PNAS*. 2003 Apr 1; **100**(7): 4162-7.
- [480]. Tatar M, Bartke A, and Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*. 2003; **299**:1346-51.
- [481]. Olfá Chehab, Mohamed Ouertani, Kamel Chaieb, Faouzi Haouala, Kacem Mahdouani. Hormonal status of cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate in an elderly Tunisian population. *C. R. Biologies*. 2007; **330**: 755–763.
- [482]. de Bruin V.M.S., Vieira M.C.M., Rocha M.N.M., and Viana G.S.B. Cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate plasma levels and their relationship to aging, cognitive function, and dementia. *Brain and Cognition*. 2002; **50**: 316–323.

- [483]. De Leon, M. J., McRae, T., Rusinek, H., Convit, A., De Santi, S., Tarshish, C., Golomb, J., Volkow, N., Daisley, K., Orentreich, N., & McEwen, B. Cortisol reduces hippocampal glucose metabolism in normal elderly, but not in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; **82**: 3251–3259.
- [484]. Magri, F., Terenzi, F., Ricciardi, T., Fioravanti, M., Solerte, S. B., Stabile, M., Balza, G., Gandini, C., & Villa, M. Association between changes in adrenal secretion and cerebral morphometric correlates in normal aging and senile dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord*. 2000; **11**: 90–99.
- [485]. Carlson, L. E., Sherwin, B. B., & Cherktkow, H. M. Relationship between dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT), and everyday memory in Alzheimer's disease patients compared to healthy controls. *Hormones and Behavior*. 1999; **35**: 254–263.
- [486]. Leblhuber, F., Neubauer, C., Peichl, M., Reisecker, F., Steinparz, F. X., Windhager, E., & Dienstl, E. Age and sex differences of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and cortisol (CRT plasma levels in normal controls and Alzheimer's disease (AD). *Psychopharmacology*. 1993; **111**: 23–26.
- [487]. Svec, F. Ageing and adrenal cortical function. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; **11**: 271–287.
- [488]. Rudman, D., Shetty, K. R., & Mattson, D. E. Plasma dehydroepiandrosterone sulfate in nursing home men. *Journal of American Geriatric Society*. 1990; **50**: 421–427.
- [489]. Tilvis, R. S., Kahonen, M., & Harkonen, M. Dehydroepiandrosterone sulfate, diseases and mortality in a general aged population. *Aging*. 1999; **11**: 30–34.
- [490]. Kark JD, Selhub J, Adler B, Gofin J, Abramson J, Friedman G, et al. Non-fasting plasma total homocysteine and mortality in middle-aged elderly men and women in Jerusalem. *Ann Intern Med*. 1999; **131**(5): 321– 30.
- [491]. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*. 1995; **274**: 1526– 33.
- [492]. Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, et al. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr*. 1999; **69**: 482– 9.
- [493]. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998; **55**(11):1449– 55.

- [494]. McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H. Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1998; **13**(4): 235 –9.
- [495]. Postiglione A, Milan G, Ruocco A, Gallotta G, DiMinno G. Plasma folate, vitamin B12, and total homocysteine for the C677T mutation of the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene in patients with Alzheimer's dementia. *Gerontology*. 2001; **47**(6): 324– 9.
- [496]. Mizrahi EH, Jacobsen DW, Debanne SM, Traore F, Lerner AJ, Friedland RP, et al. Plasma total homocysteine levels, dietary vitamin B6 and folate intake in AD and healthy aging. *J Nutr Health Aging*. 2003; **7**(3):160 – 5.
- [497]. Mizrahi E.H., Bowirrat A., Jacobsen D.W., Korczyn A.D., Traore F., Petot G.J., Lerner A.J., Debanne S.M., Adunsky A., DiBello P.M., Friedland R.P. Plasma homocysteine, vitamin B12 and folate in Alzheimer's patients and healthy Arabs in Israel. *Journal of the Neurological Sciences*. 2004; **227**:109– 113.
- [498]. Mohamed Makrelouf, Amel Otmane, Myriam Bendib, Mohamed Izem, Malika Boucelma, Akila Zenati. Homocystéine et génotypage de l'apolipoprotéine E. *Revue Francophone des Laboratoires*-Novembre 2007; Suppl au N°**396** : pp 25-29.

