

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département d'Ecologie et Environnement

Laboratoires de recherche

- Biologie et Génétique moléculaire- Constantine
- Valorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique- Tlemcen

MEMOIRE

Présenté par

TRARI Zahia

En vue de l'obtention du

Diplôme de Magister

En Génétique moléculaire des populations humaines

Thème

**Polymorphisme génétique et risques cardiovasculaires dans la maladie
d'Alzheimer**

Soutenu le:....., devant le jury composé de:

Président	Mr KHELIL Mohamed Anouar	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	ABADI Nourredine	Professeur	Université de Constantine
Examinatrice	AOUAR Amaria	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	DALACHE Fatiha	M.C.A	Université de Mostaganem
Invité	DALI YUCEF Majda	M.C.B	Université de Tlemcen

Année universitaire: 2012-2013

Remerciements

Je témoigne que c'est par la grâce de dieu le tout puissant et miséricordieux, d'aide incessante, qu'il m'a porté et d'orientation imminente qu'il m'a accordé pour achever ce travail

Mes sincères remerciements s'adressent :

A mon encadreur Monsieur le professeur ABADI Nouredine Directeur de laboratoire de Biologie et Génétique moléculaire au CHU Constantine, d'avoir accepté de diriger ce travail et pour sa disponibilité, son orientation, ses conseils, sa gentillesse et sa générosité scientifique.

Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération et de mon profond respect.

Au professeur BENLATRACHE Cherifa Médecin chef du service de biochimie et directrice de l'unité de recherche CHU-Constantine pour m'avoir accueillie au sein de laboratoire qu'elle dirige pour réaliser ce travail.

A Monsieur KHELIL Mohamed Anouar, professeur au département d'écologie et environnement-Université de Tlemcen pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette thèse.

A Madame AOUAR Amaria, professeur au département d'écologie et environnement-Université de Tlemcen pour avoir bien voulu examiner ce travail et plus particulièrement pour sa gentillesse et pour tous les efforts qu'elle a déployé durant toute la période de notre formation de magistère en tant que responsable.

Soyez assurée de toute mon estime et de mon profond respect.

A Madame DALACHE Fatiha, maitre de conférence à l'université de Mostaganem pour sa participation au jury et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

A Madame DALI YUCEF Majda, maitre de conférence au département d'écologie et environnement-Université de Tlemcen pour avoir bien accepté de faire partie du jury.

Au Madame SATTA Dalila professeur au département des sciences de la nature et de la vie et responsable de la filière de Génétique pour sa générosité, son aide, son orientation, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Aux Docteurs SARRADJ Fatima, M'ZAHEM Abd Errahim et Dr Psychologue Gamra pour leurs collaborations et d'avoir voulu accepté le recrutement des patients Alzheimer au niveau de service de neurologie CHU-Constantine, je les remercie infiniment.

A docteur SIFI Karima, Mr BOULAKROUNE Zouheir, Mr BRIHMET Ahmed, Mme Yasmina au CHU Constantine pour leur aide précieuse et disponibilité.

A tout le personnel de laboratoire de biologie et génétique moléculaire au CHU-Constantine : Dr HANACHI, Nawel, Manel, Farhat et Mme Yamina.

A tous les patients Alzheimer et leurs familles pour avoir accepté de participer dans mon travail.

A tous ceux qui ont contribué dans ma formation de près ou de loin.

Dédicace

Je dédie ce travail:

A mes très chers parents

A mon grand frère et sa femme

A ma grande sœur, son mari et ses belles petites filles

Tasnim et Ranim

A ma sœur Nesrine et mon petit frère Sife

*Merci pour tout surtout toi ma chère mère
pour votre amour, la confiance et l'énergie que vous m'aviez donnée
Vous m'aviez toujours encouragé et soutenu dans mes choix, grâce à
vous j'ai pu tracer mon chemin et aboutir à mes objectifs*

A toute ma grande famille surtout ma seule tante

A toutes mes amies surtout: Samia

A ma deuxième famille : famille de mon chère amie Ines

*Je vous remercie infiniment pour toute votre sympathie, soutien et
joie de vivre*

Liste des figures

Figure 1	Les plaques séniles observées dans la maladie d'Alzheimer à l'examen microscopique	5
Figure 2	La dégénérescence neurofibrillaire (DNF)	6
Figure 3	Schéma comparant un cerveau sain (à droite) et un cerveau de la maladie d'Alzheimer (à gauche)	7
Figure 4(a)	Voie normale de la maturation de l'APP	9
Figure 4(b)	Voie amyloïdogénique de la maturation de l'APP	9
Figure 5	L'hypothèse de la cascade amyloïde	10
Figure 6	Les différents isoformes de tau	11
Figure 7	Le modèle de l'apolipoprotéine E humaine	18
Figure 8	Position exons-introns dans le gène de l'apo E	19
Figure 9	Polymorphisme génétique du gène de l'apo E	20
Figure 10	Métabolisme de l'homocystéine	24
Figure 11	Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR	27
Figure 12	Gène, protéine et polymorphisme de la MTHFR	27
Figure 13	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% des fragments amplifiés (292pb) par PCR du gène Apo E	39
Figure 14	Digestion par Hha I des trois allèles	41

Figure 15	Profil d'électrophorèse sur gel d'acrylamide des fragments issus par clivage de HhaI présentant différents génotypes d'Apo E	43
Figure 16	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés (198pb) par PCR du gène de la MTHFR	46
Figure 17	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments issus par clivage de HinfI présentant différents génotypes de la MTHFR	47
Figure 18	répartition des malades selon le sexe	50
Figure 19	Evaluation du statu cognitif et du stade de la démence	54
Figure 20	répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes	57
Figure 21	Répartition des malades selon leur niveau d'étude	63

Liste des tableaux

Tableau I	Tailles des fragments de restriction en paire de base (Pb) correspondants aux six génotypes possibles (3 homozygotes et 3 hétérozygotes)	43
Tableau II	Répartition des malades et des témoins par tranche d'âge	51
Tableau III	Répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes	54
Tableau IV	Fréquences alléliques de l'ApoE dans les deux groupes	56
Tableau V	Calcul des odds ratio des sujets malades ayant un allèle E4, E3/E4 par rapport aux témoins ayant un génotype E3/E3	58
Tableau VI	Répartition des fréquences génotypiques et alléliques de la MTHFR C677T chez les sujet témoins et les sujets MA	60
Tableau VII	Distribution des allèles et des génotypes de la MTHFR C677T dans la maladie alzheimer	62
Tableau VIII	Fréquence des traumatismes crâniens chez les malades et les témoins	64
Tableau IX	Fréquence de la dépression chez les malades et les témoins	65
Tableau X	Fréquences des fumeurs et alcooliques chez les malades et les témoins	66
Tableau XI	Fréquence de diabète et de l'HTA chez les malades et les témoins	68
Tableau XII	comparaison des moyennes des paramètres lipidiques dans l'Alzheimer et chez les témoins	70
Tableau XIII	Variation de l'homocystéine chez les deux groupes	74

Sommaire

Abréviations

Introduction	1
Revue de la littérature	
1. Historique	3
2. Etude clinique et épidémiologique	3
2.1. Epidémiologie	3
2.2. Symptômes et évolution de la maladie	4
2.3. Diagnostic	4
3. Analyse anatomo-pathologique	5
3.1. Plaques séniles (ou plaques amyloïdes)	5
3.2. Dégénérescences neurofibrillaires (DNF)	6
4. Mécanismes moléculaires de la maladie	7
4.1. Rôle de l'APP dans la formation du peptide A β	7
4.1.1. Expression et hétérogénéité de l'APP	8
4.1.2. Catabolisme de l'APP	8
4.1.3. Hypothèse de la cascade amyloïde	10
4.2. Mécanisme de formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF)	11
5. Causes et facteurs de risque de la maladie	12
5.1. Forme héréditaire	12
5.1.1. Les mutations dans le gène APP	12
5.1.2. Gènes et mutations de la préséniline	13
5.2. Forme sporadique	14
6. Lipides	15
6.1. Les triglycérides et acides gras	15
6.2. Cholestérol	16
6.3. Lipides et maladie d'Alzheimer	16
6.4. Cholestérol et métabolisme de l'A β	16
7. Apolipoprotéine E	18
7.1. Structure de la protéine	18
7.2. Gène de l'Apo E	19
7.3. Polymorphisme génétique de l'Apo E	19

7.4. Distribution tissulaire	20
7.5. Régulation	21
7.6. Récepteur de l'Apo E	21
7.7. Rôle de l'Apo E dans le système nerveux	21
7.8. Apolipoprotéine E et maladie d'Alzheimer	22
7.9. Apo E et peptide amyloïde	22
7.10. Apo E et protéine du cytosquelette	23
8. Homocystéine	24
8.1. Homocystéine plasmatique	25
8.2. Homocystéine et maladie d'Alzheimer	25
9. MTHFR (5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase)	26
9.1. Protéine MTHFR	26
9.2. Rôle de la MTHFR	26
9.3. Gène de la MTHFR	27
9.4. Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR	28
9.5. Effet métabolique de la mutation MTHFR sur l'homocystéine et folates	28
9.6. Mutation C677T du gène de la MTHFR et maladie d'Alzheimer	30
Patients et méthodes	
1. Recrutement des sujets	31
2. Questionnaire	31
3. Prélèvement et enregistrement	32
3.1. Prélèvement	32
3.2. Enregistrement	32
4. Méthodes de dosage des paramètres lipidiques	32
4.1. Dosage du cholestérol	32
4.2. Dosage des triglycérides	33
4.3. Le cholestérol HDL	34
4.4. Cholestérol LDL	34
5. Dosage de l'homocystéine	35
5.1. Principe	35
5.2. Dosage	35
6. Extraction de l'ADN	36
6.1. Principe	36
6.2. Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN	37
7. Génotypage de l'Apo E	38

7.1. La PCR (polymérase chaîne réaction)	38
7.2. Digestion des produits de PCR	39
8. Recherche de la mutation C677T du gène codant la MTHFR	44
8.1. Principe	44
8.2. Technique	45
9. Analyse statistique	48
9.1. Statistique descriptive	48
9.2. L'enquête analytique	48
9.3. Calcul de l'odds ratio	48
9.4. Les intervalles de confiance	49
9.5. Choix de la " P value "	49
Résultats et discussion	
1. Répartition des sujets selon la pathologie et le sexe	50
2. Répartition par tranche d'âge	51
3. MMSE (Mini-Mental State Examination)	53
4. Etude génétique de l'APOE	54
4.1. Les fréquences génotypiques de l'APOE	54
4.2. Répartition des fréquences alléliques de la population d'étude	56
4.3. Association génotypiques et alléliques et maladie d'Alzheimer	58
5. MTHFR et maladie d'Alzheimer	60
6. Etude des autres facteurs de risque	63
6.1. Niveau d'étude	63
6.2. Traumatismes crâniens	64
6.3. Dépression	65
7. Etude de quelques facteurs de risque vasculaire dans la MA	66
7.1. Le tabagisme et l'alcool	66
7.2. Le diabète et l'hypertension artérielle (HTA)	68
7.3. Etude du profil lipidique	70
7.4. Homocystéine et maladie d'Alzheimer	74
Conclusion	75
Références bibliographiques	77
Annexes	

Abréviations

A β : Peptide β Amyloïde

ACAT : Acyl-CoA Cholesterol Acyl Transferase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AG : Acide Gras

AGPI: Acides Gras Poly-Insaturés

Apo : Apoprotéine

APP : Amyloïd Protein Precursor

Apps : App Secréte

AVC: Accident Vasculaire Cérébral

BBP : bleu de bromophénol

BET : Bromure d'éthidium

CBS : Cystathionine β Synthétase

CE : Cholestérol Estérifié

CL : Cholestérol Libre

CT : Cholestérol Total

DNF : Dégénérescences Neurofibrillaires

DNID : Diabète Non Insulino-Dépendant

DNTP : Désoxyribonucléotides Triphosphates

DO : Densité Optique

DSM-IV : Diagnostic and Statistical Manual revision 4

DV : Démence Vasculaire

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

FAD : Flavin Adénine Dinucléotide

Hcy : Homocystéine

Hhcy : Hyperhomocystéinémie

HDL: high density lipoprotein

HTA : Hypertension Artérielle

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LDL: Low Density Lipoprotein

MA : Maladie d'Alzheimer

MMSE : Mini Mental Status Examination

MTHFR : La 5,10-Méthylène Tétrahydrofolate réductase

Met : Méthionine

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFH : Paires de Filaments Hélicoïdaux

PM : Poids Moléculaire

PS : Plaques Séniles

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SAH : S-Adénosyl-L-Homocystéine

SAHH : S-Adénosyl-L-Homocystéine Hydrolase

SAM : S-Adénosyl Méthionine

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Tau: Tubule Associated Unit

TG: Triglyceride

tHcy : Homocystéine Totale

UV : Ultra violet

THF : Tétrahydrofolate

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Introduction

La maladie d'Alzheimer est l'affection la plus répandue d'un vaste ensemble de maladies que l'on appelle « maladies neurodégénératives ». Il s'agit d'une maladie cérébrale irréversible, caractérisée par une détérioration des facultés cognitives et de la mémoire, causée par la dégénérescence progressive des cellules du cerveau, c'est une affection hétérogène tant sur le plan clinique que génétique, son expression est le résultat de multiples facteurs génétiques et environnementaux (David et al, 1997).

La prévalence de cette pathologie augmente de façon exponentielle avec l'âge. Avec l'allongement de l'espérance de vie et le vieillissement progressif de la population, elle est devenue un problème majeur de santé publique.

Le déterminisme génétique de cette pathologie est multiple. On différencie d'une part les formes familiales des formes sporadiques et d'autre part celles à début précoce (avant 65 ans) des formes à début tardif. Les formes familiales à début précoce ont un déterminisme mendélien simple.

Plus de 90% des cas sont de type sporadique à début tardif, dans ces formes la maladie est alors multifactorielle et certains allèles de gènes peuvent constituer des facteurs de risque. Les premières études de liaison ont montré une association entre ces formes à début tardif et le chromosome 19. Parmi les gènes candidats situés au niveau du locus cible, celui de l'apolipoprotéine E (apo E) apparaît associé à la maladie.

De nombreuses études ont montré que l'allèle $\epsilon 4$ de l'Apo E est un facteur de risque pour cette maladie et qu'il existerait une relation entre le nombre d'allèles $\epsilon 4$ et l'incidence de la MA, le risque de développer la maladie est multiplié par 3 pour un hétérozygote et par 8 pour un homozygote $\epsilon 4$ (Dulcire, 2002).

Un autre gène se trouve actuellement incriminé dans un grand nombre de pathologie dont la MA : il s'agit du gène de MTHFR (la 5,10 méthylène tétrahydrofolate réductase), enzyme clé du métabolisme des folates.

La concentration d'homocystéine plasmatique dépend pour une part notable de polymorphisme de ce gène.

De récentes études sur l'épidémiologie et la pathogénie de la maladie ont suggéré l'existence d'un lien puissant entre facteurs de risque vasculaires, pathologie cérébrovasculaire et maladie d'Alzheimer. De plus, il a été suggéré que si ces facteurs de risque vasculaires étaient présents à l'âge mûr, ils pouvaient augmenter le risque d'apparition d'une maladie d'Alzheimer à début tardif. Il y a actuellement de nombreuses preuves sur le rôle que peuvent jouer les facteurs vasculaires dans la MA ou dans la démence mixte (maladie d'Alzheimer et lésions vasculaires cérébrales) (Amouyel, 2000 ; Alagiakrishnan, 2007).

Notre étude a pour objectifs :

- Déterminer les différents facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer (HTA, diabète, traumatisme crânien, dépression) présents chez les patients atteints de MA, et les comparer à ceux des sujets témoins.
- Etablir une évaluation des paramètres biochimiques et biologiques (Cholestérol, triglycérides, C-HDL, C-LDL et Homocystéine) présents chez les deux groupes malades et témoins et faire la comparaison entre les deux.
- Déterminer les génotypes de l'ApoE, de la MTHFR (C677T), les fréquences alléliques $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ et C, T du groupe de sujets atteints MA et les comparer avec ceux de groupe de sujets témoins.
- Apprécier l'association entre ces différents facteurs et la maladie d'Alzheimer.

1-Historique

A la fin du XIX^{ème} siècle, l'état de démence du sujet âgé était considéré par la grande majorité des psychiatres comme habituel et lié à l'usure normale du temps.

En 1906, 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 et des troubles de l'orientation. En 1911, Alzheimer découvrait un cas identique au premier cas. Cette pathologie porte le nom d'Alzheimer, du nom de son découvreur.

Dans les années 70, les chercheurs isolent les neurotransmetteurs. 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 (Girard et al, 2000 ; Fouche, 2008).

2- Etude clinique et épidémiologie

2.1- Epidémiologie :

Les formes à début tardif (65 ans et plus) représentent l'essentiel des cas. Leur fréquence augmente de façon exponentielle avec l'âge. Ainsi, l'incidence est faible avant 65 ans puis double toutes les tranches de 5 ans d'âge. En France, l'incidence est de 0.24% pour la tranche 65-69 ans et passe à 4,29% chez les 85-89 ans (données de l'étude PAQUID, étude de cohortes en Aquitaine, Dordogne et Gironde depuis 1989). La prévalence est proche de 0 avant 60 ans. Elle passe à 4% après 65 ans et est estimée à près de 30% après 85 ans (Fouche, 2008).

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. (Hammadi, 2009).

2.2-Symptômes et Evolution 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 » (Coudere, 2000).

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, familles, amis.....). (Inpes, 2005).

2.3. Diagnostic :

En absence de marqueurs diagnostiques fiables de la maladie d'Alzheimer, seule l'étude anatomopathologique du cerveau permet le diagnostic de certitude. Ce diagnostic est réalisé 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.

La stratégie diagnostique repose sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques, réalisant un diagnostic d'exclusion en éliminant les autres affections qui présentent des tableaux proches et qui seraient susceptibles de bénéficier de traitements spécifiques (tumeurs, hématome ou accident vasculaire cérébral) (Bianchetti et al, 2001).

Des critères répondant à une standardisation internationale (comme ceux du DSM-IV (Lebert et al, 1999) et ceux de Mc khann et al (NINCDS-ADRDA) par l'utilisation des tests comme le MMSE (Mini Mental State Examination) (Forstl et al, 1999), permet de retenir le diagnostic de maladie d'Alzheimer possible ou probable avec une probabilité comprise entre 90 et 95 % (Bianchetti et al, 2001 ; Lechowski et al, 2004).

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 (Pasquier et al, 1994).

3- Analyse anatomo-pathologique

3.1- Les plaques séniles (ou plaques amyloïdes) :

Ces plaques, sont essentiellement localisées dans le néocortex et l'hippocampe, correspondent à l'accumulation extracellulaire d'une substance amyloïde, constitués de filaments de protéine amyloïde A β (longue de 39 à 43 acides aminés), . Cette protéine APP en participant à l'interaction entre les cellules joue un rôle essentiel, concernant la croissance cellulaire et la plasticité neuronale. L'accumulation de peptides A β dans le milieu extracellulaire entraînerait des altérations des membranes cellulaires avec entrée massive de calcium dans la cellule et réaction inflammatoire par activation microgliale. Ces lésions entraîneraient la mort neuronale par nécrose ou par apoptose (Divry, 1927) (figure 1).

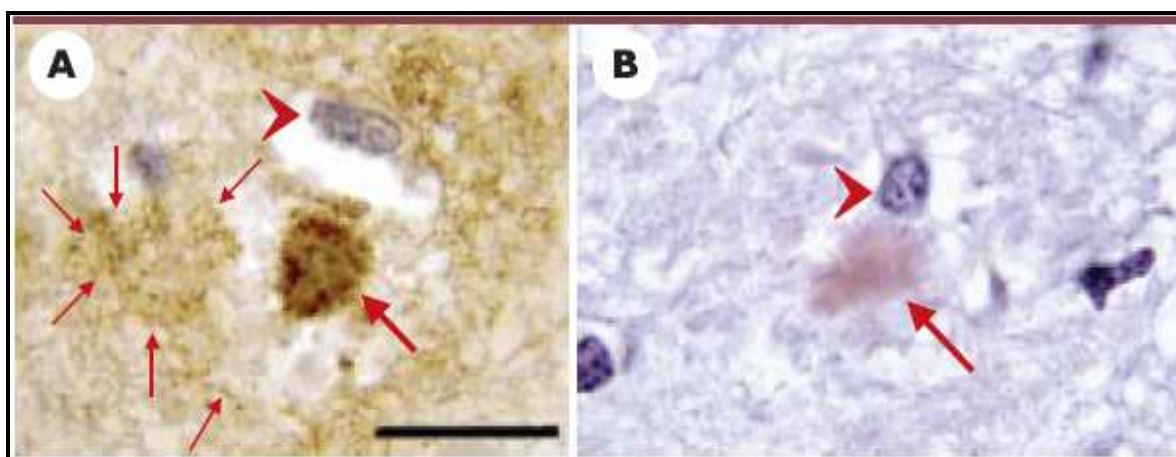


Figure 1 : les plaques séniles observées dans la maladie d'Alzheimer à l'examen microscopique.
- **A** : plaque sénile ; immuno-histochimie du peptide A β . Un dépôt dense de peptide A β (grande flèche) occupe le centre de la plaque sénile. Elle est entourée d'une couronne claire (correspondant aux prolongements nerveux), puis d'un halo de dépôt diffus (petites flèches). Un noyau de macrophage est marqué par une tête de flèche. -**B** : Plaque sénile colorée par le rouge Congo, colorant qui se fixe sélectivement sur les substances amyloïdes. La partie amyloïde de la plaque sénile (correspondant au centre dense de la photo A) est indiquée par une flèche. La tête de flèche marque le noyau d'un macrophage (Dhenain et al, 2002).

Une autre conséquence de l'accumulation de matériel protéique amyloïde dans la paroi des vaisseaux cérébraux, c'est l'Angiopathie amyloïde, caractérisée par des hémorragies et des ramollissements cérébraux récidivants (Allsop et al, 1986).

3.2-Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) :

Alors que les plaques séniles sont observées à l'extérieur des cellules nerveuses, les dégénérescences neurofibrillaires sont présentes à l'intérieur des neurones.

