



**HAL**  
open science

# Etude des apolipoprotéines et d'autres marqueurs du liquide céphalorachidien dans la maladie d'Alzheimer

Aksam Merched

► **To cite this version:**

Aksam Merched. Etude des apolipoprotéines et d'autres marqueurs du liquide céphalorachidien dans la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1998. Français. NNT: 1998NAN10358 . tel-01775521

**HAL Id: tel-01775521**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775521>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

1998

---

 ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE ET SANTE »
 

---

## THESE

Présentée et soutenue publiquement  
le 4 Mars 1998

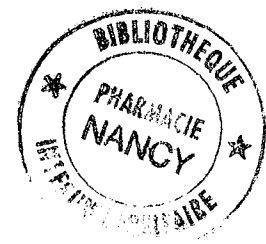
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE  
HENRI POINCARÉ - NANCY I  
Mention Biochimie Clinique

par

**Aksam MERCHED**

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies  
et du Magistère de *Microbiologie et Enzymologie*



Sujet

**Etude des Apolipoprotéines et d'autres Marqueurs du  
Liquide Céphalorachidien dans la Maladie d'Alzheimer**

## MEMBRES DU JURY

Juges	:	Monsieur le Professeur G. Siest (Directeur de la thèse)	(Nancy)
		Madame le Docteur S. Visvikis	(Nancy)
		Monsieur le Professeur W. Ruff	(Washington)
		Monsieur le Professeur H. Vespignani	(Nancy)
Rapporteurs	:	Monsieur le Professeur A. Delacourte	(Lille)
		Monsieur le Professeur E. Rassart	(Montréal)
Membre invité:		Monsieur le Docteur J.-M. Serot	(Mont St Martin)



104 035788 3

Référence : SCD\_T\_1998\_0358\_MERCHED

Titre : Etude des alipoprotéines et d'autres marqueurs du liquide Céphalorachidien dans la maladie d'Alzheimer

Pages manquantes :

- Page 73
- Page 79
- Dans publications : publication n°2 incomplète

# FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

## Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON  
Vice Doyen : G. CATAU

### PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André	M. MIRJOLET Marcel
Mlle BESSON Suzanne	M. PIERFITTE Maurice
Mlle GIRARD Thérèse	M. SOLEIL Jean
M. MEUNIER André	

### PROFESSEURS

M. ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M. ATKINSON Jeffrey	Pharmacodynamie
M. BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle BATT Anne Marie	Toxicologie
M. BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M. BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mlle GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M. HENRY Max	Biologie végétale
M. HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M. JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M. LABRUDE Pierre	Physiologie
M. LALLOZ Lucien	Chimie organique
M. LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M. LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique
M. MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M. MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M. MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M. MORTIER François	Pharmacognosie
M. NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
Mme SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M. SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M. SIEST Gérard	Chimie Biologique
M. SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M. VIGNERON Claude	Hématologie

## MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Chimie Analytique
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mlle	HASENFRATZ Marie Paule	Biologie Végétale
Mlle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mlle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

## ASSISTANTS

Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

## PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier

Monsieur le Professeur G. SIEST pour m'avoir donné la chance de mener ce travail au Centre de Médecine Préventive. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide précieuse et amicale et le grand intérêt que vous avez porté à mon travail.

Madame le Docteur S. VISVIKIS pour avoir accepté de diriger ce travail et l'avoir encadré avec enthousiasme et confiance. Je vous remercie pour votre soutien amical, votre ardeur et votre patience.

Monsieur le Professeur A. DELACOURTE pour m'avoir fait le grand honneur de juger ce travail. Veuillez bien accepter ma respectueuse gratitude et mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur E. RASSART pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et qui a accepté de le juger. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma vive reconnaissance.

Monsieur le Docteur H. VESPIGNANI pour l'intérêt que vous avez accordé à ce travail en acceptant d'en être le juge. Veuillez accepter l'assurance de mes remerciements les plus respectueux.

Monsieur le Professeur W. RUFF pour votre soutien précieux et votre profonde gentillesse. Merci de m'avoir fait un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Monsieur le Docteur J.-M. SEROT pour votre disponibilité et le grand intérêt que vous avez porté à mon travail. Merci pour votre amitié et votre précieux soutien.