ANNEXES

Annexe 1: Mini mental state examination de FOLSTEIN Modifié (Niveau de scolarisation élémentaire ou non scolarisé)

Nom :

Date :

Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire. Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.

ORIENTATION :

Quelle est la date d'aujourd'hui ?

Temporelle :

1. Quel jour sommes-nous ? noté 0 ou 1
2. En quelle saison ?
3. En quel mois ?
4. quelle était la fête récente ?
5. quel âge vous-avez ? (préciser l'année)

sous total : / 5

Questions alternatives :

- Nom de l'actuel Président de la République ?

Spatiale :

6. A quel endroit sommes-nous ici ? noté 0 ou 1
Hôpital (nom particulier)
Cabinet médicale (nom du médecin – quartier)
7. dans quelle ville se trouve t-il ?
8. Dans quel Pays ?
9. dans quelle région de ce pays (Est, Centre, Ouest, Sud) ?
10. A quel étage sommes-nous ?

sous total : / 5

APPRENTISSAGE :

Je vais vous dire 3 mots. Je voudrais que vous me les répétiez et que essayiez de les retenir. Je vous les demanderai tout à l'heure.

11. café- thé noté 0 ou 1
12. fleur
13. porte

sous total : / 3

ATTENTION ET CALCUL :

Voulez-vous compter à partir de 20 en retirant 2 à chaque fois.

14. 20-2 (18) noté 0 ou 1
15. 18-2 (16)
16. 16-2 (14)
17. 14-2 (12)
18. 12-2 (10)

sous total : / 5

Question alternative :

Comptez à rebours à partir de 10.

Epreuve interférentielle

- Compter à l'endroit jusqu'à 10
- Citer les prénoms de vos enfants
- Epeler ce mot à l'envers

RAPPEL :

Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandé de répéter et de retenir tout à l'heure.

19. Café – thé noté 0 ou 1
20. fleur
21. Porte

sous total : / 3

LANGAGE :

22. Montrer un stylo. Quel est le nom de cet objet ? noté 0 ou 1
23. Montrer une montre. Quel est le nom de cet objet ?
24. Ecoutez bien et répétez après moi :
 “ Ni Le Ken, koun, ouala belek ”
25. Posez une feuille de papier sur le bureau, la montrez au sujet
 en lui disant “ écoutez bien et faites ce que je vais vous dire :
 prenez cette feuille avec la main droite
26. Pliez-la en deux
27. Et jetez la par terre
28. Donnez 5 noms d'animaux / fruits.
29. Empan chiffré à l'envers 4 – 2 - 7.

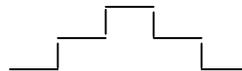
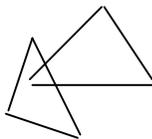
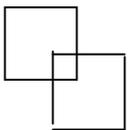
sous total : / 8

Questions alternatives :

- Récitez les jours de la semaine.
- Test de reconnaissance de visage sur photo.
- Mime 'utilisation d'objet (se peigner).
- Annuaux entrelacés avec les deux pinces pouce-index.