Il s'agit d'enchevêtrements de fibrilles dans le corps cellulaire des neurones. Le principal constituant de ces enchevêtrements est la protéine Tau, molécule du cytosquelette (ensemble de protéines permettant les mouvements cellulaires) dont le rôle est de stabiliser les microtubules (fibrilles permettant le transport de vésicules). Les protéines Tau retrouvées dans le cerveau des malades sont hyperphosphorylées. Alors qu'une protéine Tau normale compte 2 ou 3 groupements phosphate, celles des malades d'Alzheimer en ont 5 à 9. La protéine Tau hyperphosphorylée ne peut plus remplir sa fonction normale. Le blocage du transport réalisé par les microtubules conduirait à la mort cellulaire.



Figure 2 : la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) (Tomassoli, 2010)

Ainsi la perte neuronale et synaptique pendant la maladie induit l'atrophie cérébrale qui s'accompagne d'une dilatation du système ventriculaire, un agrandissement des espaces périvasculaires et un élargissement des sillons corticaux (figure 3) (Kosik et al, 1986 ; Terry et al, 1991).

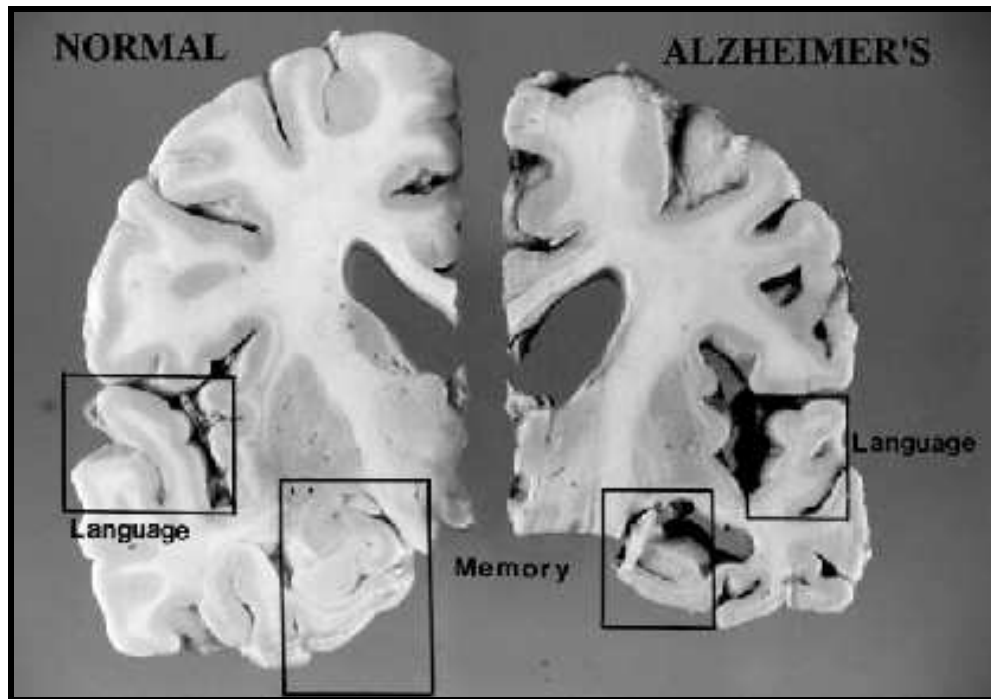


Figure 3 : Schéma comparant un cerveau sain (à droite) et un cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer (à gauche). (Luckner et al, 2003)

4- Mécanismes moléculaires de la maladie

4.1- Rôle de l'APP dans la formation du peptide A β :

La découverte du composant principal des dépôts amyloïdes, le peptide A β , placé ce dernier au centre du processus pathologique.

De fait, la recherche de la protéine et donc du gène dont est issu ce peptide, s'est avérée essentielle. C'est après purification et séquençage du peptide A β que celui-ci a pu être cloné et dénommé gène précurseur du peptide amyloïde (APP).

La protéine précurseur de l'amyloïde (APP) est une protéine transmembranaire qui peut subir plusieurs clivages par des sécrétases et donner lieu à différents peptides. Certains peptides sont sécrétés et peuvent engendrer une activation de transcription. D'autres sont à l'origine de la formation des plaques amyloïdes que l'on retrouve dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

4.1.1- Expression et Hétérogénéité de l'APP :

Le gène de l'APP fut le premier gène connu pour être associé à une forme familiale de la MA. Il est localisé sur le bras long du chromosome 21 en position 21q21.2, il appartient à la famille des gènes domestiques ubiquitaires exprimés dans une variété de tissus dont le système nerveux, le sang, le tractus digestif et la peau, l'APP est très répandu dans l'organisme (Chatier et al, 1991). La partie transcrite du gène de l'APP est constituée de 18 séquences exoniques par l'épissage alternatif (splicing) donne plusieurs ARNm, aboutissant à la transduction de différentes isoformes de protéines APP (Yoshikai et al, 1991). Ces protéines sont soumises à diverses modifications post-traductionnelles, telles que des O- et N-glycosylations, des sulfatations ou des phosphorylations (Hung et al, 1994).

L'une des isoformes majoritaires du cerveau est l'APP 695, aurait une expression principalement neuronale (Weidemann et al, 1989).

4.1.2- Catabolisme de l'APP :

Le domaine de l'APP qui correspond au peptide A β se situe à la jonction des domaines extracellulaires et membranaires. L'APP est métabolisée de façon constitutive via deux voies biologiques : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (Kang et al, 1987). Ces 2 voies se distinguent l'une de l'autre essentiellement par le type d'enzymes impliquées dans le clivage de l'APP, et par les métabolites (fragments) qu'elles engendrent.

▪Voie non- amyloïdogénique de maturation de l'APP :

La voie non amyloïdogénique fait intervenir une activité α -sécrétase qui coupe l'APP au milieu de la séquence correspondant à l'A β , permettant 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 pas donc de protéine β -amyloïde (Figure 4.a). (Lammich et al, 1999)

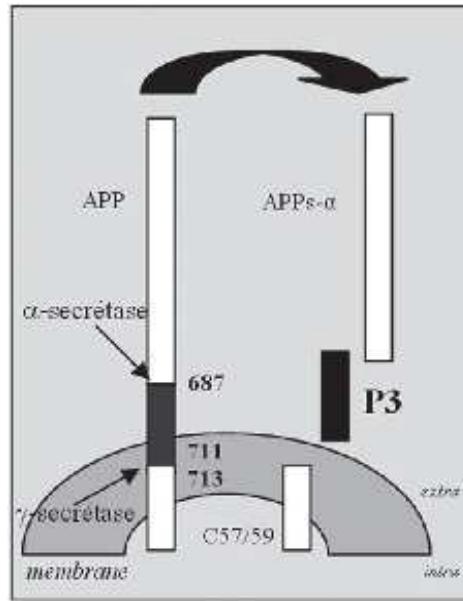


Figure 4 (a) : voie normale de la maturation de l'APP (Govaerts et al, 2007)

▪ **Voie amyloïdogénique de maturation de l'APP :**

Dans cette voie de maturation, le clivage de l'APP se fait en premier par une protéase lysosomiale la β -Sécrétase. La coupure de l'APP par la β -sécrétase se fait entre les AA 671 et 672 de l'APP ; cette réaction libère un domaine extracellulaire, l'APPs- β , et un fragment carboxyterminal transmembranaire de 99 AA, le C99. Ce fragment contient la région correspondante à la partie aminoterminal du peptide A β qui sera par la suite clivé par la γ -sécrétase. Il apparaît alors 2 fragments : l'APP soluble β (APPs β) et les peptides A β (Figure 4.b). (Vassar et al, 1999)

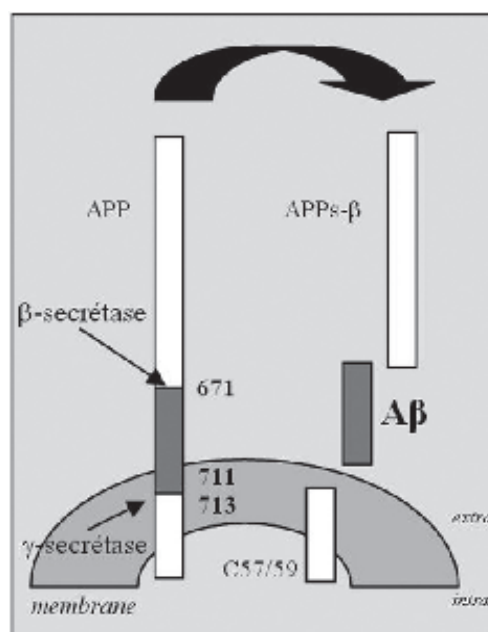


Figure 4 (b) : voie amyloïdogénique de la maturation de l'APP (Govaerts et al ; 2007)

4.1.3- 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, dans laquelle un déséquilibre entre les mécanismes de production et les mécanismes de dégradation/évacuation de l'A β serait à l'origine de son agrégation (Joachim et al, 1992). (Figure 5)

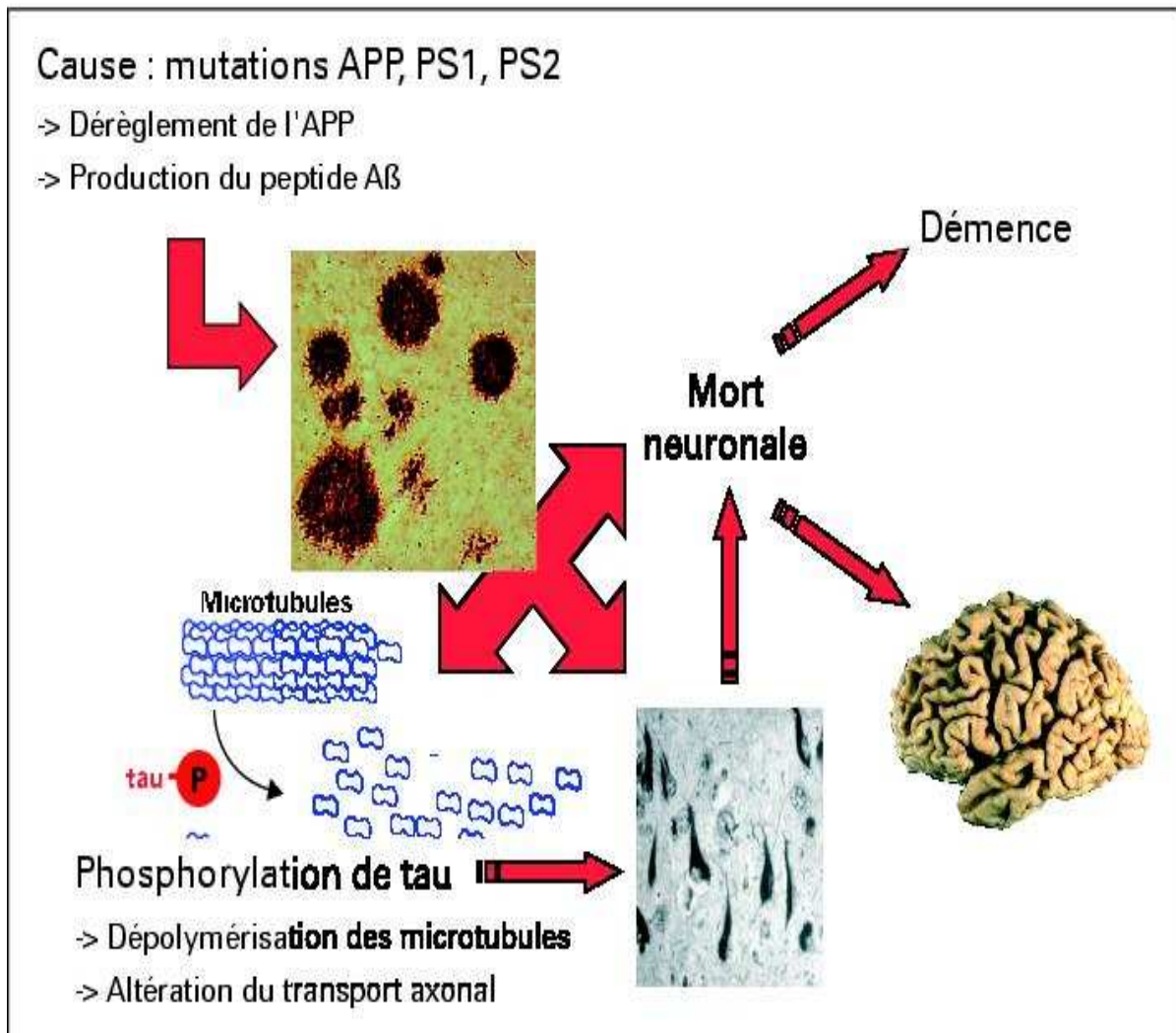


Figure 5 : L'hypothèse de la cascade amyloïde. Les perturbations du métabolisme du précurseur du peptide amyloïde (APP) conduisent à la production du peptide A β et son agrégation sous forme de dépôts amyloïdes. La substance amyloïde conduit à la phosphorylation de la protéine tau, à la dégénérescence neurofibrillaire 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. (Buée et al, 2006).

5- Causes et facteurs de risque de la maladie

Les causes du développement de la pathologie diffèrent dans les deux formes (héréditaire et sporadique) malgré l'apparition commune des deux types de lésions caractéristiques de la maladie et des symptômes qui s'en suivent.

5.1- Forme héréditaire :

Après l'âge, l'hérédité est le facteur de risque le plus important. Les études de populations de jumeaux indiquent que sa fréquence est plus élevée chez les jumeaux monozygotes que chez dizygotes, et les études de famille suggèrent une importante composante génétique, dans laquelle la maladie d'Alzheimer est transmise de manière autosomique dominante avec une pénétrance complète (familial AD, FAD) (Govaerts et al, 2007).

Grâce à des études d'analyse de liaison génétique, et les méthodes du clonage positionnel, les gènes impliqués dans la genèse de la maladie ont été isolés. Ces gènes présentent des mutations majoritairement faux-sens ont été répertoriées sur le gène de la préséniline 1 (PS1), de la préséniline 2 (PS2), et sur le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Govaerts et al, 2007 ; Totowa).

5.1.1- mutations dans le gène précurseur amyloïde :

À ce jour, 23 mutations sur le gène de l'APP ont été décrites dont 19 associées sans ambiguïté à une maladie d'Alzheimer ou à des démences liées à des hémorragies cérébrales. Ces mutations se trouvent toutes au niveau ou à proximité des sites de coupures des sécrétases conditionnant le métabolisme de l'APP et donc la production des peptides amyloïdes (A β). Par ailleurs, outre ces mutations ponctuelles, une duplication du gène de l'APP a aussi été décrite comme responsable de certaines formes autosomiques dominante.

Cette observation implique qu'une sur-expression importante du gène de l'APP serait en soi un facteur suffisant pour développer une maladie d'Alzheimer. Une recherche active pour caractériser des mutations ou polymorphismes dans le promoteur du gène de l'APP est d'ailleurs actuellement développée (Amieva et al, 2007).

5.1.2- gènes et mutations de la préséniline :

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 (Levy-Lahad et al, 1995 ; Sherrington et al, 1995).

En 1995, le gène préséniline-1 (PS1) fut identifié et associé au développement d'une forme familiale de la maladie d'Alzheimer lorsqu'il est muté. À ce jour, plus de 100 mutations différentes sont identifiées dans le gène PS1. Elles sont dominantes, fréquentes (environ 80 % de tous les cas familiaux connus) et conduisent à une forme très agressive de la maladie, affectant les individus entre 24-50 ans.

Un large consensus bibliographique s'est développé décrivant PS1 comme participant au complexe γ -sécrétase, les mutations induisant une augmentation relative de la production de peptides $A\beta$ -42 toxiques par rapport aux peptides $A\beta$ -40.

Parallèlement à la découverte du gène *PS1*, une étude de liaison génétique sur 7 familles atteintes de formes monogéniques familiales de la maladie d'Alzheimer, démontrant ainsi l'existence d'un locus impliqué dans la pathologie, en 1q31-42. La mise en évidence d'une très forte homologie de séquence entre un ADNc issu de ce locus et le gène PS1 a alors conduit à la découverte d'un troisième gène pathogène, appelé préséniline 2(PS2).

Contrairement à PS1, les mutations dans le gène PS2 sont rares (9 mutations identifiées) et associées à une forme familiale moins agressive (entre 40-70 ans). (Amieva et al, 2007). Les présénilines sont impliquées dans la formation du complexe à activité γ -sécrétase capable de protéolyser l'APP (donnant le peptide $A\beta$ présent dans les plaques séniles), les stratégies thérapeutiques visant à diminuer l'activité γ -sécrétase afin de réduire la production d' $A\beta$ ne semblent pas dénuées de risques d'effets secondaires majeurs (par exemple, une immunodéficience) (Selkoe, 2002).

5.2- Forme sporadique :

La majorité des cas diagnostiqués pour la maladie d'Alzheimer, soit environ 90%, sont sous la forme sporadique. Le facteur de risque majeur est l'âge. Il s'agit là du facteur de risque le plus important. La maladie se déclare en général autour de 60/70 ans.

Beaucoup de risque ont été suggérés, sans qu'aucune preuve certaine n'ait été apportée à ce jour :

-Le sexe féminin, (En France, on compte 40 % de malades parmi les personnes de plus de 90 ans et 20 % pour les personnes âgées de 80 et 84 ans. Les femmes sont plus touchées, peut-être au regard d'une espérance de vie plus longue que celle des hommes (Moreaud, 2004).

-Les antécédents de traumatisme crânien, des personnes qui ont été victimes d'un traumatisme crânien, ou de blessures à la tête accompagnées d'une perte de conscience, courent un risque accru de souffrir de la maladie d'Alzheimer (études effectuées sur des boxeurs).

-Comme cause de nombreuses maladies, le stress, la dépression et l'isolement peuvent aussi entraîner la maladie d'Alzheimer.

-Les facteurs de risque cardiovasculaires, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) augmentent non seulement le risque de démence vasculaire mais également de maladie d'Alzheimer. De même, l'hypertension artérielle, le diabète de type II, un taux élevé de cholestérol, peuvent aussi être un terrain favorable au développement de la maladie. (Ferland, 2003).

-Certains agents chimiques ou physiques ont été incriminés les solvants, l'aluminium (toxicité chronique), le plomb, champs électriques ou magnétiques. Aucun d'entre eux ne paraît, actuellement représenter un risque sérieux.

Pour ces personnes atteintes, un nombre inconnu de facteurs génétiques et environnementaux agissent indépendamment ou en concert pour le développement de la maladie dite multifactorielle. En 1993, le gène codant pour l'apolipoprotéine E a été associé à la maladie d'Alzheimer sous forme sporadique (Ferland, 2003).

6- 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 (Guy, 1999).

Les lipides majeurs dans le corps sont les triglycérides (TG), le cholestérol libre (CL), le cholestérol estérifié (CE) et les phospholipides (Adlersberg, 1955).

6.1- 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. Les triglycérides sont dégradés en glycérol et acides gras libres, ces derniers libérés dans le sang et transportés aux tissus, ils peuvent être captés par le foie et les muscles, ou ils seront oxydés en acétyl-CoA (Brown et al, 1981).

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.

Les AGPI (acides gras poly-insaturés) 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 (Kris-Etherton et al, 2002).

À côté de ces hypothèses vasculaires, le rôle des AGPI dans l'inflammation pourrait également expliquer leur effet sur le vieillissement cérébral. En effet, de nombreux travaux ont montré une association entre neuro-inflammation et pathologie neurodégénérative (Floyd, 1999). 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.

6.2- 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 (Mann et al, 2000). Compte tenu de ces multiples fonctions, il n'est pas surprenant que des déficiences du métabolisme du cholestérol soient à l'origine de graves maladies (Vanier, 1999). Cependant, peu de données existent sur le rôle du cholestérol dans le système nerveux.

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 (Dietschy et al, 2001).

6.3- Lipides et maladie d'Alzheimer :

Le lien entre le métabolisme lipidique et risque de maladie d'Alzheimer est extrêmement controversé. 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 (Notkola et al, 1998).

Les études épidémiologiques suggèrent que les patients MA présentent un profil lipidique plasmatique avec des taux élevés de cholestérol total, et de cholestérol-LDL (Jarvik, 1995) et des taux bas de cholestérol-HDL.

D'après plusieurs études des taux élevés de cholestérol plasmatique peut contribuer dans la pathogenèse de la MA.

6.4- Cholestérol et métabolisme de l'A β :

Les études utilisant des modèles animaux, montrent une forte connexion entre les niveaux du cholestérol plasmatique et la génération de la protéine amyloïde. Les premières preuves expérimentales ont été publiées par Sparks et ces collaborateurs en 1994 (Vazquez et al, 1998) ils ont montré que l'alimentation des lapins avec un régime riche en cholestérol pendant 8 semaines provoque l'accumulation intracellulaire des A β dans les neurones de l'hippocampe.

En plus des études sur les animaux, de fortes preuves biochimiques supportent le rôle direct du cholestérol intracellulaire dans la génération et la déposition de la protéine amyloïde, les changements dans les propriétés membranaires, incluant sa rigidité et sa fluidité, ont été suggérés pour influencer la capacité de la membrane à lier des protéines et des enzymes, incluant les sécrétases.

Une grande quantité de cholestérol dans les domaines membranaires (lipid raft), qui sont les régions membranaires où sont localisés ses enzymes, facilite la liaison de la β et γ sécrétase avec leurs substrats l'APP dans une configuration optimum, et de ce fait promouvoir le clivage pathogénique indésirable du précurseur amyloïde (Wahrle et al, 2002).

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 (Gibson Wood et al, 2003). Le vieillissement ainsi que le génotype apo $\epsilon 4$ sont parmi les facteurs causant la diminution du ratio entre le cholestérol du feuillet interne et externe (Igbavboa et al, 1996). Certaines statines peuvent augmenter ce ratio en diminuant le cholestérol du feuillet externe (Hayashi et al, 2002).

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 co-enzyme A cholestérol acyltransferase (ACAT) qui 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.

L'augmentation sélective de l'ester de cholestérol augmente sa génération. Un inhibiteur compétitif de l'ACAT dans plusieurs lignée cellulaires et neurones primaires réduit la biosynthèse de l'ester de cholestérol et la génération de l'A β , augmente la concentration du cholestérol libre (Hayashi et al, 2002).