L'équipe de recherche ainsi que le personnel du Centre de Médecine Préventive pour votre gentillesse, votre disponibilité à mon égard. Veuillez accepter mes remerciements les plus sincères et mon amical souvenir.

A la mémoire d'une montagne  
de force  
de générosité  
et de tendresse...

*A Setti Oum-Jamil*



à mes parents  
à mon pays ...  
aux mariages des terres  
des couleurs  
et des esprits

« Ce n'est pas seulement au bout du chemin que l'on arrive. A chaque étape on arrive quelque part, à chaque pas on peut découvrir une face de notre planète, il suffit de regarder, de désirer, de croire, d'aimer. »

*un jardinier inconnu de « Samarcande » Amine Maalouf*

« How would you design a 40-amino-acid peptide that is rigid enough to survive hundreds of acid baths at 10-minute intervals, yet adaptable enough to bind unrelated macromolecules with high affinity at pH 7.4, and discharge them rapidly at pH 5.5?

If you answered « Put in three disulfide bonds and an octahedral calcium cage », you were right, but too late - nature invented this peptide more than 500 million years ago, and has used it repeatedly ever since »

*Brown et al, in Nature 1997, 388:629-630, about the ligand-binding repeat of the LDL receptor.*



# SOMMAIRE

<b>HYPOTHESES DU TRAVAIL</b> .....	1
<b>ETAT DU SUJET</b> .....	4
<b>I- LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET SES CELLULES, LE CYTOSQUELETTE NEURONAL, LE LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN ET LES BARRIERES D'ÉCHANGE</b> .....	5
I-1. LES CELLULES DU TISSU NERVEUX.....	5
I-2. LE CYTOSQUELETTE NEURONAL.....	8
I-3. LE LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN.....	10
I-3-1. <i>Composition</i> .....	10
I-3-2. <i>Circulation du LCR</i> .....	11
I-3-3. <i>Biochimie et physiologie du LCR</i> .....	12
I-3-4. <i>Pathologie</i> .....	12
I-4. LA BARRIÈRE HÉMO-ENCÉPHALIQUE (BLOOD-BRAIN-BARRIER).....	12
I-5. LA BARRIÈRE HÉMO-MENINGÉE.....	15
I-6. LA BARRIÈRE MÉNINGO-CÉRÉBRALE.....	16
<b>II- LA MALADIE D'ALZHEIMER, SES FACTEURS DE RISQUE, SON DIAGNOSTIC</b> .....	17
II-1. DONNÉES CLINIQUES - PRÉVALENCE.....	17
II-2. FACTEURS DE RISQUE GÉNÉTIQUES.....	18
II-3. FACTEURS DE RISQUE ENVIRONNEMENTAUX.....	20
II-3-1. <i>La nutrition</i> .....	20
II-3-2. <i>Le tabac et l'alcool</i> .....	21
II-3-3. <i>Les métaux</i> .....	21
II-4. DIAGNOSTIC ET TRAITEMENTS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	22
<b>III- L'APOLIPOPROTÉINE E, SON RÔLE DANS LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE, SES RÉCEPTEURS ET SA PLACE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER</b> .....	24
III-1. APOE ET METABOLISME LIPIDIQUE.....	26
III-2. APOE ET RECEPTEURS DES LIPOPROTEINES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ...	26
III-2-1. <i>Organisation structurale des récepteurs d'apoE</i> .....	27
III-2-2. <i>Fonctions des récepteurs de l'apoE dans le cerveau</i> .....	29
III-2-3. <i>Domaines structuraux de l'apoE</i> .....	30
III-2-4. <i>Comportement allèle-spécifique de la liaison de l'apoE aux récepteurs - conséquences fonctionnelles</i> .....	31
III-3- PLACE DES APOLIPOPROTÉINES E DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	33
III-3-1. <i>Apolipoprotéine E et croissance neuronale</i> .....	34
III-3-2. <i>ApoE et dépôt amyloïde</i> .....	35
III-3-3. <i>ApoE et lésions neurofibrillaires</i> .....	37
<b>IV- PLACE DES APOLIPOPROTÉINE E, D, AI, AIV, DE LA TRANSTHYRÉTINE ET DE L'ACTINE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER</b> .....	39
IV-1. L'APOLIPOPROTÉINE D.....	40
IV-3. L'APOLIPOPROTÉINE AI.....	41
IV-3. L'APOLIPOPROTÉINE AIV.....	43
IV-4. LA TRANSTHYRÉTINE OU PREALBUMINE.....	44
IV-5. L'ACTINE.....	47
<b>V- LES AUTRES MARQUEURS BIOCHIMIQUES DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN PROPOSES DANS LA LITTÉRATURE</b> .....	49