PRAXIES CONSTRUCTIVES :

30. Tendre au sujet une feuille de papier e lui demander :
 “ Voulez vous recopier se dessin ”



Epreuves alternatives :

- Reproduire un certains nombres d formes (assemblage formé avec des allumettes)
- Dessin spontané : Maison – Fleurs – Horloge – Etoile

SCORE TOTALE (0 - 30) :

/30

Annexe 2:

le questionnaire

Fiche synthétique TCND (troubles cognitifs neuro-dégénératifs) Neurologie

N°:

Service :

Diagnostic :

Score MMSE :

Alzheimer :

probable

Génotype:

possible

Nom :

prénom :

âge :

sexe :

Taille :

poids :

Niveau d'étude :

aucun
Primaire
Secondaire
Supérieur

Profession :

ouvrier
Agent
Fonctionnaire
Cadre
Cadre supérieur
Libérale

préciser :

actif
retraité
chômage

Lieu de vie :

domicile
Foyer pour personnes âgées
Autre

Situation familiale :

seul
Avec conjoint
Avec enfant

Lieu d'habitat :

milieu rural
Milieu urbain

Les antécédents personnels :

Tabagisme :

nombre de cigarettes /jour

Facteurs de risques mnésiques :

Alcool

prise de cannabis

Prise de benzodiazépines

traumatisme crânien

Troubles respiratoires chroniques

autres (méningo-encéphalite, boxe)

Maladies générales :

Pathologies thyroïdienne

cancer

AVC

HTA

diabète

Maladies inflammatoires chroniques

ulcère (gastrite)

Annexe 3: Coffret-réactifs AxSYM Insuline

- 1 flacon (6.8 ml) de microparticules recouvertes d'anticorps anti-insuline (souris, monoclonal) dans du tampon contenant des stabilisants de protéines.
 - 1 flacon (11.8 ml) de conjugué d'anticorps anti-insuline (souris, monoclonal) : phosphatase alcaline dans du tampon contenant des stabilisants de protéines. Concentration minimale : 3 µg/ml.
 - 1 flacon (14.4 ml) de tampon de dosage dans de sérum de veau.
- Tous les réactifs sont conservés dans l'azide de sodium et les agents antimicrobiens.

Calibrateurs principaux AxSYM Insuline

2 flacons (4 ml chacun), de calibrateurs principaux AxSYM Insuline contenant de l'insuline (humaine, préparée à partir d'insuline de porc) préparée dans du tampon, aux concentrations suivantes :

Flacon	Concentration en insuline (µU/ml)
Master calibrateur 1	0
Master calibrateur 2	100

Calibrateurs standard AxSYM Insuline

6 flacons (4 ml chacun) de calibrateurs standard AxSYM Insuline contenant de l'insuline (humaine, préparée à partir d'insuline de porc) préparé dans du tampon, aux concentrations suivantes :

Standard calibrateur	A	B	C	D	E	F
Concentration en insuline (µU/ml)	0.0	3	10	30	100	300

Contrôles AxSYM Insuline

3 flacons (8 ml chacun) contenant l'insuline (humaine, préparée à partir d'insuline de porc) préparée dans du tampon, pour obtenir les limites de concentration suivantes :

Flacon	Concentration en insuline	
	(µU/ml)	Limites (µU/ml)
Contrôle L	8	6 - 10
Contrôle M	40	32 - 48
Contrôle H	120	96 - 144

Solution 1 (MUP)

4 flacons (230 ml chacun) contenant du phosphate de méthyl-4-ombelliféryl, 1.2 mmol/l dans du tampon.

Solution 3 (MATRIX CELL WASH)

4 flacons (1000 ml chacun) de solution 3 (solution de lavage pour matrices) contenant 0.3 mol/l de chlorure de sodium dans du tampon TRIS.

Solution 4 (diluant)

1 flacon (10 l) contenant 0.1 mol/l du tampon phosphate.

Solution de lavage de l'aiguille AxSYM

4 flacons (110 ml chacun) contenant du tétraéthylammonium hydroxide (TEAH) à 2%.

Annexe 4: Coffret-réactifs AxSYM Cortisol

- 1 flacon (10 ml) de traceur Cortisol marqué à la fluorescéine dans du tampon contenant du surfactant et des stabilisants. Concentration <0.01%.
 - 1 flacon (5 ml) d'antisérum anti-cortisol (souris, monoclonal et chèvre polyclonal) dans du tampon contenant des stabilisants de protéines. Concentration < 1%.
 - 1 flacon (6 ml) de solution de prétraitement. Surfactant dans du tampon TRIS.
- Tous les réactifs sont conservés dans l'azide de sodium et les agents antimicrobiens.