7- Apolipoprotéine E

L'apolipoprotéine E (apo E) est une protéine ubiquitaire, jouant un rôle dans le transport du cholestérol et des phospholipides. 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**. Des études génétiques ont montré que l'apo E intervenait dans la maladie d'Alzheimer, en tant que facteur de risque (pour l'allèle $\epsilon 4$) ou protecteur (pour l'allèle $\epsilon 2$). La possibilité de son intervention dans la maladie d'Alzheimer a multiplié les études concernant son rôle au sein du système nerveux et son implication dans les processus neuropathologiques (Soulié, 2004).

7.1- Structure de la protéine :

L'apo E comporte deux domaines structuraux correspondant à deux domaines fonctionnels, qui peuvent être individualisés par clivage à la thrombine (Wilson et al, 1991) (figure 7).

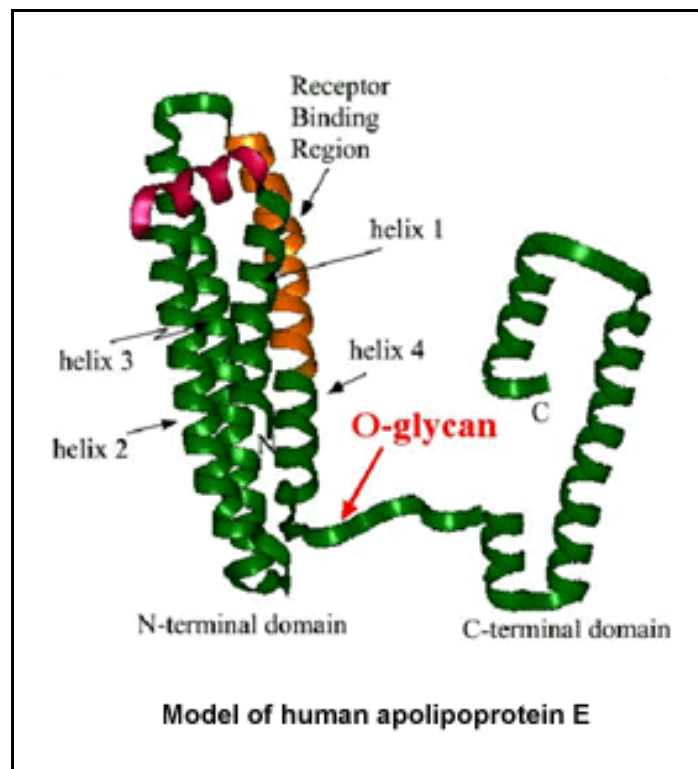


Figure 7 : le modèle de l'apolipoprotéine E humaine (Wilson et al, 1991)

La partie N-terminale (1-191) (22 kDa) comporte un domaine riche en acides aminés basiques (lysine et arginine) qui représente un site de fixation à l'héparine (142-147) et de liaison avec le récepteur LDL (141-155). Les résidus basiques forment un domaine de charges positives qui va interagir avec les charges négatives des récepteurs LDL (Hixson et al, 1990).

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). La partie située entre ces deux domaines fonctionnels est une région de structure non ordonnée, sensible au clivage protéasique, et contenant un site potentiel d'attache glycanne. Bien que les deux domaines (N-terminal et C-terminal) soient indépendants, chacun peut avoir une influence sur les propriétés de l'autre (Wilson et al, 1991 ; Hixson et al, 1990).

7.2- Gène de l'Apo E :

Le gène de l'apo E est 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 (Olaisen et al, 1982).(figure 8)

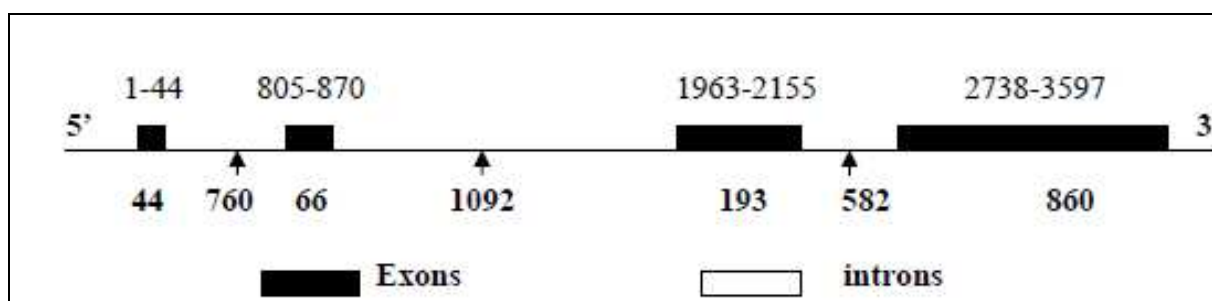


Figure 8: Position exons-introns dans le gène de l'apo E (Narayanaswami et al, 2001)

7.3- Polymorphisme génétique de l'Apo E :

Le polymorphisme génétique de l'apo E comporte 3 allèles (ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4) codant pour 3 formes de l'apo E structurellement et fonctionnellement différentes (E2, E3, E4) (Zannis et al, 1981).

Les allèles de l'Apo E se transmettent de façon codominante. Chaque individu possède 2 allèles, et les combinaisons possibles de ces allèles dans la population donnent 6 phénotypes différents : trois homozygotes (ϵ_2/ϵ_2 , ϵ_3/ϵ_3 , ϵ_4/ϵ_4) et trois hétérozygotes (ϵ_4/ϵ_2 , ϵ_3/ϵ_2 , ϵ_4/ϵ_3) (Zannis et al, 1981 ; Zannis et al, 1982 ; Utemann et al, 1982).

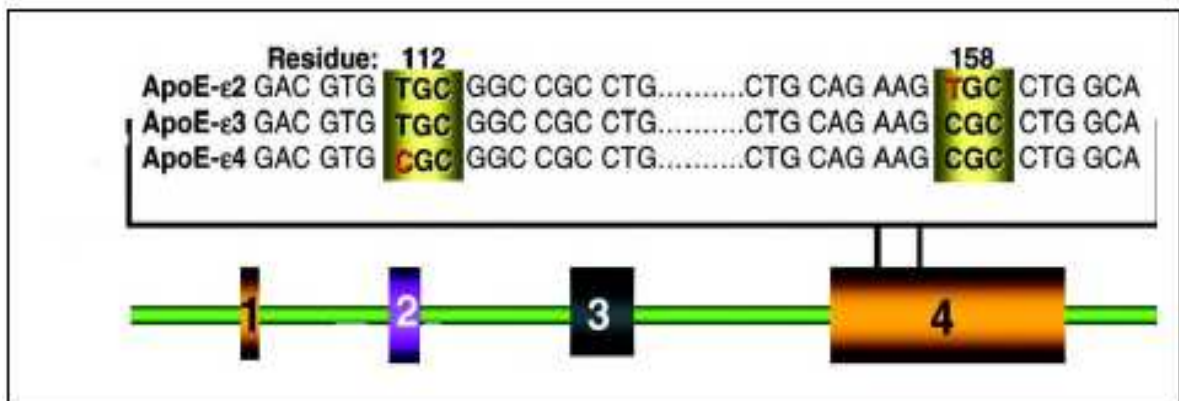


Figure 9 : Polymorphisme génétique du gène de l'Apo E (Simon et al, 2003)

L'apo E3 a une préférence pour former des complexes de type HDL, de même que l'apo E2; l'apo E4 forme plutôt des VLDL. Cette interaction spécifique des isoformes de l'apo E avec les lipoprotéines pourrait être due à une structure différente de ces trois protéines apo E (Yadong et al, 1982).

7.4- Distribution tissulaire :

L'apo E est synthétisé par de nombreux tissus. Des quantités importantes d'ARNm d'apo E ont été détectées dans le foie, le cerveau, les poumons, les reins, les ovaires...

La source majeure de production d'apo E est le foie. Le second site de production de l'apo E est le cerveau (Nakaim, 1996). Sa synthèse peut être effectuée au niveau du système nerveux central par les oligodendrocytes, la microglie et plus particulièrement les astrocytes (Govaerts et al, 2007).

La présence de la protéine apo E est aussi mise en évidence dans les cellules nerveuses, La capture par les neurones, de l'apoE sécrétée par les astrocytes, pourrait expliquer cette localisation intra-neuronale (Ronald et al, 2001).

7.5- Régulation :

La synthèse de l'apo E est régulée au cours du développement et par des facteurs hormonaux et nutritionnels. L'expression de l'apo E dans le cerveau est régulée par les oestrogènes. Le promoteur de l'apo E dans les astrocytes est régulé de manière positive par l'AMPC et l'acide rétinoïque, grâce à une séquence consensus nommée AP-2. L'expression du gène de l'apo E peut être régulée *in vitro* par l'induction de stress (Soulié, 2004).

7.6- Récepteurs de l'Apo E :

Les complexes apo E/ 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 (Guillaume et al, 1996).

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 (Narita et al, 1997).

7.7- Rôle de l'Apo E dans le système nerveux :

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'intervention de l'apo E dans la régénération du système nerveux ne semble pas limitée à son rôle de transporteur du cholestérol; l'apo E peut également jouer un rôle dans la croissance neuritique, la toxicité neuronale ou la stabilisation du cytosquelette neuronal (Soulié, 2004).

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.

Plusieurs études ont essayé d'élucider les mécanismes impliqués dans la fonction de l'apoE sur le cytosquelette neuronal mais les résultats semblent contradictoires et pourraient dépendre du système cellulaire étudié. Ainsi, l'apoE3 favorise la croissance neuritique de neurones de ganglions dorsaux de lapin (Ignatius et al, 1986), et des cellules de neuroblastome Neuro2a transfectées avec l'apoE3 ont également une pousse neuritique favorisée. Par contre, l'apoE4 n'affecte pas la croissance des neurites dans le cas des Neuro2a transfectées ou bien elle inhibe cette croissance et déstabilise le réseau microtubulaire des neurones de ganglion dorsaux de lapin (Britto, 1995).

7.8- Apolipoprotéine E et maladie d'Alzheimer :

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 les dépôts vasculaires, dans les astrocytes et dans quelques neurones contenant ou non des PFHs (Marques et al, 1996). C'est la partie C-terminale de l'apoE qui est retrouvée au sein des fibrilles amyloïdes des cerveaux Alzheimer. L'apoE 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 (Wisniewski et al, 1992). De même, les PS sont plus nombreuses dans les cerveaux de patients Alzheimer possédant un isoforme E4 de l'apo E par rapport à ceux ayant une 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 est plus important chez les patients porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ (Beffert et al, 1996).

7.9- Apo E et peptide amyloïde :

L'apo E4 purifiée de plasma se lierait au peptide amyloïde avec une affinité plus importante que les autres allèles; ce sont des formes oxydées de l'apo E qui se lient à l'A β . 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 , et entraîne l'apparition de fibrilles plus précocement (Strittmatter et al, 1993).

L'association de l'apo E et du peptide amyloïde aboutit donc à la formation de fibrilles insolubles, observables en microscopie électronique. La proportion d'apo E par rapport au peptide amyloïde serait déterminante dans l'agrégation du peptide amyloïde (Wisniewski et al, 1997).

L'apo E serait une molécule chaperonne pour la fibrillogénèse, et c'est l'isoforme E4 qui se lierait préférentiellement au peptide amyloïde. La liaison de l'apo E4 et du peptide amyloïde expliquerait son rôle en tant que facteur de risque (Soulié, 2004).

Deux hypothèses sont envisageables pour le rôle protecteur de l'apo E: - Les isoformes E2 et E3 de l'apo E formeraient des complexes avec le peptide amyloïde extracellulaire, et le séquestre raient. Cette association retarderait la formation des fibrilles amyloïdes et la formation des plaques. L'apo E serait impliquée dans l'élimination du peptide amyloïde, via une internalisation par les cellules (soulié, 2004).

7.10- Apo E et protéines du cytosquelette :

Pour que l'apo E puisse interagir avec les protéines Tau, l'apo E doit se situer dans le cytoplasme du neurone. Les isoformes ayant des affinités différentes pour les récepteurs, les divers variants de l'apo E ne se fixent pas identiquement aux récepteurs neuronaux et ne soient donc pas internalisés de la même façon.

In vitro, l'isoforme E3 a une affinité plus importante pour les protéines Tau que l'isoforme E4. Et la liaison des protéines Tau et de l'apo E intervient au niveau de la région N-terminale de l'apo E (région de liaison aux récepteurs LDL) et dans la région de la liaison aux microtubules des protéines Tau (Strittmatter et al, 1994).

Les liaisons différentielles de l'apo E3 et de l'apo E4 aux protéines Tau peuvent s'expliquer par l'absence d'une cystéine en position 112 sur l'isoforme E4. La cystéine, à cette position de l'isoforme E3, pourrait intervenir dans la liaison aux cystéines présentes dans la région de liaison aux microtubules des protéines Tau, qui sont nécessaires pour la dimérisation des protéines Tau, et ainsi empêcher la phosphorylation des protéines Tau et leur dimérisation.

Toutes ces hypothèses proposent un rôle indirect de l'apo E dans la maladie d'Alzheimer.

8- Homocystéine :

L'homocystéine est un acide aminé soufré dont la synthèse est issue du métabolisme d'un autre acide aminé essentiel, la méthionine.

Ce dernier provient de l'absorption de protéines alimentaires ; aussi, lorsque les quantités augmentent, l'homocystéine va croître proportionnellement. Mais, il existe une voie de reméthylation de l'homocystéine en méthionine, qui nécessite des cofacteurs, la vitamine B12, et les folates, l'organisme devant aussi disposer de substances donneuses de méthyl en quantité suffisante pour pouvoir réaliser correctement ces transformations. Le 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) est une enzyme du cycle des folates qui joue un rôle essentiel dans cette reméthylation, son coenzyme étant le vit B12. Elle fournit le radical methyl nécessaire à l'action de la méthionine synthétase (qui transforme l'homocystéine en méthionine).

Il existe une deuxième voie, dite de la transsulfuration, dont la fonction est la production d'autres substances à partir de l'homocystéine. Cette dernière est aussi fondamentale: grâce à la cystathionine- β -synthétase (CBS), elle transforme une grande quantité de l'homocystéine en cystéine à l'aide de la vitamine B6. (Mouchabac, 2008). (Figure 10)

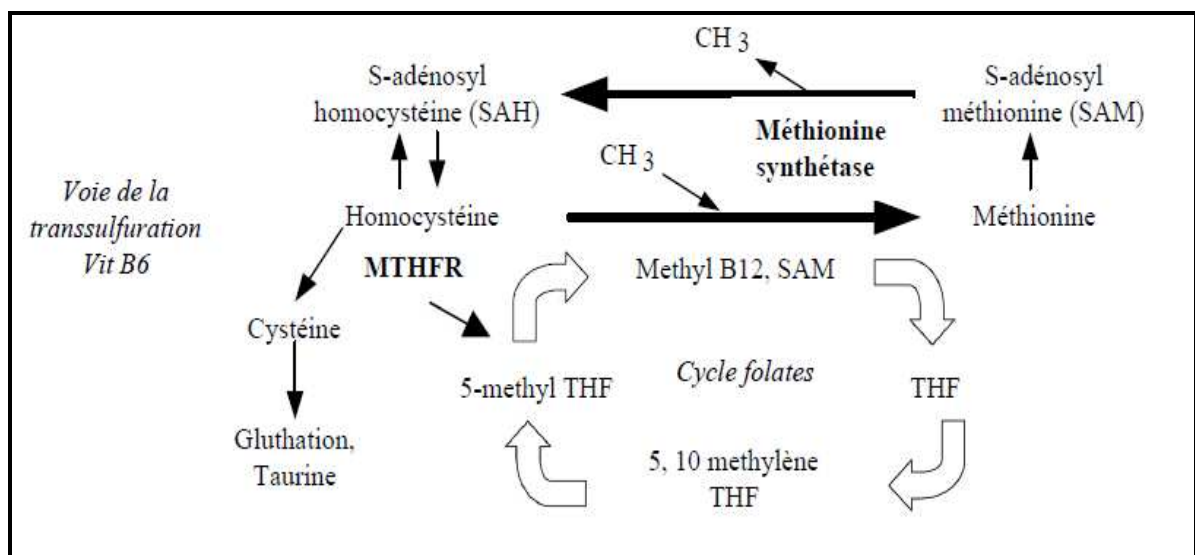


Figure 10: métabolisme de l'homocystéine (Mouchabac, 2008).

8.1- 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 $\mu\text{mol/L}$ (Zittoun, 1998).

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 (Ueland , 1995 ; Jacobsen, 1998; Mudd et al, 2000; Jacobsen, 2001), et est lié soit aux protéines, essentiellement l'albumine représentant 75 % de l'Hcy plasmatique totale (Kang et al, 1979, Refsum et al, 1985), soit à une autre molécule possédant un thiol libre (cystéine ou homocystéine elle même) pour former ainsi des disulfures: cystéinehomocystéine ou homocystéine-homocystéine encore appelées homocystine pour représenter 25 % (Soo-Sang Kang et al, 1986). La concentration totale en homocystéine (tHcy) se réfère à toutes ces formes plasmatiques.

La concentration physiologique de l'Hcy plasmatique est comprise entre 5 et 15 $\mu\text{mol/L}$. Un taux élevé d'Hcy plasmatique supérieur à la normale permet de décrire une hyper-homocysteinémie (Hhcy).

Le dosage de l'Hcy plasmatique totale à jeun permet de définir l'Hhcy comme: modérée (15 à 30 $\mu\text{mol/l}$), intermédiaire (30 à 100 $\mu\text{mol/l}$) et sévère (au-delà de 100 $\mu\text{mol/L}$) (David et al, 2000).

8.2- 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 (Kuo et al, 2005 ; Luchsinger et al, 2006). 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 (Carmel, 2000 ; Wagner, 1995). 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 (Lipton et al, 1997 ; Clarke et al, 2007).

9- MTHFR (5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase)

9.1- 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 (Miner et al, 1997) .La MTHFR utilise comme donneur d'électron le NADPH.

La protéine humaine à deux isoforme de PM de 77 KDa et 70KDa. Ce dernier a été retrouvé qu'au niveau du tissu hépatique mais dans le tissu rénal il n'est présent que chez l'enfant (Rozen, 1998).

La structure protéique de la MTHFR est subdivisée en deux domaines l'un catalytique (N terminal) de PM 40 KDa et l'autre régulateur (C terminale) de PM 37 KDa. A l'union de ces deux domaines se trouve une région hydrophobe avec séquence d'AA : Lys-Arg- Arg-Glu-Glu, qui représente le site de clivage par la trypsine.

La digestion de la MTHFR par la trypsine n'a pas d'effet sur sa fonction catalytique mais la rend plutôt insensible à sa régulation par la S-adenosylmethionine (SAM). La SAM a un rôle inhibiteur de la MTHFR, alors que la S-adenosylhomocystéine (SAH) est régulateur de l'activité de la MTHFR (Goyette et al, 1998).

9.2- Rôle de la MTHFR :

La MTHFR intervient dans le métabolisme de l'homocystéine. La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate (CH₂THF) en 5-méthyltétrahydrofolate (CH₃THF) (Frosst et al, 1995). (Figure 11)

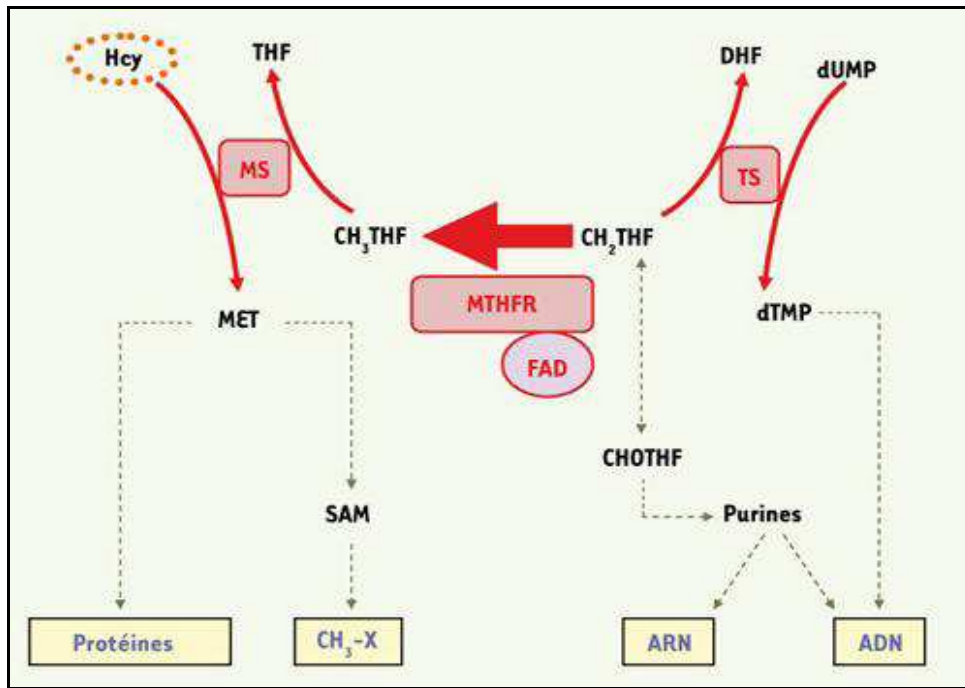


Figure 11 : Répercussions métaboliques de l'activité de la MTHFR (Ueland et al, 2005).