<b>TRAVAUX REALISES</b> .....	53
<b>I- ETUDE APPROFONDIE DES VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LA CONCENTRATION DE L'APOLIPOPROTEINE E DANS LE LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN</b> ... 53	
I.1- MATERIELS ET METHODES .....	53
I.1.1- Patients .....	53
I.1.2- Analyses biochimiques et génétiques .....	54
I.1.3- Analyses statistiques.....	57
I.2-RESULTATS.....	57
I.2.1- La concentration de l'apoE dans le LCR augmente avec l'âge .....	57
I.2.2- La concentration de l'apoE dans le LCR augmente avec la maladie d'Alzheimer .....	57
I.2.3- La concentration de l'apoE dans le LCR varie avec la nature des atteintes du SNC .....	58
I.2.4- Effet du polymorphisme de l'apoE sur sa concentration dans le LCR .....	61
I.3- DISCUSSION ET CONCLUSION .....	62
<b>II- ASSOCIATION DE L'APOLIPOPROTEINE E A L'APOLIPOPROTEINE D, LA TRANSTHYRETINE ET L'ACTINE DANS LE LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN</b> .....	66
II.1- INTRODUCTION .....	66
II.2- POPULATION ET METHODES .....	66
II.3- RESULTATS ET DISCUSSION .....	67
II.3.1- ApoE, ApoD et réparation neuronale .....	67
II.3.2- ApoE, transthyrétine et formation des plaques séniles.....	70
II.3.3- ApoE, TTR, actine et cytosquelette.....	72
II.4- CONCLUSION .....	76
<b>III- ETUDE DE GENES CANDIDATS DU METABOLISME LIPIDIQUE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER : LES APOLIPOPROTEINES AI ET AIV</b> .....	77
III.1- INTRODUCTION.....	77
III.2- POPULATION ET METHODES .....	77
III.3- RESULTATS ET DISCUSSION.....	79
III.3.1- L'allèle apoAIV (360:His) est plus fréquent dans la population âgée .....	79
III.3.2- La distribution des allèles de l'apoAIV (360:His) n'est pas influencée par l'allèle $\epsilon 4$ .....	80
III.3.3- La concentration plasmatique de l'apoAI est diminuée avec la maladie d'Alzheimer .....	82
III.3.4- La concentration plasmatique de l'apoAI est corrélée avec la sévérité de la maladie d'Alzheimer ..	84
III.3.4- L'apoAI est présente dans les plaques séniles des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.....	85
III.4- CONCLUSION .....	89
<b>IV- ETUDES PRELIMINAIRES DE L'AFFINITE DE L'APOLIPOPROTEINE E AU RECEPTEUR DES VLDL</b> .....	90
IV.1- PRINCIPE DE L'ETUDE D'AFFINITE AUX RECEPTEURS.....	90
IV.2- MATERIELS ET METHODES .....	91
IV.2.1- Cellules.....	91
IV.2.2- Radiomarquage de l'apoE et Préparation des liposomes.....	91
IV.2.3- Préparation du sérum humain dépourvu de lipoprotéines.....	93
IV.2.4- Culture des cellules CHO et étude d'affinité aux liposomes-apoE .....	93
IV.3- RESULTATS ET DISCUSSION.....	94
IV.4- CONCLUSION .....	96
<b>DISCUSSION</b> .....	97
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	103
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	105
<b>PUBLICATIONS</b> .....	137

## Publications principales

- I- Merched A., Blain H, Visvikis S., Herbeth B, Jeandel C, and Siest G. (1997) *Cerebrospinal fluid Apolipoprotein E is increased in late onset Alzheimer's disease. Journal of the Neurological Sciences*, 145: 33-39
  
- II- Blain H, Jeandel C, Merched A, Visvikis S and Siest G. (1997). *Apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid increases with ageing. Journal of American Geriatric Society*. 45(12): 1536.
  