Calibrateurs standard AxSYM Cortisol

6 flacons (A à F : 2, 5 ml chacun). Le calibrateur A contient du tampon et les calibrateurs B à F contiennent du cortisol préparé dans du tampon, pour obtenir les concentrations suivantes :

Standard calibrateur	A	B	C	D	E	F
Concentration en cortisol (µg/dl)	0.0	2.5	5.0	10.0	25.0	60.0

Conservation : azide de sodium.

Contrôles AxSYM Cortisol

3 flacons (2.5 ml chacun) contenant du cortisol préparé dans du tampon, pour obtenir les concentrations cible suivantes :

Flacon	Concentration en cortisol (µg/dl)	
		Limites (µg/dl)
Contrôle L	4.0	1.9 à 6.1
Contrôle M	15.0	11.7 à 18.3
Contrôle H	40.0	30.9 à 49.1

Il est également possible de programmer l'appareil pour que les résultats soient exprimés en nmol/l. Le facteur de conversion utilisé par l'analyseur AxSYM est de 27.6.

Concentration en nmol/l = Concentration en µg/dl x 27.6

Solution de lavage de l'aiguille

2 flacons (220 ml chacun) de solution de lavage de l'aiguille AxSYM contenant de l'hydroxyde d'ammonium tétra éthylique (TEAH) à 2%.

Solution 4 diluant

1 bidon (10 l) de solution 4 (diluant) contenant du tampon phosphate à 0.1 mol/l.

Conservation : azide de sodium et agent antimicrobien.

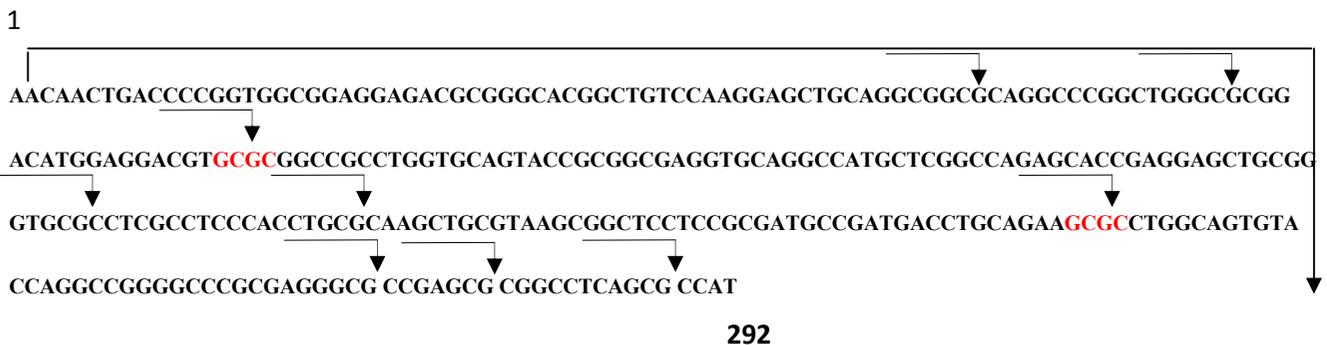
**Annexe 5: Sites de clivage par l'enzyme HhaI sur la séquence amplifiée
de l'exon 4 du gène Apo ε**

- **GCGC** la séquence reconnue par **HhaI**
- La couleur bleu de la séquence représente le fragment de restriction spécifique de chaque allèle.
-  Site de clivage par HhaI.
- **GTG** position de la mutation (**GCG** codant pour **Cys** → **GTG** codant pour **Arg**)
- Sites de restriction reconnus par l'enzyme HhaI : (62. 78. **97**. 169. 187. **235**. 270. 277. 288)

APO - E4 (Arg-Arg)

(Position de reconnaissance par HhaI)