9.3- Gène de la MTHFR :

Le gène codant pour la MTHFR a été localisé sur le bras court du chromosome 1 (1p36.3) et il comporte 11 exons (Goyette et al, 1994). (Figure 12)

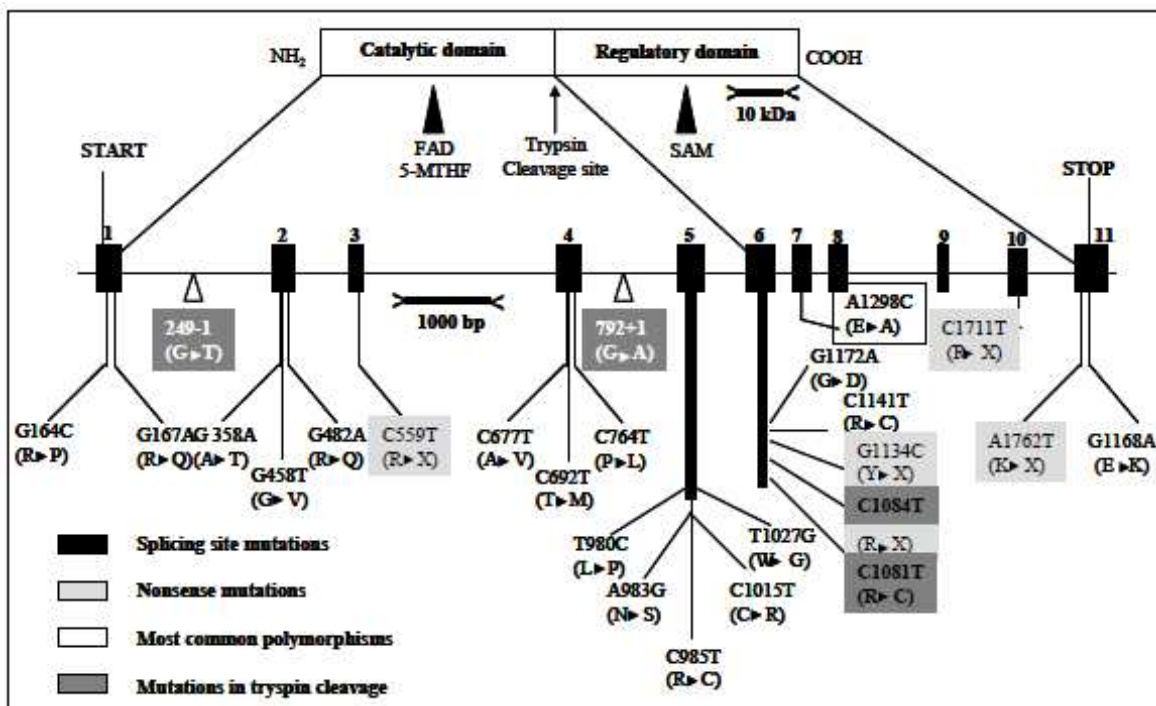


Figure 12 : Gène, protéine et polymorphismes de la MTHFR (Gos et al, 2002)

9.4- Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR

Le polymorphisme identifié sur le gène de la MTHFR 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 (Frosst et al, 1995) (Figure 13).

La substitution 677 C → T dans l'exon 4 du gène, met en jeu une enzyme thermolabile possédant une activité moindre, c'est pourquoi le génotype mutant homozygote (677TT) est associé à une légère hyperhomocystéinémie. Cette association est encore plus évidente lorsque l'on considère des individus dont le sang présente un taux de folates réduit.

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 (Arruda et al, 1998; Stevenson et al, 1997), de 7 % chez les noirs Africains (Schneider et al, 1998) et jusqu'à 40 % chez les sujets d'origine Italienne ou Hispanique (O'Leary et al, 2004; Kostulas et al, 1998). Dans les pays du Maghreb, les résultats ont montré une fréquence allélique de 17,8 % en Tunisie (Jerbi1 et al, 2005).

9.5- Effet métabolique de la mutation MTHFR sur l'homocystéine et folates :

Depuis sa caractérisation biochimique en 1991 et son identification génétique en 1995, l'allèle 677T du gène MTHFR a suscité un intérêt tout particulier en recherche clinique. C'est ainsi qu'il s'avéré être un facteur de risque associé à des pathologies aussi diverses que les maladies cardiovasculaires, l'anomalie de fermeture de tube neural, les cancers et les maladies psychiatriques (Meleady et al, 2003 ; Franchis et al, 1998 ; Campbell et al, 2002).

La plupart des études visent le génotype TT, bien que le génotype CT puisse aussi causer une baisse des folates, une augmentation d'homocystéine et une réponse positive à la supplémentation en acide folique (O'Leary et al, 2004). En effet, il est admis que la production de méthyl disponible est abaissée de 70 % chez les porteurs homozygotes de la mutation et de 35 % chez les hétérozygotes (Eskes, 2005).

La formation d'un variant enzymatique à activité insuffisante, entraîne une diminution du 5-méthyl THF, limitant ainsi partiellement la voie de la reméthylation. Cependant cet effet de la mutation ne s'observe que si le statut folique est bas (Jacques et al, 1996 ; Guttormsen et al, 1996; Frosst et al, 1995; Van der Put et al, 1996).

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.

Le produit de la réaction catalysée par la MTHFR est le 5-méthyltétrahydrofolate. Son seul rôle connu se manifeste par le transfert de son groupe méthyle lors de la reméthylation de l'homocystéine par la méthionine synthase. La MTHFR peut ainsi moduler les taux d'homocystéine, de méthionine et de S-adénosylméthionine. La MTHFR peut aussi indirectement influencer les taux de nucléotides, puisque son substrat, le 5,10-méthylène tétrahydrofolate, est utilisé pour la synthèse de la thymidine et qu'il peut aussi être converti en d'autres dérivés foliques qui participent à la synthèse des purines (Ueland et al, 2005).

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 partant une perturbation du métabolisme de folate et un changement de la composition cellulaire des dérivés foliques (Selhub, 1992).

Plusieurs investigateurs ont trouvé que les taux plasmatiques des folates sont significativement bas chez les individus de génotype T/T (Jacques et al, 1996 ; Nelen et al, 1998).

9.6- Mutation C677T du gène de la MTHFR et maladie d'Alzheimer :

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 reméthyler l'homocystéine.

Par conséquent, ce polymorphisme peut être un candidat unique pour ce rôle en raison de sa neurotoxicité directe et son association avec la maladie cérébrovasculaire, qui joue actuellement un rôle significatif dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (Sai et al, 2002 ; Kalaria et al, 2002).

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.

Une analyse, qui considérait 6000 individus, a indiqué que le génotype 677T cause une augmentation de 70 % du risque de dépression. 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 (Rozen, 2005).

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.

Patients et Méthodes

L'étude que nous avons entreprise est de type cas témoins ; elle a durée deux ans, et a porté sur deux types de populations : Une population malade de 20 patients et une population témoin de 30 sujets sains.

1- Recrutement des sujets :

■ Les malades : il s'agit d'un échantillon de la population nord Constantinoise présentant une maladie d'Alzheimer diagnostiquée par des médecins neurologues, et intéressant les deux sexes. Le recrutement des malades ont été effectués au niveau de service de neurologie CHU de Constantine.

■ Les témoins : sujets sains des deux sexes recrutés au niveau de la maison de retraite de Constantine (Hamma Bouziane) et de Skikda.

Les critères d'inclusion et d'exclusion pour les deux populations :

- Les patients

-Critère d'inclusion : les sujets présentant une MA probable ou possible retenues au niveau du service de Neurologie du CHU de Constantine ($MMSE \leq 24$).

-Critère d'exclusion : les patients présentant une autre forme de démence voir une démence vasculaire ou tumorale sont exclus de cette étude.

- Les témoins

- Critère d'inclusion : tous les sujets âgés de plus de 50 ans acceptant de participer à l'enquête et ne présentant pas de la maladie d'Alzheimer.

- Critère d'exclusion : tous les sujets présentant un MMSE inférieur à 24.

2- 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 subit une évaluation cognitive via le test de l'MMSE modifié (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..... (Annexe 2).

3. Prélèvement et enregistrement :

3.1- Prélèvement

Les prélèvements ont été effectués sur des sujets à jeun d'au moins dix heures, pour la réalisation d'un bilan lipidique.

Pour le dosage quantitatif de l'homocystéine, il est important de séparer le plasma des cellules dès que possible après prélèvement, car la synthèse de l'Hcy peut avoir lieu dans les hématies.

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 (Cussenot, 1999).

3.2- Enregistrement :

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

L'ADN extrait a partir du sang a été conservé à -80°C .

Après centrifugation le surnageant est utilisé pour le dosage des différents paramètres (bilan lipidique et homocystéine).

4- Méthodes de dosage des paramètres lipidiques

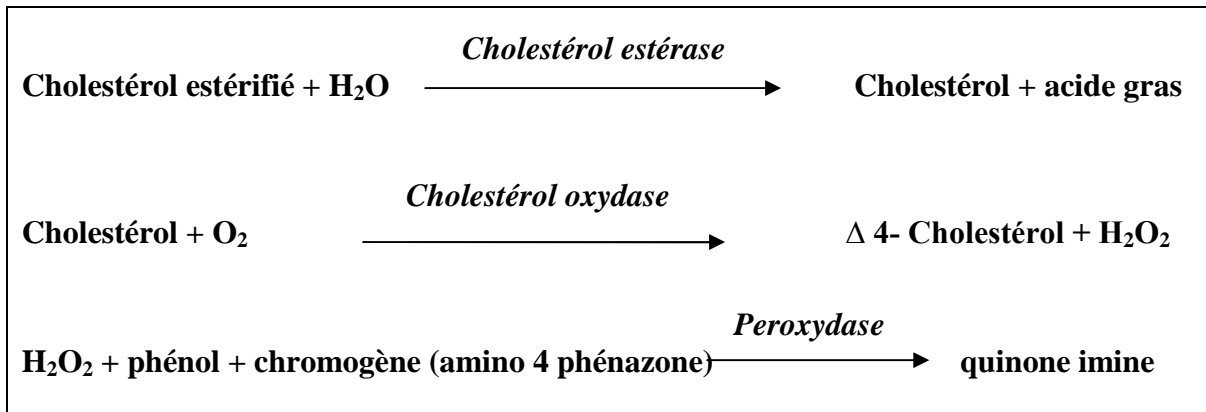
Le cholestérol, les triglycérides et le cholestérol -HDL ont été dosés le jour même du prélèvement.

4.1- 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 N° de ref.T01-2801-56).

Réaction :



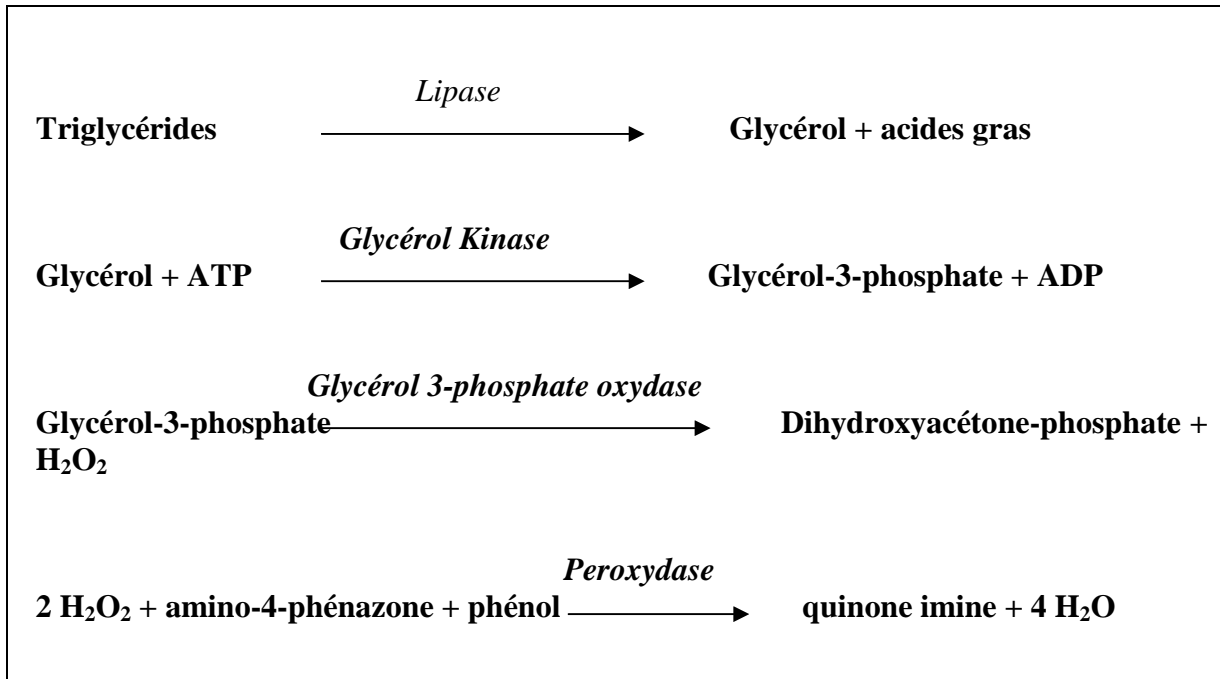
L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon du sérum.

4.2- Dosage des triglycérides :

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

Principe :

Le principe repose sur le dosage en colorimétrie du glycérol libre (à 500nm) 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 (Masson et al, 1992).

4.3- Dosage du cholestérol HDL :

Principe :

Le dosage du HDL cholestérol s'est effectué après précipitation des chylomicrons, des VLDL et des LDL par le phosphotungstate associé au chlorure de magnésium (ref .T01-2801-56, 6.5 ml).

Le HDL cholestérol est alors dosé dans le surnageant résultant de la centrifugation du précipité par la même technique enzymatique que le cholestérol total (Masson et al, 1992).

4.4- Cholestérol LDL :

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

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

5- Dosage de l'homocystéine

5.1. Principe

C'est un immunodosage par compétition. Le test inclut une étape préliminaire manuelle de prétraitement des échantillons.

L'Hcy 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 (DTT).

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 la SAH fixé pour se lier à l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline.

5.2- 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 mélangé à volume égal.

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

Nb d'éch	Sol travail ml	H2O ml	Pre – B µl	Pre – A ml	Total ml
5	1.5	0.90	100	1	2

■ *Préparations des échantillons :*

- Pour les contrôles et échantillons de patients :

15 µl de chaque contrôle et échantillon de patient (plasma) est ajoutée à 300µl 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 Echantillon IMMULITE.

- Pour les ajusteurs :

20 µl de chacun des ajusteurs (SAH synthétique dans une matrice proteine/tampon) est ajoutée à 400µl 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.

6- Extraction de l'ADN:

Dans notre étude la méthode utilisée est l'extraction par la technique au NaCl.

6.1- Principe :

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN ; pour pouvoir isoler ces leucocytes, le sang doit être initialement mélangé à une solution hypotonique pour permettre la lyse des globules rouges. Après récupération des leucocytes, ces derniers vont être traités par un mélange représenté par un détergeant (SDS) et la protéinase K et ce, dans le but de dégrader tout ce qui est protéine. Le mélange agit sur les membranes des leucocytes et sépare les protéines de la membrane des acides nucléiques.

Une précipitation au NaCl va éliminer les protéines associées à l'ADN nucléaire. Le surnageant ainsi récupéré est traité par l'éthanol dans lequel une pelote d'ADN se forme par précipitation.

L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (Tris EDTA 10 :1). Sa pureté ainsi que sa concentration sont estimées par spectrophotométrie à UV. (Annexe3)

6.2- Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN

■ *La pureté de l'ADN :*

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, il est indispensable de procéder à la réextraction de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée. Les ADN purs sont conservés à -80°C jusqu'à l'utilisation.

- 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 280nm (longueur d'onde d'absorption des acides nucléique 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 DO 260nm/DO280nm, 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 $R = \text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ est compris entre 1.6 et 2 ($1.6 < R \leq 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si : $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280} < 1.6$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si : $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280} > 2$.

■ *La concentration de l'ADN :*

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

On mesure donc à 260 nm et 280 nm la DO d'une dilution au 1 /100ième de la solution à doser. On déduit la concentration de l'ADN grâce au calcul suivant :

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

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

$$[C] (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = \frac{\text{DO}}{\sum L} \cdot \frac{\text{Vol total}}{\text{vol d'ADN}}$$

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.

7. Génotypage de l'Apo E

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

- la PCR (polymerase chaine 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.

7.1- La PCR (Polymérase Chaîne Réaction) :

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Karry Mullis et développé par Henri A et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA) en 1985 (Cussenot, 1999).

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.

■ 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 (Annexe 4, Tableau 1).

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'ApoE (Annexe 4).

■ Déroulement des cycles de la PCR :

Chaque cycle de la PCR repose sur trois étapes indispensables : Dénaturation, hybridation et élongation (Annexe 4).

■ *Contrôle de La taille des fragments amplifiés :*

La taille des fragments amplifiés a été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5% additionné de 10 µl BET (Bromure d'Ethidium) et coulé sur plaque du cuve horizontale (Figure 13).

Dans chaque puits du gel, il est déposé :

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

Un marqueur de taille (PM 100 pb) est également déposé, diluée au 1/2.

Les dépôts se font du côté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant de 90 à 120 volts pendant 1 h.

Cette analyse permet, d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN survenue au cours de la PCR.

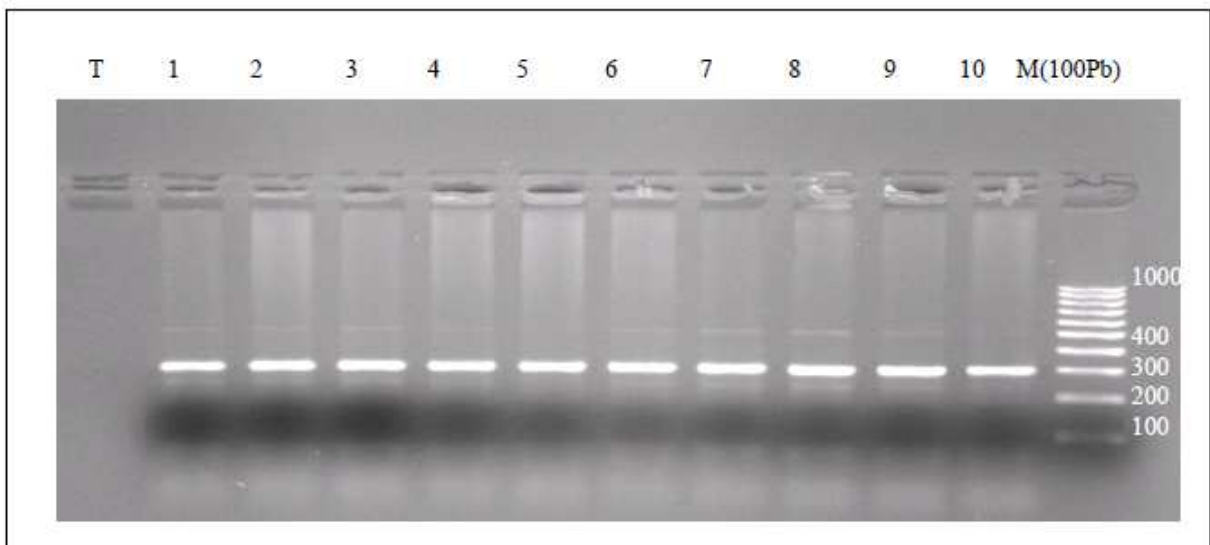


Figure 13 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% des fragments amplifiés (292pb) par PCR du gène Apo E.

7.2- 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 292pb encadrant ces positions, suivie d'une digestion enzymatique par HhaI qui a pour site de coupure les séquences GCGC. Son action n'est possible que lorsque des arginines figurent en 112 ou 158 parce que celles-ci sont ici 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 14).

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 14).

Chaque allèle a un site de coupure spécifique. L'allèle ϵ_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 ϵ_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.

L'allèle ϵ_3 (Cys112, Arg158), c'est l'allèle commun, se caractérise d'une part par la présence du fragment 91pb due à l'absence du codon CGC au position 112 retrouvé dans l'allèle ϵ_2 et d'autre part par la présence des fragments 48 et 35 sont retrouvés également dans l'allèle ϵ_4 .

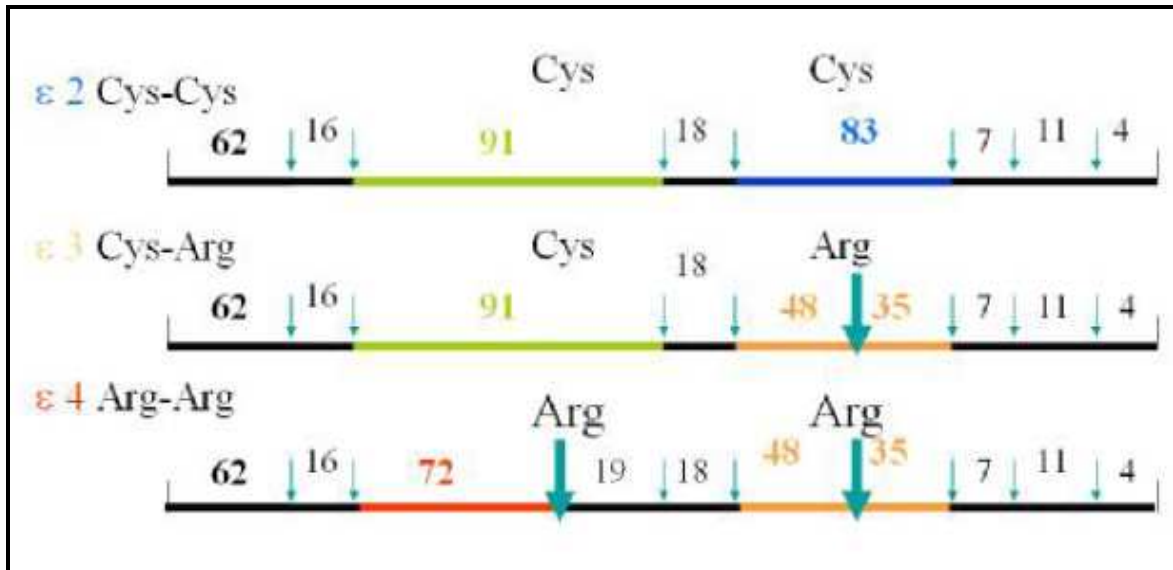


Figure 14 : Digestion par Hha I des trois allèles

■ **Clivage des produits de PCR :**

On prépare le milieu de digestion de l'enzyme HhaI pour le nombre de tubes voulu + 1 (Annexe 4: Tableau 2).

Les produits de la PCR sont soumis à une digestion enzymatique par HhaI. Ils sont incubés pendant une nuit dans un bain marie à 37°C.

Après incubation ils sont concentrés au speed -vac (System ISS 40-SAranta).

■ **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% (Annexe 4, tableau 3)**

Après préparation de persulfate d'ammonium 10% (0.01g dans 100 µl H₂O).

-On monte le support du gel : maintenir deux plaques de verre bien serrées verticalement et séparées par un joint de 2 mm d'épaisseur et placer de chaque côté des pinces fixatrices.

L'addition de persulfate d'ammonium et de Temed (agents polymérisants), juste avant de couler le gel (risque de polymérisation dans le bécher).

-On homogénéise, et on coule immédiatement en versant le contenu de bêcher entre les plaques de verre par une seringue en ayant soin de ne pas faire de bulles.

-On place le peigne plat afin de former les puits et on laisse polymériser à température ambiante pendant 1h 30 min à 2 heures.