- III- Merched A., Xia Y., Papadopoulou A., Siest G. and Visvikis S. (1998). *Apolipoprotein A-IV codon 360 mutation increases with aging and is not associated with Alzheimer's disease. Neurosciences Letters*. 241: 1-3.
  
- IV- Terrisse L., Poirier J, Bertrand Ph, Merched A, Siest G, Milne R, and Rassart E (en révision). *Increased levels of ApoD in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. Journal of Neurochemistry*.
  
- V- Merched A, Serot JM, Visvikis S, Aguillon D., Faure G and Siest G (sous presse). *Apolipoprotein E, Transthyretin and Actin in the CSF of Alzheimer's Patients: Relation with the Senile Plaques and Cytoskeleton Biochemistry. FEBS Letters*.
  
- VI- Merched A., Xia Y., Visvikis, Serot , J.-M. and Siest G. (en préparation) *Serum apolipoprotein AI concentration is highly correlated with the severity of Alzheimer's disease*

## Autres publications

- VII- Blain H, Merched A, Visvikis S, O'kane M, Pillot T, Siest G, and Jeandel C. (1996) *Maladie d'Alzheimer et hypothèses impliquant les apolipoprotéines E*. *Presse Médicale*, 25: 763-768.
- VIII- Bohnet K, Schlenck A, Merched A, Siest G, Visvikis S. (1997) Apolipoprotein R136C. A rare variant of human apolipoprotein E discovered during the STANISLAS Cohort study *In : Biologie prospective. Comptes Rendus du 9° Colloque de Pont à Mousson*, Ed. Galteau MM, Delwaide P, Siest G, Henny J. John Libbey Eurotext, Paris, pp 167-170.
- IX- Merched A., Terrisse L., Bertrand P., Poirier J., Visvikis S., Siest G., Milne R., Rassart E. (sous presse) *Les apolipoprotéines D et E dans le système nerveux central des patients Alzheimeriens*. In : *Progrès Récents sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes Apparentées*. Edition SOLAL.
- X- Merched A., Visvikis S., Serot J.-M., Terrisse L., Rassart E., Siest G. (sous presse). *Génétique de l'apolipoprotéine E et Association avec la transthyréline, l'apolipoprotéine D et l'actine dans la maladie d'Alzheimer*. In : *Progrès Récents sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes Apparentées*. Edition SOLAL.
- XI- Blain H., Merched A., Visvikis S., Herbeth B., Siest G. and Jeandel C. *La concentration de l'apoE dans le liquide céphalorachidien augmente dans la maladie d'Alzheimer*. (sous presse). In : *Progrès Récents sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes Apparentées*. Edition SOLAL.



*HYPOTHESES ET OBJECTIFS  
DU TRAVAIL*



## Hypothèses et objectifs du travail

La maladie d'Alzheimer (MA) est un désordre démentiel neurodégénératif progressif et inexorable. Cette maladie touche majoritairement des personnes d'âge avancé entre 65 et 85 avec une incidence qui double tous les 5 ans.

Sur le plan anatomo-pathologique, la MA est caractérisée par une atrophie neuronale au niveau de l'hippocampe et du néocortex cérébral et inclut deux aspects majeurs : une déposition extracellulaire d'amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ) et une accumulation intracellulaire de la protéine *tau* anormalement phosphorylée.

Au cours des deux dernières décennies, les aspects génétiques de la MA ont beaucoup progressé après des recherches initiales de type épidémiologique et une longue période de confusion. Les recherches des 5 ou 6 dernières années ont apporté des données essentielles et ont abouti à un relatif consensus concernant l'importance des facteurs génétiques.