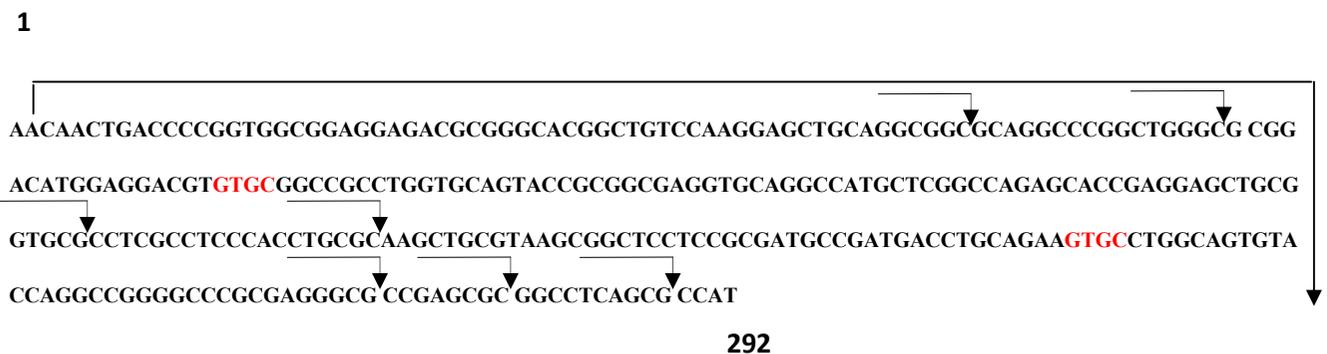
(62. 78. **97. 169. 187. **235**. 270. 277. 288)**



APO - E2 (Cys-Cys)

(Position de reconnaissance par HhaI)

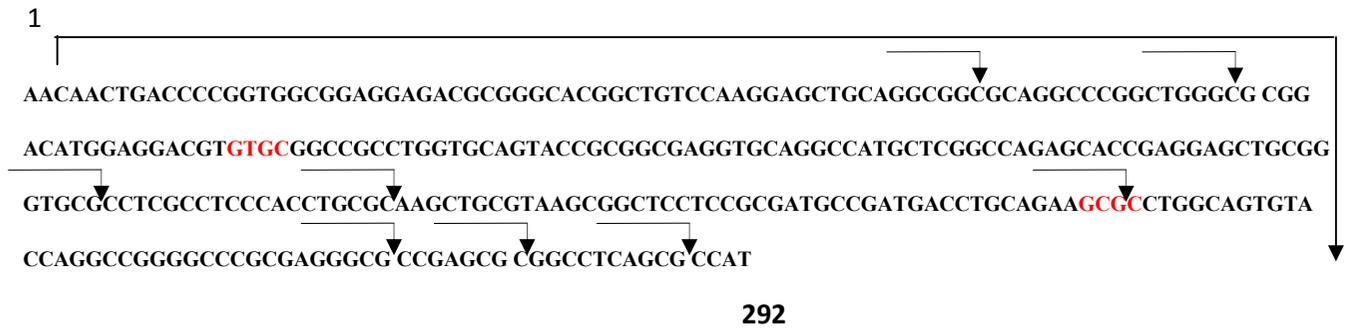
(62.78. 169. 187. 270. 277. 288)



APO - E3 (Cys-Arg)

(Position de reconnaissance par HhaI)

(62. 78. 169. 187. 235. 270. 277. 288)



Annexe 6:

Réactifs utilisés pour la lyse

▪ Solution TE 20 : 5

20 ml de tris mélangés à 10 ml d'EDTA, complété avec l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.
Autoclaver et laisser refroidir avant l'utilisation.

▪ Solution TE 20 : 1

10 ml de tris mélangés à 1 mM d'EDTA à PH 7.4.
Autoclaver et laisser refroidir.