▪ *Dépôts des échantillons :*

Quand le gel est polymérisé, on plonge le système (gel + électrodes) dans la cuve verticale contenant un volume (450ml) du tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X), on ôte le peigne et on dépose délicatement au fond de chaque puits un échantillon. (Annexe 4)

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 ul 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 (figure 15).

Tableau I : 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

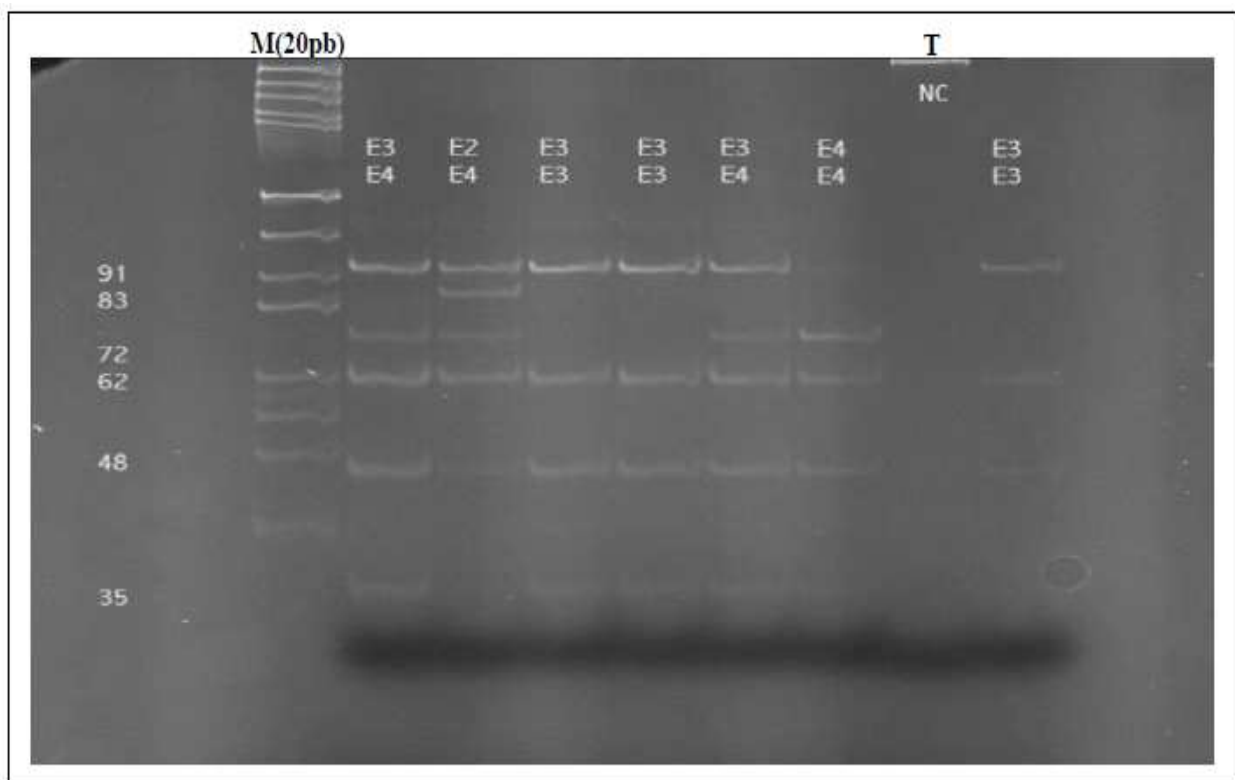


Figure 15 : Profil d'électrophorèse sur gel d'acrylamide des fragments issus par clivage de HhaI présentant différents génotypes d'Apo E (réalisé au laboratoire).

8- Recherche de la mutation C677T du gène codant la MTHFR

8.1- Principe :

La mutation C677T du gène de la MTHFR a été déterminée par la méthode PCR/RFLP décrite par (Frosst et al, 1995).

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 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 *Hinf1* (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 17). Le troisième n'est pas visible à cause de son intensité trop faible.

8.2- Technique :

■ *La PCR (Polymérase Chaîne Réaction)*

▪ *Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR :*

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. (Annexe 5, Tableau 4).

▪ *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. (Annexe 5)

▪ *Contrôle des produits de la 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 100pb LADDER, ref.GEPMQR01-26) +10 µl H₂O +2µl BBP

Les dépôts se font du coté 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.

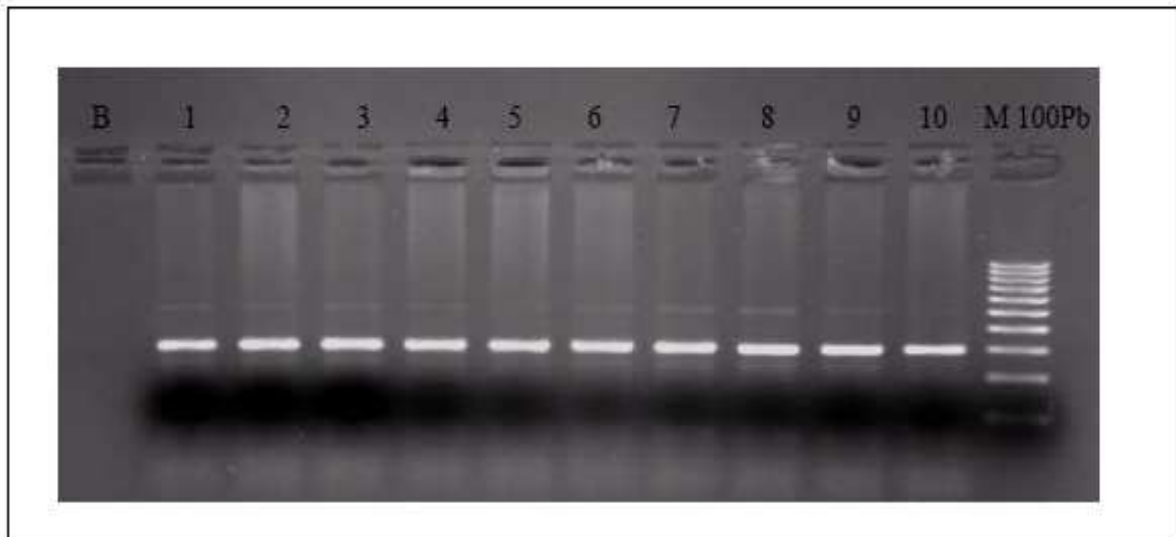


Figure 16: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des fragments amplifiés (198pb) par PCR du gène de la MTHFR.

▪**Digestion des produits de PCR**

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre de tubes voulu plus un autre. (Annexe 5, Tableau 5).

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-SAranta).

■**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 (Bromure d'éthidium) 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 coté de la cathode qui vont migrer vers l'anode dans le champ électrique et leurs vitesses dépendent de leurs tailles. Plus le fragment a 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 intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition à l'ultra violet (UV) (figure 17).

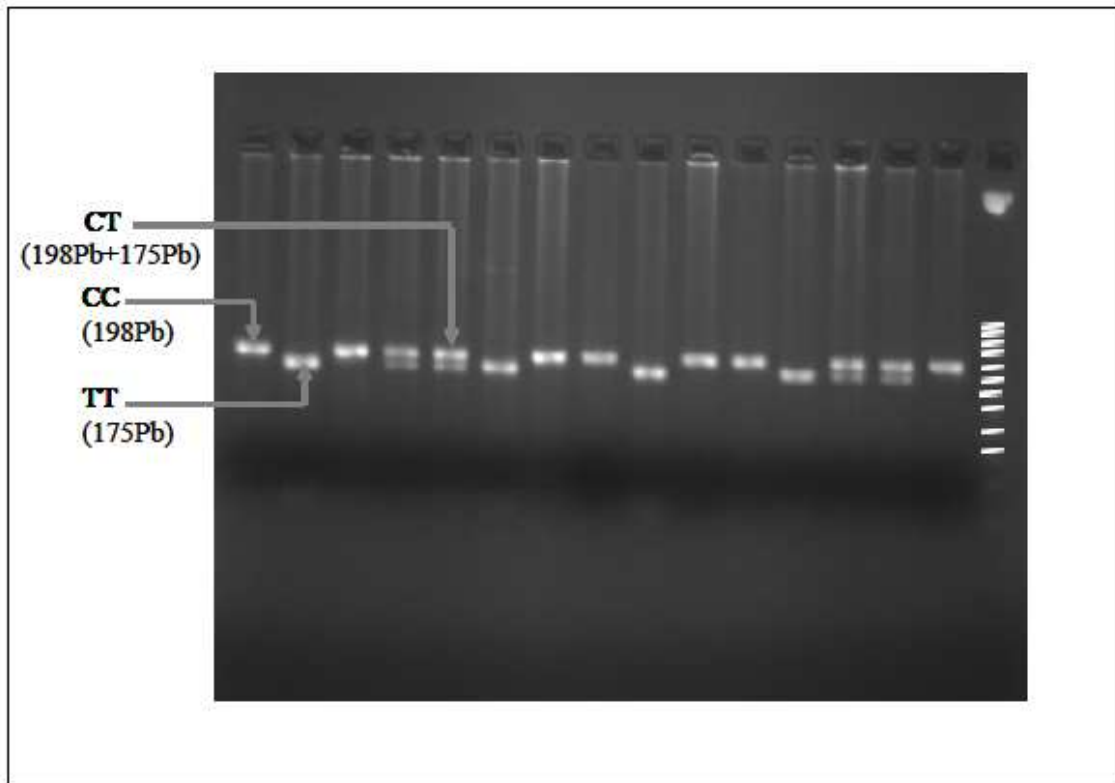


Figure 17 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 3% des fragments issus par clivage de *Hinf*I présentant différents génotypes de la MTHFR.

Résultats et discussion

1. Répartition des sujets selon la pathologie et le sexe

Cette étude comporte un échantillon regroupé 50 sujets dont 20 malades et 30 témoins.

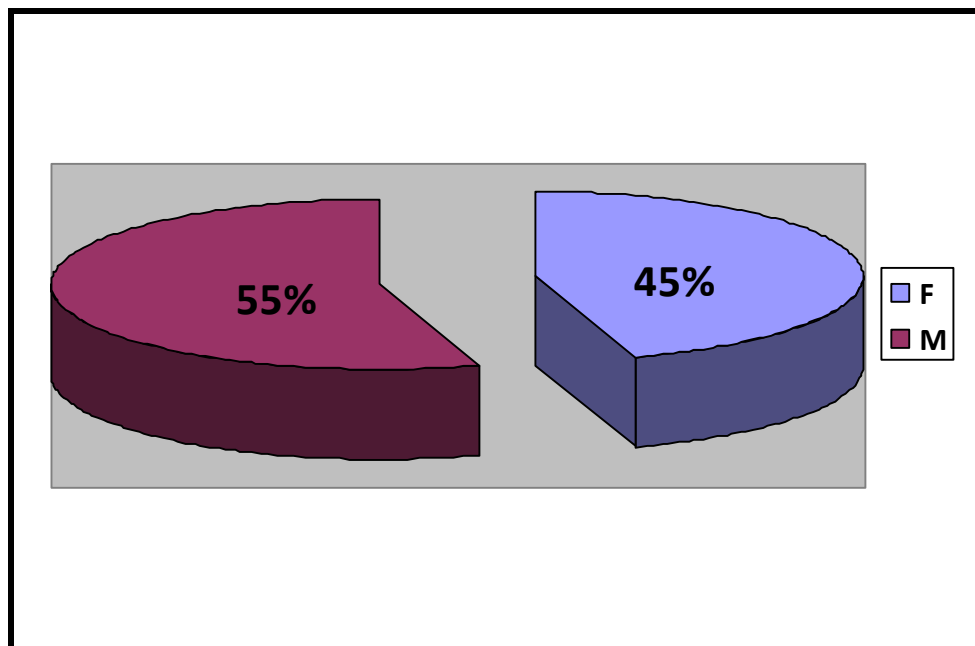


Figure 18: répartition des malades selon le sexe

Parmi les malades on retrouve 9 sujets de sexe féminin soit (45%) et 11 sujets de sexe masculin soit (55%).

Tandis que les témoins 50% sont de sexe féminin et 50% de sexe masculin.

Dans notre étude on ne retrouve pas de prédominance d'un sexe par rapport à un autre, ce résultat ne concorde pas avec la plupart des données de la littérature.

Selon plusieurs études, Les femmes ont un risque plus élevé de développer une maladie d'Alzheimer que les hommes (Fratiglioni et al, 2000). 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 (Letenneur et al, 1999).

L'espérance de vie, plus élevée chez les femmes que chez les hommes, pourrait 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.

De plus la différence d'incidence en fonction du sexe pourrait être expliquée par des différences biologiques et hormonales, notamment un possible effet des oestrogènes.

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 (Edland et al, 2000).

2. Répartition par tranche d'âge

La moyenne d'âge chez les malades est de $73,0 \pm 10,19$ ans (soit $68,55 \pm 7,86$ ans chez les femmes et $78,27 \pm 10,07$ chez les hommes).

Chez les témoins on retrouve une moyenne d'âge de $62,9 \pm 10,23$ ans (soit $62,2 \pm 10,96$ chez les femmes et $63,6 \pm 9,79$ ans chez les hommes).

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

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

	ALZ		T	
	Nombre	%	Nombre	%
50-59	2	10	14	46.7
60-69	3	15	7	23.3
70-79	9	45	7	23.3
80-89	5	25	2	6.7
90-100	1	5	0	0
Total	20	100	30	100

Notre étude montre une prévalence de la MA avoisinant les 10% dans la population âgée de moins de 60 ans, elle augmente avec l'âge, 15% dans la tranche d'âge 60-69 ans, environ la moitié (45%) de nos malades se trouve dans la tranche d'âge 70-79 ans, suivi 25% de la tranche d'âge 80-89 ans.

L'âge moyen des sujets MA ($73,0 \pm 10,19$ ans) est supérieur à celui des témoins ($62,9 \pm 10,23$ ans).

L'âge est sans conteste le principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer.

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.

Cet augmentation est retrouvée dans toutes les études, qui montrent pour la plupart, 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.

Ces hypothèses qui suggèrent que, passé un certain âge, cette croissance exponentielle se stabiliserait, restent à discuter, dans la mesure où, au-delà de 85 ans, les effectifs des études sont faibles (Ritchie et al, 1995).

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 (Letenneur et al) incluant des résultats obtenus sur la population française (étude PAQUID) (Stern et al, 1994). 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 la neurodégénérescence, une augmentation marquée dans la production des radicaux libres, peut prédisposer pour les désordres apparentés à l'âge (Cortopassi et al, 1999 ; Chun Shi et al, 2008).

3. MMSE (Mini-Mental State Examination) :

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 et le calcul mental, la mémoire de fixation (long terme), le langage et les habiletés visuoconstructives (Ivanou1 et al, 2003).

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. (Ivanou1 et al, 2003).

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 (Derouesne et al, 1999).

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. 55 % sont touchés par une démence sévère (MMSE ≤ 10); 25% par une démence modérée (MMSE 11-17) et 20% (MMSE 18-24) sont déments légers (Guelfi et al, 2000).

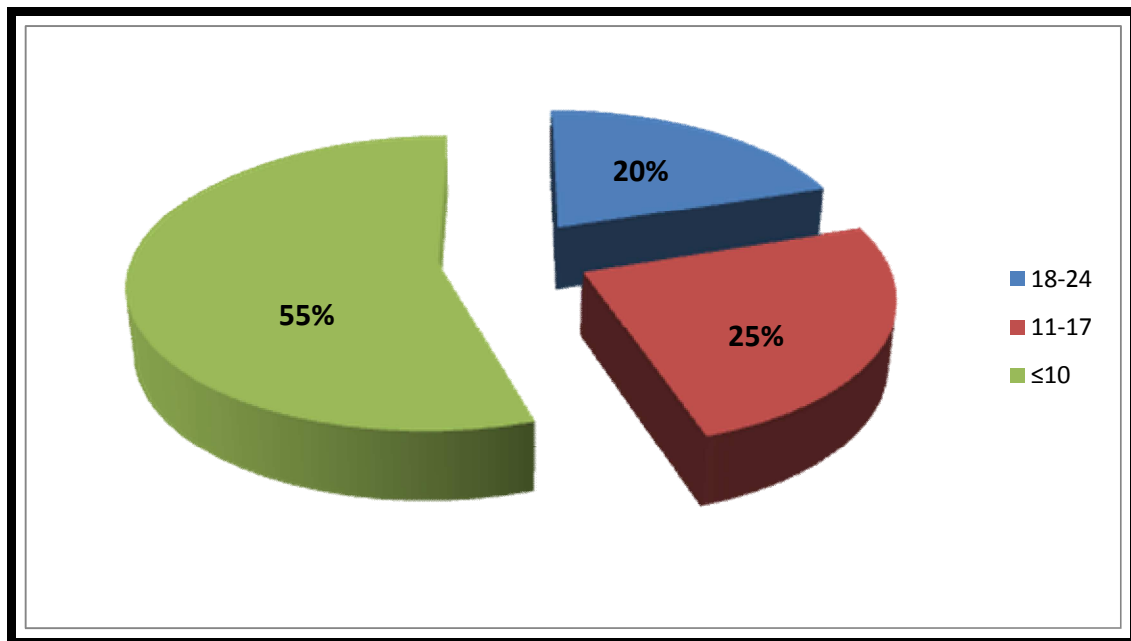


Figure 19: Evaluation du statu cognitif et du stade de la démence

4. Etude génétique de l'APOE

4.1. Les fréquences génotypiques de l'APOE

Tableau III : répartition des fréquences génotypiques dans les deux groupes

	ALZ		T		P
	N	%	N	%	
E3/E3	09	45	17	56.7	ns
E3/E4	11	55	04	13.3	<0,01
E2/E3	0	0	09	30	/
E2/E4	0	0	0	0	/
E4/E4	0	0	0	0	/
Total	20	100	30	100	

La distribution génotypique du gène de l'Apo E indique que $\epsilon 3/\epsilon 4$ est le génotype le plus présenté dans le groupe malade avec une fréquence de 55% tandis que le génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$ est retrouvé plus dans le groupe témoin avec une fréquence de 56.7%, le génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$ est augmenté de 41.7% chez les patients par rapport aux témoins.

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 (Lan Chen et al ; Friedman et al, 1997 ; Myron et al).

Dans notre échantillon nous n'observant aucun génotype $\epsilon 2/-$, seul les génotypes $\epsilon 3/-$ et $\epsilon 4/-$ sont présents.

De plus, le plus grand nombre de malades présente le génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$ soit 55%. Chez les témoins nous constatons que seul 13.3% ont le génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$, parmi les 86.7% restants on trouve les génotypes $\epsilon 3/\epsilon 3$ soit 56.7% et $\epsilon 2/\epsilon 3$ soit 30%.

Ces résultats nous permet de suggérer une association entre l'allèle $\epsilon 4$ et la maladie d'Alzheimer.

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 $\epsilon 4$ avait une forte association avec la maladie d'Alzheimer (Roses et al, 1993).

Schmechel D et col ont montré que la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ atteignait 40 % dans une population de patients atteints de formes familiales tardives de la maladie (Strittmatter et al, 1993).

Cet association a été confirmée par de très nombreuses études cliniques et épidémiologiques, étendue aux formes sporadiques tardives ainsi qu'à certaines formes précoces (Chatier-Harlin et al, 1994 ; Fukuda et al, 1994).

Saunders et col ont présenté des données cliniques concernant l'association de l'apoE à la maladie d'alzheimer, suggérant que (65%) de MA peut être attribué à la présence de l'allèle $\epsilon 4$, et le risque de l'MA est plus faible chez les sujets ayant le génotype $\epsilon 2/\epsilon 3$ (Corder et al, 1994).

4.2. Répartition des fréquences alléliques de la population d'étude

Tableau IV : Fréquences alléliques de l'ApoE dans les deux groupes

	E2		E3		E4	
	N	%	N	%	N	%
Témoins	09	15	47	78.33	04	6.67
ALZ	0	0	29	72.5	11	27.5
P	/		ns		<0.05	

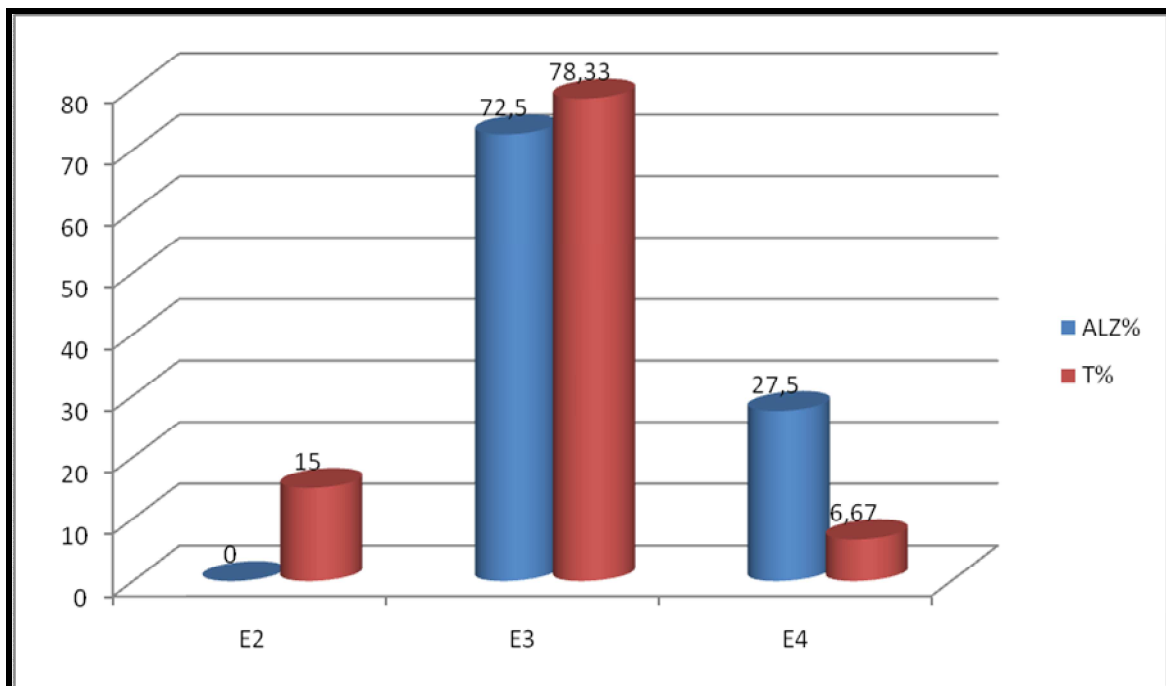


Figure 20: répartition des fréquences alléliques dans les deux groupes

Nos résultats montrent la prédominance de l'allèle $\epsilon 3$ dans le groupe témoin avec une fréquence de 78.33%, suivie de $\epsilon 2$ (15%) et $\epsilon 4$ (6.67%). Alors que chez les malades on retrouve des fréquences 72.5% pour l'allèle $\epsilon 3$, 27.5% pour l'allèle $\epsilon 4$ et 0% pour l'allèle $\epsilon 2$.