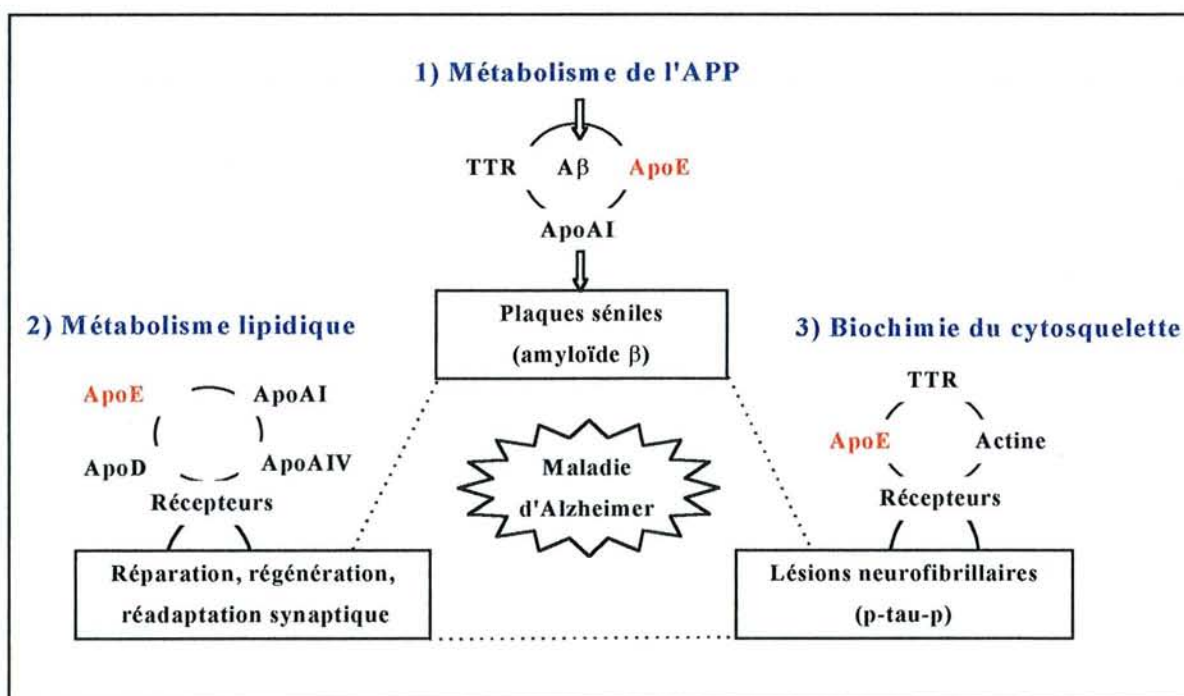
L'apoE est le facteur de risque génétique le plus important de la MA. Le locus du gène de l'apoE est localisé sur le chromosome 19 et code pour 3 allèles communs ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ ) qui diffèrent les uns des autres par une substitution d'un ou deux acide(s) aminé(s). La présence d'un allèle  $\epsilon 4$  augmente le risque et avance l'âge de développer une MA. Le polymorphisme de l'apoE est associé aux formes tardives aussi bien familiales que sporadiques de la MA (Strittmatter et al, 1993; Saunders et al, 1993, Lucotte et al, 1993, Siest et al, 1995).

L'apoE est exprimée dans de nombreux organes et tissus de l'organisme, le foie étant la source principale de synthèse et de sécrétion de l'apoE (Alshouraby et al, 1985). Le système nerveux central est le second site de production de l'apoE qui est synthétisée principalement par les astrocytes (Pitas et al, 1987). Certains travaux originaux ont montré l'importance de l'apoE dans la croissance, la régénération neuronale et la synaptogénèse (Mahley, 1988, Boyles et al, 1990; Poirier et al, 1994, Nathan et al, 1995). Ces données sont en faveur d'une implication de l'apoE dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau. L'association de l'allèle  $\epsilon 4$  à 64% des cas de MA (Saunders et al, 1993), suggère un rôle essentiel de l'apoE dans cette maladie (voir revue Roses et al, 1996). Mais les mécanismes précis d'implication de l'apoE dans la MA ne sont pas encore définis. Tandis que certaines études postulent un rôle de l'apoE dans la clairance du peptide amyloïde  $\beta$  (Schmechel et al, 1993, Strittmatter et al, 1993), d'autres suggèrent un rôle dans la protection

contre la phosphorylation excessive de la protéine tau (Strittmatter et al, 1994), et dans la plasticité neuronale (Poirier et al, 1994).