Réactifs utilisés pour l'extraction

▪ Tampon de lyse

1 ml de tris (1 M) mélangé à 0.4 ml d'EDTA (0.5 M), compléter jusqu'à 100 ml d'eau distillée à PH = 8.2.

▪ **SDS 10%** : 100 g SDS + 1000 ml H₂O

▪ **Protéinase K** : 10 mg/ml

Réactifs des solutions mères utilisées dans la PCR

-Oligo F solution mère : 268.2 µM

Oligo F solution fille : 37.28 µl d'Oligo F solution mère + 62.72 µl H₂O

-Oligo R solution mère : 333 µM

Oligo R solution fille : 30.00 µl d'Oligo R solution mère + 69.97 µl H₂O

-dNTP : 2 mM (1/10)

-MgCl₂ : 25 mM (1/2)

-Taq polymérase : 2.5 u

Réactifs utilisés pour la digestion

Tampon : 60 mM Tris HCl (PH 7.5) + 500 mM NaCl + 60 mM MgCl₂ + 10 mM DDT à 37°C.

▪ **BSA** : 0.1 mg/ml

▪ **Enzyme de restriction *HinfI*** : 10 u/µl.

RESUME

L'objectif de notre recherche est d'explorer l'impact du polymorphisme de l'apoE et du profil lipidique sur la maladie d'Alzheimer, ainsi que le statut glycémique, insulinémique, cortisolémique et homocysteinémique, dans un échantillon de la population nord Constantinoise.

Les fréquences alléliques de l'apolipoprotéine E dans notre groupe témoin sont $\epsilon 3$ (83.9%), $\epsilon 4$ (8.9%) et $\epsilon 2$ (7.2%), le génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ est le plus fréquent (69.4%) suivie par $\epsilon 3/\epsilon 4$ (15.3%), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (13.7%) et moins fréquent pour les génotypes $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, et $\epsilon 2/\epsilon 2$. Les génotypes $\epsilon 3/\epsilon 4$ et $\epsilon 4/\epsilon 4$ sont fortement exprimés chez les MA (36.5%) et (9.5%) respectivement.

Le cholestérol et le C-LDL sont légèrement augmentés alors que les taux de C-HDL sont légèrement diminués dans les deux sexes. Aucun changement des taux des TG entre malades et témoins n'est observé.

Les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ et $\epsilon 3/\epsilon 4$ présentent une association significative vis-à-vis de la survenue de l'MA comparativement aux sujets $\epsilon 3/\epsilon 3$ avec un odds ratio 5.01 [95% CI, 2.36–10.71] $p < 0.001$ et 3.86 [95% CI, 1.72–8.72] $p < 0.001$ respectivement. Les sujets ayant l'allèle $\epsilon 2$ ne présentent pas de différence significative par rapport aux homozygotes $\epsilon 3/\epsilon 3$ en ce qui concerne son implication dans la MA. Ces résultats mettent en évidence, l'effet délétère de l'allèle $\epsilon 4$ et sa contribution comme facteur de risque dans la MA. Alors que l'effet protecteur de l'allèle $\epsilon 2$ est moins évident.

Aucune association n'a été retrouvée entre la mutation MTHFR C677T et la MA. L'allèle T de la MTHFR et $\epsilon 4$ de l'ApoE peuvent agir en synergie pour augmenter le risque de la MA.

Notre étude ne trouve pas de relation entre la maladie d'Alzheimer et le taux de cortisol (17.13 ± 7.35 vs. 19.56 ± 13.6 $\mu\text{g/dl}$). Cependant des études ont généralement montré des niveaux de cortisol plus élevés et des niveaux de DHEAS plus faibles chez des patients souffrant de maladie d'Alzheimer, en même temps qu'un faible rapport DHEAS sur cortisol. La démence était davantage liée à de faibles niveaux de DHEAS qu'à des niveaux élevés de cortisol.