La répartition des allèles de l'apo E 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 maladie d'alzheimer.

Dans notre étude, la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ est 27.5% soit quatre fois plus élevé dans le groupe malade que dans le groupe témoin (6.67%), présentant une variation de 20.83%.

La fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ est augmenté dans les formes tardives de la MA dans différents pays d'Europe (Deiana et al, 1998), au Etats-Unis (Saunders et al, 1993) et au japon (Frisoni et al, 1995). (Annexe 6, Tableau 6)

En Europe de l'ouest, la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ 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) (Corbo et al, 1995 ; Gerdes et al, 1992). Par conséquent la fréquence de l'allèle $\epsilon 3$ augmente du nord au sud pour atteindre une fréquence maximale de l'ordre de (0.849–0.898) au tour des pays du bassin méditerranéen (Corbo et al, 1999).

4. 3. Association génotypiques et alléliques et maladie d'Alzheimer

Tableau V : Calcul des odds ratio des sujets malades ayant un allèle $\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ par rapport aux témoins ayant un génotype $\epsilon 3/\epsilon 3$

	Odds ratio	P
$\epsilon 4$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$	7.94 (IC : 1.71 - 40.26)	0.0045
$\epsilon 3/\epsilon 4$ vs $\epsilon 3/\epsilon 3$	5,19 (IC : 1.07-27.26)	0.016

IC: Intervalles de confiance

Le calcul des Odds ratio montre que les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ présentent une association significative vis-à-vis de la survenue de la maladie d'Alzheimer.

Le risque d'association entre la maladie et l'allèle $\epsilon 4$ est augmenté chez les individus porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ par rapport à ceux portant l'allèle $\epsilon 3$.

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

Nos résultats concordent avec toutes ces études, dont une méta-analyse menée par Rubinsztein et Easton qui a porté sur 3 390 patients de plus de 65 ans. Le risque relatif (RR) 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), l'OR des sujets porteurs de deux allèles était de (11.57) (Rubinsztein et al, 2000).

L'allèle $\epsilon 4$ était établi comme un important facteur de susceptibilité pour la MA dans plusieurs groupe ethnique, mais sa contribution dans la maladie d'Alzheimer n'est pas la même dans ces différents groupes (Farrer et al, 1997).

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 afro-américaines. Chez les africains du sud de Sahara, des études ont montré une absence d'association de l'allèle $\epsilon 4$ avec la maladie d'alzheimer. (Annexe 6, Tableau 7).

Ces variations sont probablement expliquées à la fois par un patrimoine génétique et des facteurs environnementaux différents, qui sont mal documentés (Chartier-Harlin et al, 2002).

5. MTHFR et maladie d'Alzheimer

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

		ALZ		T		P
		N	%	n	%	
Les génotypes	CC	6	30	13	43.3	ns
	CT	10	50	13	43.3	ns
	TT	4	20	4	13.4	ns
Les allèles	C	22	55	39	65	ns
	T	18	45	21	35	ns

ns : non significative

Ce tableau montre que 20% patients MA étaient homozygotes (TT) pour le gène MTHFR et 50% étaient hétérozygotes (CT), alors que pour les témoins on retrouve 13.4% (TT) et 43.3%(CT). Il n'y avait aucune différence statistiquement significative dans la distribution des allèles et des génotypes chez les malades comparés aux témoins.

Notre résultat est en accord avec plusieurs études dont, Seripa et coll, n'ont trouvé aucune différence dans la distribution du polymorphisme de la MTHFR entre les cas de maladie d'alzheimer et des témoins âgés dans la cohorte américaine et la cohorte italienne (Seripa et al, 2003).

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 population polonaise ne diffère pas chez les malades Alzheimer et les témoins (Religa et al, 2003).

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 fournis en folates ; en effet, les apports quotidiens ont été estimés à 300-400 mg et sont largement suffisants pour les besoins de l'organisme (Abdelmoula et al, 2002). Ceci peut être un facteur protecteur des effets morbides du polymorphisme étudié.

Une analyse, portant sur 6000 individus, a indiqué que le génotype 677TT cause une augmentation de 70% du risque de dépression (Rozen, 2005). 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 (Rozen, 2005). Puisque la démence est caractérisée, entre autre, 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 (Ueland et al, 2005).

Une étude sur des souris dont le gène *Mthfr* est inactivé (Chen et al, 2001) provoque une altération de l'expression de plusieurs gènes du cerveau (Chen et al, 2002) et une augmentation de l'apoptose a été observée dans le cervelet (Chen et al, 2005).

Tableau VII : distribution des allèles et des génotypes de la MTHFR C677T dans la maladie alzheimer.

Fréquences alléliques et génotypiques	MA APOE $\epsilon 4(+)$	MA APOE $\epsilon 4(-)$	P
CC	03	03	ns
CT	05	05	ns
TT	03	01	ns
C	11	11	ns
T	11	07	ns

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

Aucune différence significative des allèles et des fréquences génotypiques de la MTHFR C677T dans la MA entre les porteurs et non porteurs de l'allèle d'APOE $\epsilon 4$ n'ont été détectées dans notre échantillon.

La combinaison MTHFR/TT et génotype $\epsilon 3/\epsilon 4$ a été trouvé chez 3 malades uniquement et aucun malade qui représente la combinaison MTHFR/TT et le génotype $\epsilon 4/\epsilon 4$ pour l'apo E parmi les 20 malades. Nos données ne peuvent conclure à une association entre la mutation de la MTHFR C677T et la maladie d'Alzheimer.

Cette recherche sur nos 20 malades est en accord avec trois études ayant abordé la liaison MTHFR-ApoE (45 patients dans Zuliani et collègues (Zuliani et al, 2001) ; 49 patients MA en Chapman (Chapman et al, 1998) ; et 140 patients MA dans Regland (Regland et al, 1999). Bien qu'une étude confirme l'association entre la mutation de la MTHFR C677T et la démence vasculaire (Pollak et al, 2000).

6. Etude des autres facteurs de risque

6.1. Niveau d'étude

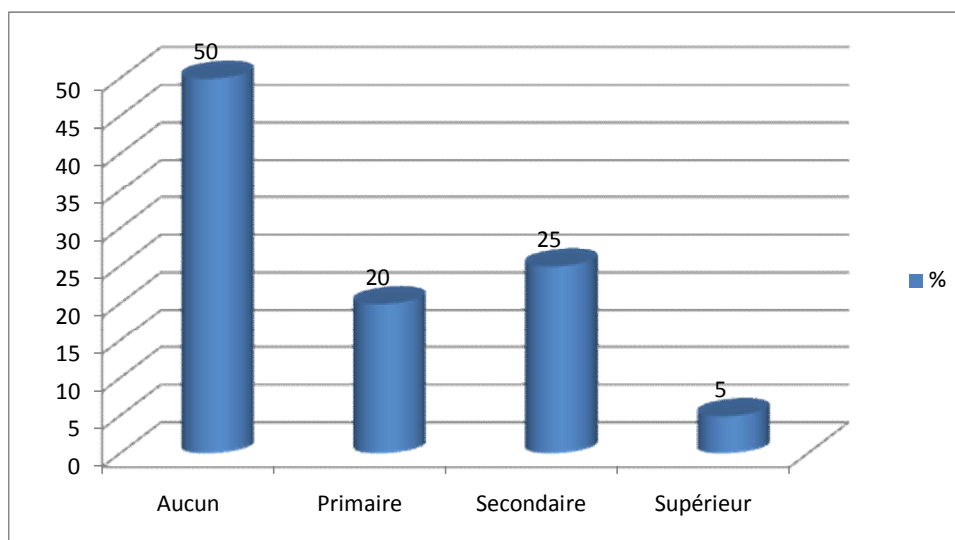


Figure 21: Répartition des malades selon leur niveau d'étude.

La moitié (50%) de nos malades sont des analphabètes suivi par des fréquences approximatives de 25% avec un niveau secondaire et 20% avec un niveau primaire et seulement 5% avec niveau supérieur. Ce résultat montre que le niveau d'éducation semble jouer un rôle important dans le risque de survenue de la maladie d'Alzheimer.

La plus part 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.

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) (Dartigues et al, 2002).

6.2. Les traumatismes crâniens

Parmi nos malades, 25% présentent des antécédents de traumatisme crânien. Alors qu'on ne trouve aucun sujet parmi les témoins qui le présente.

Tableau VIII : fréquence des traumatismes crâniens chez les malades et les témoins

	ALZ		T	
	N	%	N	%
TC	5	25	0	0

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, R.Mayeux et al ont montré qu'un antécédent de traumatisme crânien ne serait facteur que chez les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$, la superproduction de protéine β amyloïde et d'interleukine 1 après un traumatisme crânien pouvant être le mécanisme biologique de cette association (Mayeux et al, 1995). Parmi nos 5 malades qu'ils ont un antécédent de traumatisme crânien on trouve 2 porteurs de l'allèle $\epsilon 4$.

En revanche, dans une étude publiée en 1997 (O'Meara et al, 1997), le phénotype de l'Apo E ne modifie pas le risque de maladie d'Alzheimer associé aux antécédents de traumatisme Crânien

Et les résultats obtenus à partir des données d'incidence en population des études Eurodem et de Rotterdam (Zekry et al, 2002), n'ont pas retrouvé d'association significative entre traumatisme crânien et risque de maladie d'Alzheimer ou de démence.

La taille de notre échantillon et les résultats que nous avons obtenue ne nous permet pas de suggérer une association entre traumatisme crânien et la survenue de la maladie d'alzheimer.

6.3. La Dépression

Parmi nos malades 40% présentent des antécédents de dépression alors que c'est 3.3% seulement qui le présentent parmi les témoins. La différence entre les malades et les témoins est significative ($p < 1\%$).

Tableau IX : fréquence de la dépression chez les malades et les témoins

	ALZ		T		P
	N	%	N	%	
Dépression	8	40	1	3.3	<1%

Ces résultats nous permettent d'envisager que les antécédents de dépression peuvent augmenter le risque de la MA.

Cette association entre dépression et maladie d'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 Jorm (2000).

Tony Jorm se pose le problème de l'interprétation de cette association ; 6 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 (Dartigues et al, 2002).

7. Etude de quelques facteurs de risque vasculaire dans la MA

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

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 (Casserly et al, 2004).

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 K et col 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 (Alagiakrishnan et al, 2006).

7.1. Le tabagisme et l'alcool

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

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

	ALZ		T		P
	N	%	n	%	
Fumeurs	6	30	6	20	ns
Alcool	3	15	0	0	/

Dans notre groupe malade les fumeurs sont en nombre de 6 soit 30% seulement contre 70% de non fumeurs.

Ces résultats paraissent en accord avec différentes études épidémiologiques qui 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. Mais la taille limitée de notre échantillon ne nous permet pas de le montrer.

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 (Lucker et al, 2003).

Dans cette étude, 3 malades (15%) seulement étaient des consommateurs d'alcool contre 85% qui n'ont jamais consommé. D'un autre côté dans le groupe témoin on n'a trouvé aucun consommateur d'alcool.

Donc nos résultats ne montrent pas clairement l'association entre l'effet d'alcool et la maladie d'Alzheimer.

Plusieurs études trouvent que des consommations modérées d'alcool sont reconnues comme protectrices contre la maladie d'Alzheimer.

Un tel effet a 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 (Oogogozzo et al, 1997).

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 (Pierucci Lagha, 2003).

Quoiqu'il en soit, ces études d'observation ne permettent pas de conclure formellement à un lien de causalité et ces résultats peut être biaisé du fait que beaucoup de personne ne répondent pas ou ne reconnaissent pas ces habitudes.

Pour ces facteurs, qui sont prédictifs de mortalité, l'emploi du terme " protecteur " doit rester très réservé (Riggs, 1993).

7.2. Le diabète et l'hypertension artérielle (HTA)

Tableau XI : fréquence de diabète et de l'HTA chez les malades et les témoins

	ALZ		T	
	N	%	n	%
Diabète	5	25	4	13.3
HTA	9	45	13	43.3

▪Diabète :

Notre étude révèle que 25% des malades sont diabétiques contre 13.3% des témoins. Il semble que cette pathologie a un effet délétère associé à la maladie d'Alzheimer.

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 (Frey, 2001).

Dans la Rotterdam study qui a porté sur plus de 6 000 personnes âgées de 55 à 99 ans, (Ruitenberg et al, 2000), 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 $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (Peila et al, 2002).

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 (Gradman et al, 1993).

▪ *L'hypertension artérielle (HTA) :*

Notre étude révèle que 45% de nos malades sont hypertendus. Alors elle montre que l'HTA est plus fréquente chez les malades, cependant il n'existe pas de différence significative avec les témoins (43.3%). Ce résultat nous ne permet pas de suggérer une corrélation entre HTA et la MA.

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

Une étude 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) (Elias et al, 1993).

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 (Knopman et al, 2001).

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

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 (Skoog et al, 1996).

Une récente étude franco australienne suivant 1241 sujets âgés hypertendus, a montré que le traitement anti-hypertenseur 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 maladie d'Alzheimer (Breteler, 2000).

7.3. Etude du profil lipidique

Le tableau montre la différence des moyennes des différents paramètres lipidiques entre les malades et les témoins dans les deux sexes séparément.

On retrouve une différence significative pour le cholestérol et cholestérol LDL chez les hommes ($p < 0.05$).

Tableau XII : comparaison des moyennes des paramètres lipidiques dans l'Alzheimer et chez les témoins

	Hommes		Femmes	
	ALZ	T	ALZ	T
Chol (g/L)	1,83 ± 0,26	1,67 ± 0,53*	1,81 ± 0,43	1,86 ± 0,34
TG (g/L)	0,96 ± 0,35	1,28 ± 0,87	1,27 ± 0,47	1,13 ± 0,46
C-HDL (g/L)	0,41 ± 0,09	0,43 ± 0,15	0,47 ± 0,10	0,46 ± 0,07
C-LDL (g/L)	1,25 ± 0,22	1,13 ± 0,28*	1,18 ± 0,55	1,25 ± 0,31

* : $p < 0.05$

Pendant les 15 dernières années, plusieurs études épidémiologiques suggère que des taux élevé de cholestérol plasmatique peut contribuer dans la pathogenèse de la MA, ainsi, les individus ayant des taux élevé de cholestérol plasmatique, sont plus susceptible de développer la maladie d'alzheimer. (Annexe 7, tableau 8).

Le profil lipidique générale des malades de notre étude concorde avec celui de plusieurs études, dans lesquelles les patients MA ont des taux élevée de cholestérol total plasmatique, et du cholestérol-LDL (Jarvik, 1995), avec de bas niveaux d'HDL (Fernandes, 1999), 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) et communément trouvé chez les patients avec l'athérosclérose (Fernandes, 1999).

▪*Le cholestérol :*

Nos résultats montre une augmentation du taux de cholestérol chez les hommes MA 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 maladie d'Alzheimer 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.

Des taux élevée de cholestérol été associé 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 N. et col, qui ont étudiés 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. (Marwan et al).

Une étude de G. 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 élevée de cholestérol présentaient un diagnostic positive de maladie d'Alzheimer certaine en post-mortem (Lesser et al, 2001).

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 (œstrogène, 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 (Koudinova et al, 2001). Tous ces processus sont compromis avec l'âge, et il a été montré qu'ils sont perturbés pendant la maladie d'Alzheimer. De plus, les études *in vitro* ont suggéré que le cholestérol agit comme un anti-oxydant ainsi il peut avoir un effet protecteur pendant la pathogenèse des démences (Vatassery et al, 1995), probablement en captant les pro-oxydants pour créer l'oxystérols, qui sont moins toxiques que les radicaux libres.

▪ *Le cholestérol HDL :*

Notre étude montre qu'il n'y a pas de différence significative des taux du cholestérol HDL entre les malades et les témoins dans les deux sexes.

Nos résultats ne confirment pas plusieurs études épidémiologiques, montrant une association entre des taux bas de cholestérol HDL et la maladie d'Alzheimer dont, Une étude de Marwan Sabbagh et col de 2004, qui ont examiné le profil lipidique de 153 sujets MA, a montré qu'une augmentation significative des taux des HDL, et des taux plus bas de TG et de TC ont été significativement associés à la MA (Sabbagh et al, 2004).

▪ *Le cholestérol LDL :*

Nos résultats montrent une 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 de LDL et la maladie d'Alzheimer n'ont pas été parfaitement clarifiés, plusieurs groupes ont montré qu'une augmentation des LDL était associée à l'augmentation du risque de MA. D'autres ont obtenu des résultats variables.

Ainsi nos résultats sont en accord avec plusieurs études, comme celle de Lehtonen and Luutonen (Lehtonen et al, 1986), Lesser et al 2001 (Lesser et al, 2001).

▪ *Les triglycérides :*

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

Nos résultats concordent avec plusieurs études, comme celle de 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 maladie d'Alzheimer (Panza et al, 2006).

Alors que des taux élevés de triglycérides ont été rapportés dans quelques études de patients MA. (Étude de Cankurtaran et coll 2005 et Sabbagh et coll 2004) (Panza, 2006).

Dans une étude de H. U. Kotter l'examen de 75 patients souffrant d'une forme précoce de MA comparé à une population souffrant de démence vasculaires n'a pas trouvé de différence de TC entre MA et les DV et le groupe contrôle. Alors que des taux élevés de triglycérides ont été 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 (Kotter et al).

Bien que toutes ces études soient contradictoires, il apparaît 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 la maladie d'Alzheimer (Yo-Min Kuo et al, 1998).

7.4. Homocystéine et maladie d'Alzheimer :

Tableau XIII : Variation de l'homocystéine chez les deux groupes

	ALZ	T
Hcy (μ mol/L)	20,82 \pm 16,61	17,91 \pm 7,54*

* : P<0.05

Notre étude retrouve une augmentation significative de l'homocystéine (Hcy) chez les malades par rapport aux témoins ($p < 0.05$). 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 μ mol/l, au-delà de 13 μ mol/l, de l'homocystéine plasmatique majore 40% le risque d'évolution vers la maladie d'Alzheimer. La même étude révéla 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'hyperhomocystéinnémie 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 (Seshadri et al, 2002).

Conclusion

Dans ce travail, nous avons réalisé l'étude du polymorphisme génétique de l'Apo E et de la MTHFR sur un groupe de 20 patients de la maladie d'Alzheimer et groupe de 30 témoins.

Le gène de l'apolipoprotéine E constitue le seul facteur de susceptibilité génétique reconnu. La fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ dans notre étude est quatre fois plus élevée dans le groupe malade (27.5%) que dans le groupe témoins (6.67%) présentant une variation de 20.83%.

Ainsi que, nos fréquences génotypiques et alléliques confirme l'hypothèse d'un effet délétère de l'apo E4 par rapport à l'apo E3, cependant les effets de l'allèle $\epsilon 4$ ne sont souvent mis en évidence qu'avec un effectif important de patients.

En revanche la fréquence de l'allèle $\epsilon 2$ dans notre étude, est nulle dans le groupe malade et elle est de 15% dans le groupe témoins. Mais avec l'effectif réduit de notre échantillon le rôle protecteur de cet allèle $\epsilon 2$ dans la maladie n'est pas évident et reste à démontrer.

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 de la maladie d'Alzheimer ajustés à l'effet $\epsilon 4$, mais ne révèle aucune association.

Nos résultats montrent une légère augmentation des taux des TC et des LDL chez les malades par rapport aux témoins. Ces résultats concordent avec certaines études effectuées à travers le monde, mais les arguments prouvant le lien entre le profil lipidique sérique et la maladie d'Alzheimer sont encore fragmentaires et controversées.

Notre étude retrouve une augmentation significative de taux de l'homocystéine chez le groupe malade par rapport aux témoins. Ces résultats corroborent la quasi-totalité des études.

Dans cette étude l'association entre la maladie et autres facteurs de risque, l'HTA, le diabète, niveau d'étude, les antécédents de traumatismes crâniens, la consommation d'alcool et le tabagisme est évaluée.

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.

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.

Perspectives :

Cette étude peut être poursuivie par d'autres études cas témoins et de cohorte en utilisant un plus grand nombre d'échantillon. Ceci permettra de faire une étude multivariée, absente dans cette étude, qui appréciera d'avantage la relation entre les différents facteurs de risque.

La relation entre facteurs de risques cardiovasculaires et maladie d'Alzheimer doit être plus approfondie en étudiant les polymorphismes impliqués dans les risques vasculaires (interleukines, paraoxonase, enzyme de conversion d'angiotensine etc....).

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

ملخص

-الهدف من هذه الدراسة هو تحديد الأنماط الوراثية عن التغيير الجيني للبروتين الشحمي "APOE" و البروتين "MTHFR" وتعيين الأثر الناتج عن تركيز الدسم المصلي في مرض الزهيمر عند عينة من سكان قسنطينة.
-النمط الوراثي "ε3/ε4" متواجد بنسبة في العينة المصابة (55%) أكثر منها في العينة الغير مصابة. الحاملين للأليلات ε4 ، ε3/ε4 يعتبرون الأكثر إصابة بمرض الزهيمر بالمقارنة بالحاملين النمط الوراثي ε3/ε3 و ذلك لارتفاع (odds ratio) بنسبة "7.94%" و"5.19" على التوالي. هذه الدراسة تؤكد الأثر الجيني للبروتين الشحمي "APOE" والأليل "ε4" على مرض الزهيمر غير أن أثر "ε2" كحاملها منها غير موجود. لا توجد أي علاقة بين الطفرة الوراثية "MTHFR" ومرض الزهيمر.
-نلاحظ ارتفاعا طفيفا في الكولسترول الكلي و الكولسترول LDL في المجموعة المصابة مقارنة بالمجموعة الغير مصابة. لم يلاحظ أي تغيير في نسبة الكولسترول HDL و الجليسيريدات الثلاثية بين المجموعتين. الهوموسيستيين مرتفع عند المرضى مقارنة بالغير مرضى (20.82±16.61 vs 17.91±7.54).