Cependant, très peu d'informations sont disponibles concernant la régulation et la fonction de l'apoE dans le cerveau. Les études de variations pathologiques de l'apoE liées à la MA sont incomplètes voire contradictoires. Bien que l'allèle  $\epsilon 4$  et l'âge soient bien établis comme facteur de risques majeurs de la MA, les mécanismes de l'implication potentielle des apoE dans le processus physiopathologique restent à établir.

Les propriétés physico-chimiques des isoformes de l'ApoE sont en faveur d'une implication isoforme-spécifique de cette protéine dans la MA. **La combinaison d'études épidémiologiques, immunohistochimiques dans le cerveau et d'études de la composition du LCR, est notre stratégie pour approcher *in vivo* les modifications biochimiques et génétiques qui provoquent ou accompagnent l'apparition de la MA.** L'élucidation des bases moléculaires et cellulaires de la maladie d'Alzheimer et le choix de bons marqueurs seront utiles non seulement au niveau thérapeutique mais aussi pour comprendre le fonctionnement normal du système nerveux. Les interactions entre les marqueurs choisis se résument à travers la figure 1 ainsi que les mécanismes d'action qui fondent nos hypothèses de travail.



**Fig. 1-** Présentation des marqueurs étudiés, de leur implication potentielle et de leur possible interaction au niveau de trois voies physiopathologiques essentielles dans la maladie d'Alzheimer : la régulation du métabolisme du peptide amyloïde  $\beta$ , la biochimie du cytosquelette et le métabolisme lipidique. Abréviations : A $\beta$  : peptide amyloïde  $\beta$  ; APP : précurseur de l'A $\beta$  ; TTR : transthyréline ; p-tau-p : protéine tau sous forme hyperphosphorylée.

Dans cet esprit, et à partir de ces hypothèses, les objectifs spécifiques de ma thèse sont de :

- Mettre en évidence les variations de la concentration de l'apoE dans le LCR avec le vieillissement, le facteur de risque majeur de la MA et étudier également les variations qualitatives de l'apoE dans le LCR, évaluer leur spécificité et leur intérêt dans le diagnostic de la MA.

- Examiner d'autres protéines comme l'apoD, la transthyrétine (TTR) et l'actine afin mettre en évidence des interactions possibles permettant de mieux comprendre le rôle de l'apoE dans la physiopathologie de la MA et rechercher de plus de nouveaux marqueurs et gènes candidats de métabolisme lipidique dans la MA à travers l'étude des apoAI et AIV.

- Etudier l'état d'équilibre et/ou d'interaction de ces marqueurs dans le LCR, en parallèle avec la génétique de l'apoE, les données cliniques et d'histopathologie clinique du cerveau permettant d'estimer l'étendue de la maladie et optimiser en parallèle la technique d'électrophorèse bidimensionnelle afin d'étudier simultanément plusieurs marqueurs protéiques dans le LCR.

- Etudier les propriétés d'interaction de l'apoE en fonction de son polymorphisme génétique avec les récepteurs.

Ces objectifs nécessitent un rappel préalable d'un certain nombre de données bibliographiques qui sont détaillées à la suite.