L'homocystéine est élevée chez les malades par rapport aux témoins ($23.8 \pm 10.2^*$ vs. 17.4 ± 8.6 $\mu\text{mol/l}$). Le risque relatif de démence était de 1.4 (95% CI, 1.1 à 1.9) pour chaque élévation d'une déviation standard du taux d'homocystéine. Un taux d'homocystéine plasmatique supérieur à 14 micromoles par litre est associé à un doublement du risque de maladie d'Alzheimer.

Nous retrouvons une nette augmentation de l'insulinémie ($10.1 \pm 13.1^{**}$ vs. 6.85 ± 6.45 $\mu\text{U/ml}$). Le syndrome d'insulino-résistance caractérisé par une élévation de l'insulinémie avec activité réduite et une réduction du niveau d'insuline cérébral, a été retrouvée associée avec la baisse des capacités mnésiques – âge dépendant et la M.A.

Mots clés: ApoE, polymorphisme, maladie d'Alzheimer, lipoprotéines, cholestérol, cortisol.

Summary

The main of this study is to explore the impact of the ApoE polymorphism and lipid profile on the Alzheimer's disease (AD) in a sample of Constantine population.

The ApoE frequencies in the control group were $\epsilon 3$ (83.9%), $\epsilon 4$ (8.9%) and $\epsilon 2$ (7.2%). The genotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ are the most frequent (69.4%) followed by $\epsilon 3/\epsilon 4$ (15.3%), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (13.7%) and less frequent for genotypes $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ and $\epsilon 2/\epsilon 2$, The genotype $\epsilon 3/\epsilon 4$ and $\epsilon 4/\epsilon 4$ are more expressed in AD subjects with frequencies of (36.5%) and (9.5%) respectively.

Cholesterol and LDL-cholesterol were softly decreased, whereas HDL- C was decreased in men and women. No change was observed in the TG levels.

The carriers of allele $\epsilon 4$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ subjects compared with $\epsilon 3/\epsilon 3$ are associated with an increasing incidence of AD with (odds-ratio) 5.01 [95% CI, 2.36–10.71] $p < 0.001$ and 3.86 [95% CI, 1.72–8.72] $p < 0.001$, respectively.

The subjects having $\epsilon 2$ doesn't present a significant difference with homozygote $\epsilon 3/\epsilon 3$ with regard to its implication in the AD.

These results put in evidence the deleterious effect of the allele $\epsilon 4$ and its contribution as risk factor in the AD, whereas the protective effect of the allele $\epsilon 2$ is less evident.

No significant association of *MTHFR* C677T allele and genotype with AD was observed in total samples. The *MTHFR* 677 T allele and the *APOE* $\epsilon 4$ allele may synergistically act to increase the risk of AD.

Our study does not find a relation between the AD and the cortisol rate (17.13 ± 7.35 vs. 19.56 ± 13.6 $\mu\text{g/dl}$). However studies generally showed higher cortisol levels and weaker levels of DHEAS among patients suffering from AD, at the same time as a weak report/ratio DHEAS on cortisol. Dementia was more related to low levels of DHEAS than to cortisol elevated levels.

Our study finds an increase in the homocysteine level among patients compared to the controls ($23.8 \pm 10.2^*$ vs. 17.4 ± 8.6 $\mu\text{mol/l}$). The relative risk of dementia was of 1.4 (95% CI, 1.1 to 1.9) for each rise in a standard deviation of the homocysteine rate. A homocysteine plasmatic rate superior on 14 micromoles per liter is associated with a doubling of the AD risk.

We find a clear increase in the insulinemia ($10.1 \pm 13.1^{**}$ vs. 6.85 ± 6.45 $\mu\text{U/ml}$). The insulin-resistance syndrome characterized by a rise in the insulinemia with reduced activity and a reduction of the cerebral insulin level - was associate with the fall of the amnesic capacities - age depending and the M.A.