الكلمات المفتاحية: البروتين الشحمي "APOE"، MTHFR، مرض الزهيمر، التغيير الجيني، الكولسترول، الهوموسيستيين

Résumé :

-L'objectif de notre recherche est d'explorer l'impact du polymorphisme de l'apoE, de la MTHFR et du profil lipidique sur la maladie d'Alzheimer, ainsi que le statut homocysteinémique, dans un échantillon de la population nord Constantinoise.

-Le génotype ε3/ε4 de l'Apo E est fortement exprimé chez les malades d'Alzheimer (55%). Les porteurs de l'allèle ε4 et ε3/ε4 présentent une association significative vis-à-vis de la survenue de la maladie d'Alzheimer comparativement aux sujet porteurs ε3/ε3 avec un odds ratio de 7.94 [95% CI, 1.71– 40.26] p= 0.0045 et 5.19 [95% CI, 1.07 – 27.26] p= 0.016 respectivement. Tous ces résultats mettent en évidence, l'effet délétère de l'allèle ε4 et sa contribution comme facteur de risque dans la MA. Alors que l'effet protecteur de l'allèle ε2 est moins évident. Aucune association n'a été retrouvée entre la mutation C677T de la MTHFR et de la maladie d'alzheimer.

-Le cholestérol et le C-LDL sont légèrement augmentés dans le groupe malade par rapport au groupe témoin. Aucun changement significatif dans les taux des TG et C-HDL entre les malades et les témoins n'est observé. L'homocystéine est élevée chez les malades par rapport aux témoins (20.82 ± 16.61* vs 17.91 ± 7.54).

Mots clés : ApoE, MTHFR, polymorphisme, maladie d'Alzheimer, cholestérol, homocystéine.

Abstract :

-The main of this study is to explore the impact of the polymorphism of the ApoE, the MTHFR and lipid profil on the Alzheimer's disease (AD) in a sample of Constantine population.

-The genotype ε3/ε4 of APO E is more expressed in AD subjects with frequencies of (55%). The carriers of allele ε4 and ε3/ε4 subjects compared with ε3/ε3 are associated with an increasing incidence of AD with (odds-ratio) 7.94 [95% CI 1.71-4.26] p=0.0045 and 5.19 [955, CI 1.07-27.26] p=0.016, respectively. These results put in evidence the deleterious effect of the allele ε4 and its contribution as risk factor in the AD, whereas the protective effect of the allele ε2 is less evident. No significant association of MTHFR C677T allele and genotype with AD was observed in total samples.

-Cholesterol and LDL-cholesterol were softly decreased in the patients group compared to the controls. No change was observed in the TG and HDL-cholesterol levels. Our study finds an increase in the homocystéine level among patients compared to the controls (20.82 ± 16.61* vs 17.91 ± 7.54).

Key words : ApoE, MTHFR, polymorphism, Alzheimer disease, cholesterol, homocystéine.

- Abdelmoula MS, Battaieb R, Fekih M et al** ; 2002. Le statu en folates, vitamine B12 et homocystéine du drépanocytaire tunisien. *Rev Maghr Pédiatr.* XII : 291-4.
- Adlersberg D** ; 1955. Inborn errors of lipid metabolism ; clinical, genetic, and chemical aspects. AMA. *Arch Pathol.* 60 ,481-492.
- Alagiakrishnan K, Mccracken P, Feldman H** ; 2006. Treating vascular risk factors and maintaining vascular health: Is this the way towards successful cognitive ageing and preventing cognitive decline?. *Postgrad Med J.* 82 (964), 101- 5.
- Alagiakrishnan K** ; 2007. Prise en charge des facteurs de risque vasculaires et prévention de la maladie d'Alzheimer, maladie d'Alzheimer et déclin cognitif. volume 12 page 55.
- Allsop D, Landon, Kidd M, Lowe J S, Reynolds G P, Gardner A** ; 1986. 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.* 68, 252–256.
- American Psychiatric Association** ; 2000. Critères diagnostiques (Traduction française par Guelfi J D et al). *Masson*, Paris.
- Amieva Hélène, Abdrieu Sandrine, Berr Claudine et al** ; 2007. Maladie d'Alzheimer, Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux. *Expertise collective Inserm (institut national de la santé et de la recherche médicale)*. P : 94, 95, 96.
- Amouyel P** ; 2000. Epidémiologie des maladies neurodégénératives : l'exemple des démences, *Annales de Biologie Clinique*. Volume 58, 3 : 345-9.
- Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS et al** ; 1998. Prevalence of the mutation C677-->T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet.* 78, 332-5.
- Beffert, Poirier J** ; 1996. Apolipoprotein E, Plaques, Tangles and Cholinergic Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Bioartificial Organs: Science, Medicine, and Technology*. Volume 777.P :166-174.
- Bianchetti A, Trabucchi M** ; 2001. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Aging (Milano)*. 13: 221–30.

- Breteler M M** ; 2000. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective. *Neurobiol. Aging*. 21 : 153–160.
- Britto P, Nathan Kung-Ching Chang, Stefano Bellosta, Ellen Brisch** ; 1995. The Inhibitory Effect of Apolipoprotein E4 on Neurite Outgrowth Is Associated with Microtubule Depolymerization. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* Volume 270. Number 34, Issue of August 25, pp. 19791-19799.
- Brown M S, Kovanen P T, goldstein J L** ; 1981. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*. 212 :628-635.
- Buée Luc, Delacourte Abdré** ; 2006. Taupathie et maladie d'Alzheimer, un processus dégénératif à part entière. *Psychologie, NeuroPsychiatrie du vieillissement*. Volume 4, Numéro 4, 261-73, Synthèse.
- Buée Luc, Delacourte André** ; 2002. La maladie d'Alzheimer : une taupathie parmi d'autres ? *Medecine/Science*. 18 : 727-36.
- Campbell IJ, Baxter SW, Eccles DM, Choong DYH** ; 2002. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res*. 4 :R14.
- Carmel R** ; 2000. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med*. 51 : 357-375.
- Casserly I, Topol E** ; 2004. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol and misfolded proteins. *Lancet*. 363: 1139- 1146.
- Chapman J, Wang N, Treves T A, Korczyn A D, Bornstein N M** ; 1998. ACE, MTHFR, Factor V Leiden, and APOE polymorphism in patients with vascular and Alzheimer's dementia. *Stroke*. 29 : 1401-1404.
- Chartier-Harlin M C, Crawford F, Houlden H, Warren, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J** ; 1991. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the betaamyloid precursor protein gene. *Natur*. 353 : 844-846.

- 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, Amouyel P ; 1994.** Apolipoprotein E, e4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region, *Human Mol. Genet.* 3 : 569- 574.
- Chartier-Harlin Marie-Christine, Araria-Goumidi Louisa, Lambert Jean-Charles ; 2000.** Les formes tardives de la maladie d'Alzheimer : de la génétique à la biologie médecine/sciences. 18 : 709-16.
- Chen Lan, MB, LARRY BAUM, PHD,** Apolipoprotein E Genotype and Its Pathological Correlation in Chinese Alzheimer's disease With Late Onset.
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL et al ; 2001.** Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet.* 10 : 433-43.
- Chen Z, Ge B, Hudson TJ, Rozen R ; 2002.** Microarray analysis of brain RNA in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and hyperhomocysteinemia. *Brain Res Gene Expr Patterns.* 1 : 89-93.
- Chen Z, Schwahn BC, Wu Q et al ; 2005.** Postnatal cerebellar defects in mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase. *Int J Dev Neurosci.* 23 : 465-74.
- Chen Shi A B, Kaihua Guo A, David T, Yewb, Zhibing Yao A E, Lucy Forster B, Huaqiao Wang A, Jie Xu A ; 2008.** Effects of ageing and Alzheimer's disease on mitochondrial function of human platelets. *Experimental Gerontology* xxx.
- Clarke R, Birks J, Nexo E, Ueland PM, Schneede J, Scott J, Molloy A, Evans JG ; 2007.** Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults. *Am J Clin Nutr.* 86(5) : 1384-91.
- Corbo R M, Scacchi R, Mureddu L, Mulas G, Alfano G ; 1995.** 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.* 59 : 197-209.
- Corbo R M, Scacchi R ; 1999.** Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet.* 63 : 301-310.

- Corder H, Saunders A M, Risch N J, Strittmatter W J, Schmechel D E, Gaskell P C, Rimmler JR J B, Locke P A, Conneally P M, Schmader K E, Small G W, Roses A D, Haines J L , Pericak-Vance M A ; 1994.** Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease, *E. nature genetics* 7. 180 - 184 .doi:10.1038/ng0694-180.
- Cortopassi G A, Wong A ; 1999.** Mitochondria in organismal ageing and degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1410 : 183–193.
- Coudere A ; 2000.** La recherche de marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer. *Annales de biologie clinique. Revues générales.* Volume 58, 581-93.
- Cussenot Michelle ; 1999.** Principes des techniques de biologie moléculaire. *Denis TAGU.*
- Daubner S C, Matthews R G ; 1982.** Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *J Biol Chem.* 257(1) : 140-145.
- David JL ; 2000.** L'hyperhomocystéinémie facteur du risque thrombo-embolique veineux. *Louvain Med.* 119: S191-S196.
- David S. Geldmacher and Peter J. Whitehouse, Jr (1997).** Differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology ; 48 : 2S-9S.*
- Deiana L, Pes G M, Carru C, Errigo A, Pettinato S, Carcassi C, Baggio G, Contu L ; 1998.** Lack of influence of apolipoprotein E4 on lipoprotein levels in the island population of Sardinia, *Eur. J. Clin. Invest.* 28 290–294. G.B.
- Derouesne C, Poitreneau J, Hugonot L, Kalafat M, Dubois B, Laurent B ; 1999.** mini-mental state examination (mmse). *A practical tool for evaluating cognitive status.* Volume 28, no21, pp. 1141-1148.
- Dartigues Jean-François, Berr Claudine, Helmer Catherine, Letenneur Luc ; 2002.** Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer. *Medecine/Sciences.* 18 : 737-43.
- Dhenain Mark, Lehéricy Stéphane, Duykaerts Charles ; 2002.** Le diagnostic : de la neuropathologie à l'imagerie cérébrale. *Medecine/Sciences.* 18 : 697-708.
- Dietschy JM, Turley SD ; 2001.** Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol.* 12: 105-12.

- Divry P** ; 1927. Etude histochemique des plaques séniles. *J Neurol Psychiatry*. 27 : 643-657.
- Dulcire Xavier** ; 2002. Etude de polymorphismes de gènes codant les enzymes impliquées dans le stress oxydant de maladies neurodégénératives : Alzheimer et Parkinson. Thèse.
- Edland SD, Rocca W, Petersen RC, Cha RH, Kokmen E** ; 2000. The incidence of Alzheimer's disease does not vary by gender in Rochester, MN. *Neurobiol Aging*. 21: S203.
- Elias M F, Wolf P A, D'agostino R B, Cobb J, White L R** ; 1993. "Untreated blood pressure level is inversely related to cognitive functioning: the Framingham Study". *Am J Epidemiol*. 138 : 353-64.
- Esch F S, Keim P S, Beattie E C, Blacher R W, Culwell A R, Olersdorf T** ; 1990. Cleavage of amyloid peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. 248, 1122-1124.
- Eskes TK** ; 2005. Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: Review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 124 : 130 – 133.
- Farrer L A, Cupples L A, Haines J L, Hyman B, Kukull W A, Mayeux R, Myers R H, Pericak-Vance M A, Risch N, Van Duijn CM** ; 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *J Am Assoc*. 278 : 1349- 1356.
- Ferland Mélissa** ; 2003. Préséniline1 et voies de signalisation. *Lévesque, Georges*.
- Fernandes M A** ; 1999. Effect of apolipoprotein E on blood lipid composition and membrane platelet fluidity in Alzheimer disease. *biochim.biophys. Acta*. 1454 : 89-96.
- Floyd RA** ; 1999. 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*. 26 : 1346-55.

- Forstl H, Kurz A** ; 1999. Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiat Clin Neurosci.* 249:288–90.
- Franchis R, Buoninconti A, Mandato C et al** ; 1998. The C677T mutation of the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina fibida in Italy. *J Med Genet.* 35 :1009-13.
- Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K** ; 2000. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. *Neurology.* 54 (suppl 5): S10-5.
- Frey J** ; 2001. Y a-t-il du sucre dans l'Alzheimer ? *Annales de Biologie Clinique.* Volume 59, 3 : 253-7. Revues générales.
- Friedman a G, Ruth Gabizon b** ; 1997. Apolipoprotein EE4 allele, a risk factor for late onset nonfamilial Alzheimer's disease among Israeli Jews. *Gerontology and Geriatrics.* 24 : 175-181.
- Frisoni L G B, Govoni S, Geroldi C, Bianchetti A, Calabresi L, Franceschini G, Trabucchi M** ; 1995. Gene dose of the ϵ_4 allele of apolipoprotein E and disease progression in sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 37 : 596–604.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R et al** ; 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 10: 111-3.
- Fukuda R, Nagata K, Isse K, Ueki A, Kazamatsuri H** ; 1994. Association of apolipoprotein E4 with sporadic Alzheimer's disease is more pronounced in early onset type. *Neurosci. Left.* 175 : 74-76.
- Gerdes L U, Klausen I C, Sihm I, Faergeman O** ; 1992. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet. Epidemiol.* 9 : 155–167.
- Gibson Wood W, Eckert GP, Igbavboa U, Muller WE** ; 2003. Amyloid betaprotein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1610: 281–90.
- Girard J F, Canestri Ana** ; 2000. La maladie d'Alzheimer. P : 6.

- Gos M, Szpecht-Potocka A** ; 2002. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet.* 43(4): 511-524.
- Govaerts J, Schoenen D, Bouhy** ; 2007. Pathogenie de la maladie d'alzheimer : les mecanismes moleculaires et cellulaires. *Rev Med Liege.* 62 : 4 : 209- 215.
- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan MV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R** ; 1994. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat. Genet.* 7: 195–200.
- Goyette P, Pai A, Milos R et al** ; 1998. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* 9(8): 652-666.
- Gradman TJ, Laws A, Thompson LW, Reaven GM** ; 1993. Verbal learning and/or memory improves with glycemic control in older subjects with non-insulindependent diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc .* 41:1305-1312.
- Grzeschik K H, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B** ; 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.*325 :733-736.
- Guillaume Daniel, Bertrand Philippe, Dea Doris, Davignon Jean, Poirier Judes** ; 1996. Apolipoprotein E and Low-Density Lipoprotein Binding and Internalization in Primary Cultures of Rat Astrocytes: Isoform-Specific Alterations. *Journal of Neurochemistry June.* 66(6):2410-2418.
- Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, Refsum H** ; 1996. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (>40 mmol/l). The Hordaland homocysteine study. *J Clin Invest.* 98:2174–83.
- Guy linder** ; 1999. Abrégé de biochimie alimentaire, 4^{ème} édition, *Masson.*
- Haass C, Grunberg J, Capell A** ; 1998. Proteolytic processing of Alzheimer's disease associated proteins. *J Neural Transm Suppl.* 53 : 159-67.
- Hayashi H, Igbavboa U, Hamanaka H** ; 2002. Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Neuroreport.* 13: 383–86.

- Hirokawa N, Shimura Y, Okabe S** ; 1988. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell. Biol.* 107, pp. 1449– 1459.
- Hixson JE, Vernier DT** ; 1990. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *Journal of Lipid Research*. Volume 31, 545-548.
- Hung AY, Selkoe DJ** ; 1994. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of b-amyloid precursor protein. *EMBO J* .13: 534–542.
- Igbavboa U, Avdulov NA, Schroeder F, Wood WG** ; 1996. Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice. *J Neurochem.* 66: 1717–25.
- Institut National de prévention et d'Education pour la santé (inpes)** ; 2005. Maladie d'Alzheimer : Un outil d'éducation pour la santé du patient. *Dossier de presse*.
- Isber S** ; 2006. The role of poor nutritional status and hyperhomocysteinemia in complicated pregnancy in Syria. Thesis dissertation for awarding the degree of doctor of theoretical medicine.
- Ivanoiu A** ; 2003. Sémiologie de la maladie d'alzheimer et des démences non alzheimer évaluation des troubles démentiels. 122: S110-S131. S110.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR et al** ; 1996. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 93:7-9.
- Jacobsen DW** ; 1998. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem.* 44: 1833-1843.
- Jacobsen DW** ; 2001. Practical chemistry of homocysteine and other thiols. In homocysteine in health and disease. *Cambridge University Press*. pp 9-20.
- Jarvik G P** ; 1995. Interaction of apolipoprotein E genotype, total cholestérol level, and sex in prediction of alzheimer disease in case control study. *Neurobiology.* 45, 1092 - 1096.

- Jerbil Z, Abdennebi M, Douik H, Ben Romdhane H, Harzallah L, Guemira IF, Ghanem I** ; 2005. A Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Ann Biol Clin.* 63 (5): 487-91.
- Jignatius M, Gebicke-Harter P J, Skene J H, J W Schilling J W, Weisgraber K H, Mahley R W, Shooter E M** ; 1986. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(4): 1125–1129.
- Joachim CL, Selkoe DJ** ; 1992. The seminal role of B-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 6 : 7–34.
- Kalaria R** ; 2002. Similarities between Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci.* 203-204 : 29-34.
- Kang J, Lemaire H G, Unterbeck A, Salbaum J M, Masters C L, Evin G, Weidemann A** ; 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* .23 : 1285 1297.
- Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N** ; 1991. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 48:536-45.
- Kang S, Wong PWK, Becker N** ; 1979. Protein-bound homocyst(e)ine in normal subjects and in patients with homocystinuria. *Pediatr Res.* 13:1141-I 143.
- Knopman D, Boland L L, Mosley T, Howard G, Liao D, Szklo M, McGovern P, Folsom A R** ; 2001. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. "Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middleaged adults". *Neurology.* 56: 42-8.
- Kosik K. S, Joachim C L, Selkoe D J** ; 1986. Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .83 : 4044–4048.
- Kostulas K, Crisby M, Huang WX, et al** ; 1998. A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischaemic stroke and in carotid artery stenosis. *Eur J Clin Invest.* 28:285-9.
- Kotter U, Hampel IM, Meller H J.** Total serum cholesterol and triglycerides in patients with Alzheimer's disease and healthy controls. H. Møller Psychiatric Hospital, Ludwig Maximilian-University, Munich, Nussbaumstr. 7, 80336 Munich, Germany.

- Koudinova A R, Koudinova N V** ; 2001. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J.* 15, 1858–1860.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ** ; 2002. For the nutrition committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.*106 : 2747-57.
- Kuo HK, Sorond FA, Chen JH, Hashmi A, Milberg WP, Lipsitz LA** ; 2005. The role of homocysteine in multisystem age-related problems : a systematic review. *J Gerontol Med Sci.* 60 A, 9 : 1190-1201.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F** ; 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(7) : 3922-3927.
- Lebert F, Pasquier F** ; 1999. Signes et symptômes comportementaux et psychologiques de la démence. *Encycl Méd Chir (Elsevier Paris) Neurologie.* 17-057, A35, 7 p.
- Lechechowski B, Forette L, Teillet** ; 2004. Démarche diagnostique devant un syndrome démentiel. *La revue de médecine interne.* 25 363–375.
- Lehtonen A, Luutonen S** ; 1986. High-density lipoprotein cholesterol levels of very old people in the diagnosis of dementia. *Age Ageing.* 15, 267–270.
- Lesser G, Kandiah K, Libow L S, Likourezos A, Breuer B, Marin D, Mohs R, Haroutunian V, Neufeld R Bronx** ; 2001. Elevated Serum Total and LDL Cholesterol in Very Old Patients with Alzheimer's Disease Veterans Affairs Medical Center. *Bronx, N.Y, USA.* volume 12.
- Letenneur L, Gilleron V, Commenges D, Helmer C, Orgogozo JM, Dartigues JF** ; 1999. Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 66: 177-83.
- 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?
- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E et al** ; 1995. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *science.* 269, 970-973.

- Li MD PHD, Shofer J B MS, Kukull W A PHD, Tsuang MD, J.C.S. Breitner MD MPH, W McCormick MD MPH, J D Bowen MD, L Teri PHD, G D Schellenberg PHD, E B Larson MD MPH.** Serum cholesterol and risk of Alzheimer disease A community-based cohort study G.
- Lipton SA, Kim WK, Choi YB et al ;** 1997. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 :5923-5928.
- Luchsinger JA, Tang MX, Miller J, Green R, Mehta PD, Mayeux R ;** 2006. Relation of plasma homocystéine to plasma amyloids-beta. *Neurochem Res.* Epub ahead of print.
- Lucker Lise, Hovaguimian Frédérique, Arnaud Naville, Groebli Fabienne ;** 2003. La maladie d'Alzheimer : parcours du combattant. *Faculté de Médecine de Genève – Immersion en communauté.*
- Mann RK, Beachy PA ;** 2000. Cholesterol modification of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1529: 188-202.
- Marlène FOUCHEY ;** 2008. La Maladie d'Alzheimer – *Historique.*
- Marques MA, Tolar M, Harmony JA, Crutcher KA ;** 1996. A thrombin cleavage fragment of apolipoprotein E exhibits isoform-specific neurotoxicity. *Neuroreport.* 4;7(15-17):2529-32.
- Marwan N, Sabbagh, Joanne Ceimo H, Reza Zahiri, William V, Gaul D, Larry.** Sparks the lipid profilin the alzheimer's disease. 1 Sun Health Research Institute, Sun City, AZ, USA; 2Midwestern University, Glendale, AZ, USA; 3Advanced Cardiology Group, Sun City, AZ, USA.
- 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.* Volume 6. Number 6/2004 585-589.
- Masson D, Mainard F, Auget J L, Chivot L ;** 1992. Effect of precipitation and centrifugation conditions on high density lipoprotein cholesterol measured with phosphotungstate-magnesium reagent. *Clin chem.* 38/1 :148.