Keywords: ApoE, polymorphism, Alzheimer disease, lipoprotein, cholesterol, cortisol.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة تأثير البولي مورفيزم للبروتين الشحمي ApoE وتعيين الأثر الناتج عن تركيز الدم المصلية في مرض الزهايمر وكذلك تركيز نسبة السكر والأنسولين والكورتيزول عند عينة من سكان قسنطينة . أوضحت نتائج الدراسة أنّ توزيع نسب الأليلات في عينة السكان بصفة عامة لمدينة قسنطينة هي كالتالي 3 ε (83.9 %) ، 4ε (8.9%) و 2 ε (7.2%) ذو النمط الوراثي 3/ε3 يتواجد بكثافة في العينات المدروسة (70.9%) متبوعا ب 4/ε3 (18.8%) ثم 2/ε3 ب (7.9%) . و اقل انتشارا 4/ε4 ، 2/ε2 و 4/ε4 ، النمط الوراثي 3/ε4 و 4/ε4 يتواجد في العينة المريضة بنسبة و (36.5%) و (9.5%) علي التوالي.

. تركيز الكلسترول LDL و الكلسترول الكلي في ارتفاع طفيف عند الصفة المصابة ، بينما أن نسب الكلسترول HDL في انخفاض طفيف عند الرجال و النساء المصابين. لم يلاحظ أي تغيير في تركيز الجليسيرايدهات الثلاثية.

الحاملين للآليلات 4ε و 3ε/4 يعتبرون أكثر إصابة بمرض الزهايمر بالمقارنة للحاملين للنمط الوراثي 3ε/3 وذلك الارتفاع (odds ratio) بنسبة 5.01 [95% CI, 2.36–10.71] <0.001 و 3.86 [1.72–8.72] ، p<0.001 [95% CI] على التوالي.

الحاملين للآليل 2 ε لا يمثلون اختلافا كبيرا و دلالة مقارنة للحاملين للنمط الوراثي المتجانس 3ε/3 فيما يخص الإصابة بالمرض MA. هذه الدراسة تؤكد اثر الجيني للبروتين الشحمي ApoE والليل 4ε على مرض الزهايمر . حيث أن اثر 2ε كعاملا حاميا منها غير موجود .

من ناحية أخرى لم توجد أي علاقة التغيير النمطي MTHFR677T و مرض الزهايمر . الليل T لل MTHFR و 4ε للابروتينين APOE يمكن أن يتعاونوا لرفع نسبة الإصابة بالمرض MA.

هذه الدراسة لم تجد أي علاقة بين مرض الزهايمر و كمية الكورتيزول (13.6±19.56 vs 7.35±17.13) μg/dl. في حين بعض الدراسات على العموم اثبتت نسب عالية من الكورتيزول و نسب منخفضة من DHEAS عند المرضى الذين يعانون من الزهايمر وفي نفس الوقت نسبة قليلة لـ DHEAS على الكورتيزول . نقص الذاكرة في الزهايمر كانت مرتبطة بانخفاض نسبة DHEAS وارتفاع كمية الكورتيزول .

الهوموستيين مرتفع عند المرضى مقارنة بالعينة الصحيحة (23.8 ± 10.2* vs. 17.4 ± 8.6 μmol/l) نسبة الإصابة هي (95% CI, 1.1 à 1.9) 1.4 بالنسبة لكل ارتفاع في كمية الهوموستيين . ارتفاع في الهوموستيين في البلازما إلى 14 ميكرومول في اللتر يصاحبه مضاعفة الخطر مرض الزهايمر . في هذه الدراسة تبين ارتفاع في الأنسولين (10.1 ± 6.85 ± 6.45 μU/ml) Le syndrome d'insulino-résistance 13.1** vs. من خصائصه ارتفاع نسبة الأنسولين مع نشاط مختزل ونقص في نسبة الأنسولين المخ قد وجد انه يكون مصحوب بانخفاض قدرة mnésiques – âge dépendant ومرض الزهايمر .

الكلمات الدالة: Apo E , كورتيزول , التغيير الجيني , مرض الزهايمر , كلسترول , البروتينات الشحمية