- Mayeux R, Ottman R, Maestre G** ; 1995. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 45 : 555-557.
- Meleady R, Ueland Per M, Blom H et al** ; 2003. Themolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk : The European concerted action project. *Am J Clin Nutr*. 77 :63-70.
- Miner SE, Evroski J, Cole DE** ; 1997. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism : an update. *Clin Biochem*. 30 : 189-201.
- Moreaud Olivier** ; 2004. Maladie d'Alzheimer. P : 2.
- Mouchabac Stéphane** ; 2008. Homocystéine, hyperhomocystéinémie et dépression. *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats*. 32 :9-18.P : 9-10.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DE, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH** ; 2000. Homocysteine and its disulfide derivatives: A suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20: 1704-1706.
- Myron F, Weiner, Gloria Vega, Richard C, Risser**. Apolipoprotein Ee4, Other Risk Factors, and Course of Alzheimer's Disease.
- Nakai M, Kawamata T, Taniguchi T, Maeda K, Tanaka C** ; 1996. Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia. *Neurosci Lett*.14;211(1):41-4.
- Narayanaswami V, Samuel S W, Szeto, Ryan RO** ; 2001. Lipid Association-induced N- and C-terminal Domain Reorganization in Human Apolipoprotein E3. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc*. Volume 276, 41, pp : 37853–37860.
- Narita, Masaaki BU, Guojun Holtzman, David M, Schwartz, Alan L** ; 1997. The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein, a Multifunctional Apolipoprotein E Receptor, Modulates Hippocampal Neurite Development. *Journal of Neurochemistry*.68(2):587-595.

- Nelen WLDM, Blom HJ, Thomas CMG, Steegers EAP, Boers GHJ, Eskes TKAB ;** 1998. 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.* 128:1336–1341.
- Notkola I M, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A ;** 1998. Serum total cholesterol, apolipoprotein E e4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology.* 17, 14–20.
- O'meara SE, Kukull WA, Sheppard L ;** 1997. Head injury and risk of Alzheimer's disease by apolipoprotein E genotype. *Am J Epidemiol.* 146 : 373-384 .
- Olaisen B, Teisberg P, Gedde-Dahl T JR ;** 1982. The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man *Human Genetics Human Genetics* .Volume 62, Number 3.
- O'leary, Daly L, Murray S, Conley M, Mayne P, Kirke OPN, Mills JL, Molloy AM, Brody LC, Smith VB and Scott JM ;** 2004. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. *BMJ.* 328 : 1535-1536.
- Oogogozzo JM, Dartigues JF, Lafont S ;** 1997. Wine consumption and dementia in the elderly : a prospective community based study in the Bordeaux area. *Rev Neurol.* 153 : 185-192.
- Panza Francesco ;** 2006. Serum total cholesterol as a biomarker for Alzheimer's disease: Mid-life or late-life determinations?, *Experimental Gerontology* .41 : 805–806.
- Panzaa Francesco, D'introno Alessia, Colacicco Anna Maria, Capursob Cristiano, Pichichero Gianfranco ;** 2006. Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain research reviews.* 51 : 275-292.
- Panza Francesco, Solfrizzi Vincenzo, D'introno Alessia, M Anna ;** 2008. Higher total cholesterol, cognitive decline, and dementia. *Neurobiology of Aging.*
- Pasquier F, Bail L, Lebert F, Pruvo J.P, Petit H ;** 1994. Determination of medial temporal lobe atrophy in early Alzheimer's disease with computed tomography. *Lancet.* 343: 861-862.

- Peila R, Rodriguez BL, LaunerAUNER LJ** ; 2002. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: the Honolulu- Asia aging study. *Diabetes*. 51: 1256- 1262.
- Pierucci Lagha Amira** ; 2003. Christian Derouesné, alcool et vieillissement, Psychologie & NeuroPsychiatrie du vieillissement. Volume 1, Numéro 4, 237-49.
- Pollak R.D, Friedlander Y, Pollak A, Idelson M, Bejarno-Achache I, Blumenfeld A** ; 2000. Ethnik differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in healthy Israeli populations. *Genet Test*. 4 : 309-311.
- Refsum H, Helland S, Ueland PM** ; 1985. Radioenzymic determination of omocysteine in plasma and urine. *Clin Chem*. 3 1:624-628.
- Regland B, Blennow K, Germgerd T, Kech-Schmidt AC, Gottfries CG** ; 1999. The role of the polymorphic genes Apolipoprotein E and Methylenetetrahydrofolate reductase I the developement of dementia of the Alzheimer type. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 10 : 245-251.
- Reitz Christiane MD, Tang Ming-Xin PHD, JOSE Luchsinger Jose MD, Mayeux Richard** ; 2004. MD Arch Relation of Plasma Lipids to Alzheimer Disease and Vascular Dementia *Neurol*. 61:705-714.
- Religa D, Styczynska M, Peplonska B et al** ; 2003. Homocysteine, apolipoproteine E and methylenetetrahydrofolate reductase in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 16 : 64-70.
- Riggs JE** ; 1993. Smoking and Alzheimer's disease. Protective effect or differential survival bias. *Lancet*. 342 : 793-794.
- Ritchie K, Kildea D** ; 1995. Is senile dementia « age-related » or « ageing-related »? Evidence from meta-analysis of dementia prevalence in the oldest old. *Lancet* .346 : 931-4.
- Ronald B, Demattos, Robert P. Brendza, John E. Heuser, Mmalca KiersonI, John R, Cirrito, John Fryer, Patrick M, Sullivan, Anne M, Fagan, Xianlin Han, David M, Holtzman** ; 2001. Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containin lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochemistry International*. Volume 39, Issues 5-6, Pages 415-425.

- Roses A D, Haines J L, Pericak-Vance M A ;** 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261:921-923.
- Rozen R ;** 1997. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost*. 78:523-6.
- Rozen R ;** 1998. Méthylène-tetrahydrofolate reductase in vascular disease, neural tube defects and colon cancer. *Europharma*, SA.
- Rozen R ;** 2005. Méthylène-tetrahydrofolate reductase gene polymorphism – clinical implications. In : Fuchs J, Podda M, eds. *Encyclopedia of medical genomics and proteomics*. New York : Taylor and Francis Group. DOI : 10.1081/E-EDGP-120030861.
- Rubinsztein DC, Easton DF ;** 2000. Apolipoprotein E genetic variation and Alzheimer's disease. a meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 11(4):238.
- Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H et al ;** 2002. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem*. 277 :12915-20.
- Saunders A M, Strittmatter W J, Schmechel D ST, Georgehyslop PH, Pericak-Vance M A, Joo S.H, Rozi B.L, Gusella J.F, Crapper-Maclachlan D.R, Albert M.J, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses A.D ;** 1993. Association of apolipoprotein E allele e4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 43 1467-1472.
- Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB ;** 1998. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet*. 62:1258-60.
- Selhub J, Miller JH ;** 1992. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr*. 55:131–138.
- Selkoe DJ ;** 2002. Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin invest*. 110 (10) : 1375-1381.
- Seripa D, Forno GD, Matera MG et al ;** 2003. Méthylène-tetrahydrofolate reductase and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms in tow genetically and diagnostically distinct cohort of Alzheimer's patients. *Neurobiol Aging*. 24 : 933-939.

- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF et al ; 2003.** Plasma homocysteine as a risk factor dementia and Alzheimer's disease. *N Engl Med.* 346 : 476-483.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y et al ; 1995.** Cloning of a novel gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer disease. *Nature.* 375, 754-760.
- Simon M, Hone E, Gandy S, Martin R ; 2003.** Expanding the association between the APO E gene and the risk of alzheimer's disease : possible roles for APO E promoter polymorphisms and alteration in APO E transcription. *Journal of neurochemistry.* 84 :1215-1236.
- Skoog I, Lernfelt B, Landahl S ; 1996.** "15-year longitudinal study of blood pressure and dementia". *Lancet.* 347 : 1141-5.
- Soo-Sang Kang, Paul WK, Wong, Jiemin Zhou, Heron Y Cook ; 1986.** Total Homocyst(e)ine in Plasma and Amniotic Fluid of Pregnant Women. *Metabolism Clinical and Experimental.* 35(10):889-91.
- Souhila HAMMADI ; 2009.** L'Alzheimer émerge en Algérie.
- Soulié Cathia ; 2004.** Apolipoprotéine E. Thèse DEA DE Ferreira Stéphanie.
- Stern RG, Mohs RC, Davidson M ; 1994.** A longitudinal study of Alzheimer's disease: measurement, rate, and predictors of cognitive deterioration. *Am J Psychiatry.* 151 : 390-6.
- Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ, Jr ; 1997.** Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *Am J Hum Genet.* 60:229-30.
- Strittmatter W J, Saunders A, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen O S, Roses A D ; 1993.** Apolipoprotein E: highavidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* c 90, 1977-1981.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D et al ; 1993.** Apolipoprotein E: highavidity binding to betaamyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90 : 1977- 81.

- Strittmatter W J, Saunders A M, Goedert M, Weisgraber K H, Li-Ming Dong, Schmechel D, Roses A D ; 1994.** Isoform-specific interactions of apolipoprotein e with microtubule-associated protein tau : implications for alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* volume 91, no23, pp : 11183-11186.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP et al ; 1991.** Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 30: 572-80.
- Tomassoli Isabelle ; 2010.** Synthèse et évaluation de nouveaux dérivés quiniques impliqués dans les maladies neurodégénératives. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté. France.
- Totowa NJ.** Alzheimer's Disease: Methods and Protocols, Edited by: *N. M. Hooper* © *Humana Press Inc., Methods in Molecular Medicine*, Vol. 32.
- Ueland PM ; 1995.** Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem.* 41: 340-342.
- Ueland PM, Rozen R (eds) ; 2005.** MTHFR polymorphisms and disease. Georgetown: *Landes Bioscience/Eurekah.com.* 210 p.
- Utermann G, Steinmetz A, Weber W ; 1982.** Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism : comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet.* 60 :344-51.
- Van der Put NMJ, Van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FJM, Eskes Tkab, Mariman ECM, Den Heyer M, Blom HJ ; 1996.** Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the C677T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med.* 74:691–694.
- Vanier MT ; 1999.** Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain:personal experience and review of the literature. *Neurochem Res.* 24: 481-9.
- Vassar R, Bennett B D, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz E.A, Denis P, Teplow D.B ; 1999.** Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursorprotein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286, 735-741.

- Vatassery G.T, Smith W.E, Quach H.T, Lai J.C ; 1995.** In vitro oxidation of vitamin E, vitamin C, thiols and cholesterol in rat brain mitochondria incubated with free radicals. *Neurochem. Int.* 26, 527–535.
- Vazquez M, Merlos M, Adzet T, Laguna J.C ; 1998.** Influence of lipid profile and fatty acid composition on the oxidation behavior of rat and guinea pig low density lipoprotein, *Comp. Biochem. Physiol., B Biochem. Mol. Biol.* 119 311–316.
- Wahrle S, Das P, Nyborg AC ; 2002.** Cholesterol-dependent gammasecretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis.* 9: 11–23.
- Wagner C ; 1995.** Biochemical role of folate in cellular metabolism. In : Baily LB ed, Folate in Health and Disease. *Marcel Dekker, New York.* 23-42.
- Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K ; 1989.** Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* 57: 115–126.
- Wilson C, Wardell M R, Weisgraber K H, Mahley R W, AN Aagard D A ; 1991.** Three-dimensional structure of the LDL receptorbinding domain of human apolipoprotein E. *Science.* 252, 1817–1822.
- Wisniewski T, Frangione B ; 1992.** Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci. Lett.* 135, 235–238.
- Wisniewski Thomas, Ghiso Jorge, Frangione Blas ; 1997.** Biology of A β Amyloid in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Disease.* Volume 4 Issue 5, Pages 313-328.
- Yadong Huang, Karl H.Weisgraber, Lennart Mucke Robert W, Mahley ; 2004.** Apolipoprotein E Diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience.* Volume 23, Number 3.
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-Ura K, Furuya H, Sakaki Y ; 1991.** Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene.* 87, 257–263.
- Yu-Min Kuo, Mark R Emmerling, Charles L Bisgaier, Arnold D Essenburg, Heather C Lampert, Denise Drumm, Alex E Roher ; 1998.** Biochemical and biophysical research communications. 252, 711– 715.

Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ et al ; 1982. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes and phenotypes. *JLipid Res.* 23 :911-4.

Zannis VI, Just PW, J L Breslow ; 1981. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet.* 33(1): 11–24.

Zekry D, HauwJJ, Gold G ; 2002. Mixed dementia: epidemiology, diagnosis, and treatment, *J. Am. Geriatr. Soc.* 50, pp. 1431–1438.

Zittoun J ; 1998. Homocystéine et pathologie vasculaire. *Rvue Hématologie.* 4:7-16.

Zuliani G, Ble A, Zanca R, Munari MR, Zurlo A, Vavalle C, Atti AR, Fellin R ; 2001. Genetic polymorphisms in older subjects with vascular or Alzheimer's dementia. *Acta Neurol. Scand.* 103 : 304-308.

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 mot 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

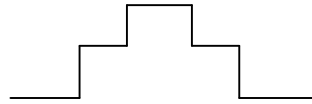
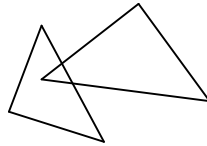
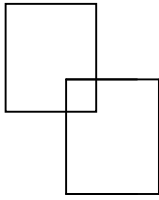
Questions alternatives :

- Récitez les jours de la semaine.
- Test de reconnaissance de visage sur photo.
- Mime 'utilisation d'objet (se peigner).
- Annaux 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 de formes (assemblage formé avec des allumettes).
- Dessin spontané : Maison – Fleurs – Horloge – Etoile.

SCORE TOTALE (0 - 30) :

Annexe 2 : le questionnaire
Fiche synthétique TCND (troubles cognitifs neuro-dégénératifs) Neurologie

N°: _____ **Service :** _____

Diagnostic : _____ **Score MMSE :** _____ **Génotype:** _____

Alzheimer : probable possible

Nom : prénom : âge : sexe :

Taille : poids :

Niveau d'étude : aucun
Primaire
Secondaire
Supérieur

Profession : ouvrier **préciser :** actif
Agent retraité
Fonctionnaire chômage
Cadre
Cadre supérieur
Libérale

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)

Antécédents psychiatriques :

Syndrome dépressif	épisode maniaque
Syndrome confusionnel	troub obsession compulsion
Episode délirant	autres

Antécédents familiaux :

Alzheimer :	degré de parenté : 1 ^{er} degré	2 ^{ème} degré	3 ^{ème} degré
-------------	--	------------------------	------------------------

Motif de consultation :

1-Troubles mnésiques :	oui	non	
	Trouble de la mémoire des faits anciens		
	Trouble de la mémoire des faits récents		
2-Apraxie	aphasie	agnosie	désorientation temporo-spatiale
3-troubles des fonctions exécutifs			
4-trouble du comportement	d'humeur		sommeil
5-trouble de motricité			
6-Trouble de comportement alimentaire			
7-autres			

Mode de début :

Age de début :

Année apparente du premier signe :

Mode de début : **brutale** **progressif****Evolution de la maladie :** numéroté l'ordre

1-Troubles mnésiques :	oui	non	
	Trouble de la mémoire des fait anciens :		
	Trouble de la mémoire des fait récents :		
2-Apraxie	aphasie	agnosie	désorientation temporo-spatiale
3-troubles des fonctions exécutifs			
4-trouble du comportement	d'humeur		sommeil
5-trouble de motricité			
6-Trouble de comportement alimentaire			
7-autres			

Annexe 3 : L'extraction de l'ADN (Technique au NaCl)

1. Préparation des leucocytes :

1. Dans un tube falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 25 ml avec du TE 20 :5. Laisser 10 min dans la glace.
2. Centrifuger 10 min à 3900 g (3800 rpm).
3. Aspirer le surnageant avec la trompe à vide.
4. Ajouter quelques ml de TE 20 :5 au culot et le remettre en suspension avec une pastette stérile.
5. Compléter à 25 ml du TE 20 :5 et laisser 10 min dans la glace.
6. Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.
7. Aspirer le surnageant avec la trompe à vide : Obtention d'un culot des leucocytes (si on veut s'arrêter à ce niveau les mettre dans un tube nunc de 1,5 ml avec du TE 10 :1 et les conserver à -20° dans le frigo).

2. Extraction de l'ADN :

1. Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml.
2. Ajouté 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 8,2) en dilacérant le culot avec une pastette stérile.
3. Ajouté 200 μ l de SDS à 10%.
4. Ajouté 100 μ l de protéinase K à 10 mg/ml.
5. Agiter le tube sur une roue à 37°C une nuit.
6. Le lendemain, refroidir dans la glace.
7. Ajouté 1 ml de NaCl 4 M et agiter vigoureusement à la main.
8. Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
9. Centrifuger 15 min à 2500 rpm.
10. Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 15 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : La pelote d'ADN se forme.
11. Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote ne se forme pas.
12. Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette Pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70%
13. Mettre la pelote dans un tube nunc.

3. Solubilisation :

1. Ajouter entre 300 et 1000 μ l de TE 10 :1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
2. Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C , puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

Annexe 4 : l'Apo E

Tableau 1: Préparation du milieu réactionnel de la PCR

Mix de PCR	Quantité en μl
Tampon de Taq 10X	7.5
DMSO	7.5
Mix dNTP 25mM (au 1/10)	6 (200 μM)
Taq polymérase 2,5 u	0.5
Mg Cl2 50mM	3
OG solution fille	1.2 (0.6 μM)
OD solution fille	1 (0.6 μM)
H2O q.s.p 75 μl	46.3
ADN	2
Total du volume	75

- Oligonucléotides utilisés :

OD : 5' - ATG GCG CTG AGG CCG CGC TC- 3'

OG : 5' - AAC AAC TGA CCC CGG TGG CG- 3'

-Cycles PCR

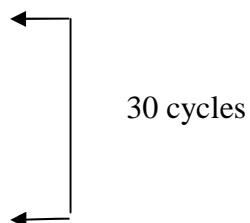
5' à 94°C

3' à 65°C

. 50s à 72°C

. 50s à 94°C

. 50s à 65°C



5' à 72 °C

10' à 10° C

Tableau 2: préparation du milieu de digestion par l'enzyme HhaI

Milieu de digestion	Quantité en μ l
Tampon de l'HhaI	2.5
HhaI	1
H2O qsp 10 μ l	6.5
produit de PCR	15
Volume total	25

Tableau 3 : Préparation d'un gel d'acrylamide 10%

Composition de gel d'acrylamide 10%	Quantité
Acrylamide / bis 30%	25 ml
TBE 10X	7.5 ml
H2O	42.5 ml
Volume total	75 ml

Pendant que les réactifs se remettent à température ambiante

- . On Prépare le persulfate d'ammonium à 10% (0.01g dans 100 μ l H₂O)
- . Addition de persulfate d'ammonium et de temed juste avant de couler le gel
 - 50 μ l de persulfate/10ml (350 μ l)
 - 10 μ l de temed /10ml (70 μ l)

Dépôts des échantillons :

- 15 ml de produits de digestion + 2 à 3 ml de Bleu d'acrylamide.
- 2 ml de marqueur (PM 20pb LADDER ref.018206) + 2 à 3 ml de Bleu d'acrylamide

Annexe 5 : le MTHFR

Tableau 4 : Préparation du milieu réactionnel (ou mix) de PCR

Mix de PCR	µl/test
Tampon 10 X	5
DNTP (2mM)	5
H2O	35.2
MgCl2 (25mM)	3
Oligo F(Forward)	0.2
Oligo R (reverse)	0.2
Taq polymérase (2.5)	0.4

-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

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.

Tableau 5: préparation du milieu de digestion par l'enzyme Hinf I

Mix de la digestion	µl/test
Tampon	4
Hinf I (10u/µl)	1
H2O	5
BSA	0.2

Dans chaque tube, sont mélangés 10 µl du mix avec 30 µl du produit de PCR.

Annexe 6 :**Tableau 6 :** Fréquences alléliques de l'Apo E dans différentes études dans le monde.
(Corbo et al, 1995 ; Gerdes et al, 1992 ; Corbo et al, 1999).

		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

Tableau 7 : 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 (Chartier-Harlin et al, 2002)

	Populations afro-américaines		Populations hispaniques		Populations japonaises		Populations caucasiennes	
	OR	IC 95 %	OR	IC 95 %	OR	IC 95 %	OR	IC 95 %
$\epsilon 2/\epsilon 2$	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]

Annexe 7 : Tableau 8 résumant quelques études associant le profil lipidique et la MA (Panzaa et al, 2006 ; Panza, 2006 ; Panza et al, 2008).

Référence	Sujets	Diagnostic	Résultats
Jarfik 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 $\epsilon 4$ 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'apo E.
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 le MA pendant un âge plus avancé.
Boston et al. (1999)	222 cas MA 34 DV	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 Résidents à new-work Agées 75.8 + 6.4	MA	Des taux bas de CT sont associés avec l'augmentation de l'incidence de MA, indépendamment du génotype de l'Apo E.
Evans et al. (2000)	524 sujets Afro-Américains ayant un age supérieur à 65 ans	Démence	l'augmentation des taux du CT été associé avec l'augmentation du risque de MA dans le groupe non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$. Aucune association n'a été retrouvée chez les porteurs de l' $\epsilon 4$.
Kivipelto et al. (2001)	1449 sujets âgés de 65 à 79 ans	Incidence de dimence, de la MA et de DV	L'augmentation des taux de CT et la pression artérielle pendant l'âge moyen et particulièrement lacombinaison de ces deux facteurs augmente le risque de MA.

Bonarek et al. (2000)	Etude cas témoins de 334 français âgés tous de plus de 73 ans et qui ont participé l'étude PAQUID 37 cas démence 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'Apo E.
Kalmijn et al. (2000)	3734 (80%) âgés de 71 à 93 ans ayant participé dans une étude de cohorte 8006 Personnes d'origine américano-japonaise	Incidence de la MA	Après ajustement du sexe de l'âge du niveau d'éducation, de l'DCL, aucune association n'a 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 élevés 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 statu de l'apo E.
Solfrizzi et al. (2002)	61 cas MA 63 témoins	MA	Des taux bas de TC et les concentrations sériques de l'apolipoprotéine A était fortement associé avec l'augmentation du risque de MA indépendamment de l'Apo E 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, Agées plus de 65 ans et résidant au nord de Manhattan, New York	Incidence MA	Des taux élevés de TC était associés a une diminution de l'MA après ajustement de l'apo E 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 élevés de cholestérol été associée a l'augmentation des risques de démence mais de pas de la MA.