*ETAT DU SUJET*

---

---

## ETAT DU SUJET

---

---

Données bibliographiques concernant :

**I- Le système nerveux central et ses cellules, le cytosquelette neuronal, le liquide céphalorachidien et les barrières d'échange**

*page 5-16*

**II- La maladie d'Alzheimer, ses facteurs de risque, son diagnostic**

*page 17-23*

**III- L'apolipoprotéine E, son rôle dans le métabolisme lipidique, ses récepteurs et sa place dans la maladie d'Alzheimer**

*page 24-38*

**IV- Place des apolipoprotéine E, D, AI, AIV, de la transthyréline et de l'actine dans la maladie d'Alzheimer**

*page 37-48*

**V- Les autres marqueurs biochimiques du liquide céphalorachidien proposés dans la littérature**

*page 49-53*

# I- Le système nerveux central et ses cellules, le cytosquelette neuronal, le liquide céphalorachidien et les barrières d'échange

## *I-1. Les cellules du tissu nerveux*

Macroscopiquement, le système nerveux central est constitué de la substance blanche et de la substance grise. Dans le cerveau et le cervelet, la substance blanche a une localisation centrale, entourée de la substance grise tandis que dans la moelle et le tronc cérébral, la substance blanche est périphérique et la substance grise est centrale. L'examen microscopique montre une composition plus complexe avec les cellules nerveuses et les cellules névrogliques ou la glie.

Les **neurones** sont les cellules de transmission de signaux à travers leurs arborisations, les dendrites, et de leur prolongement, l'axone. On estime à 14 milliards leur nombre, dont 10 milliards dans l'écorce cérébrale. **La glie** est le tissu de soutien et représente la charpente du système nerveux central mais également assure des fonctions essentielles au bon fonctionnement des réseaux neuronaux. Dans l'organisme adulte, les cellules gliales assurent le contrôle des échanges entre le sang et le tissu nerveux, la régulation de la concentration des ions potassium dans le milieu extracellulaire, la recapture des neurotransmetteurs au niveau des synapses, l'isolation de certains axones par l'élaboration de manchons de myéline. Ces différentes fonctions, partagées entre plusieurs types de cellules gliales, concourent à la propagation efficace des messages nerveux. Les cellules gliales sont dix fois plus nombreuses que les neurones. Du point de vue morphologique et fonctionnel, on distingue d'une part, les cellules gliales du système nerveux central qui comprennent les **astrocytes** et les **oligodendrocytes** (parfois regroupés sous le terme de **macroglie**), les **cellules microgliales** et les **cellules épendymaires** et d'autre part les cellules gliales du système nerveux périphérique qui comprennent plusieurs types de **cellules de Schwann** : myélinisantes, non myélinisantes et satellites (voir Aimé-Genty et al, 1997).

**Les astrocytes**, qui sont les principales cellules interstitielles du cerveau. Ce sont des cellules de forme étoilée avec des centaines de prolongements irradiant à partir d'une région nucléaire centrale. Dans le système nerveux central, les prolongements astrocytaires sont intimement associés aux neurones, à leur corps cellulaire, aux dendrites et parfois à leurs terminaisons

axonales. Le cytoplasme des astrocytes est caractérisé par la présence de glycogène, qui constitue une importante réserve d'énergie et surtout de filaments intermédiaires ou gliofilaments constitués par une protéine filamenteuse qui leur est spécifique, la protéine fibrillaire acide de la glie (GFAP). Cette dernière devient surabondante après une lésion du système nerveux central. Les astrocytes, ainsi modifiés, dénomés *astrocytes réactifs*, sont à l'origine du processus pathologique appelé *gliose réactive*, fortement inhibitrice d'une réparation nerveuse fonctionnelle. Les astrocytes vu leur organisation et leur localisation d'une part entre l'endothélium capillaire et le neurone, et d'autre part entre la leptoméninge et les neurones (Fig 2), interviennent dans le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière méningo-cérébrale (voir détails §1.4 et 1.6).

**Les oligodendrocytes** sont des cellules arrondies dont le noyau est petit et rond et dont le cytoplasme est peu abondant. Leurs prolongements sont fins, courts et peu nombreux. Il en existe deux types différents : les oligodendrocytes *myélinisants* et les oligodendrocytes *satellites*. Les premiers sont localisés dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière. Ils sont organisés en groupes le long des fibres où ils sont responsables de la formation des gaines de myéline autour d'une cinquantaine de segments d'axones, en moyenne, appartenant à des axones différents. Cette situation est par conséquent très différente de celle des nerfs du système nerveux périphérique où une cellule de Schwann ne myélinise qu'un segment d'axone. Les oligodendrocytes satellites sont localisés dans la substance grise autour des neurones.

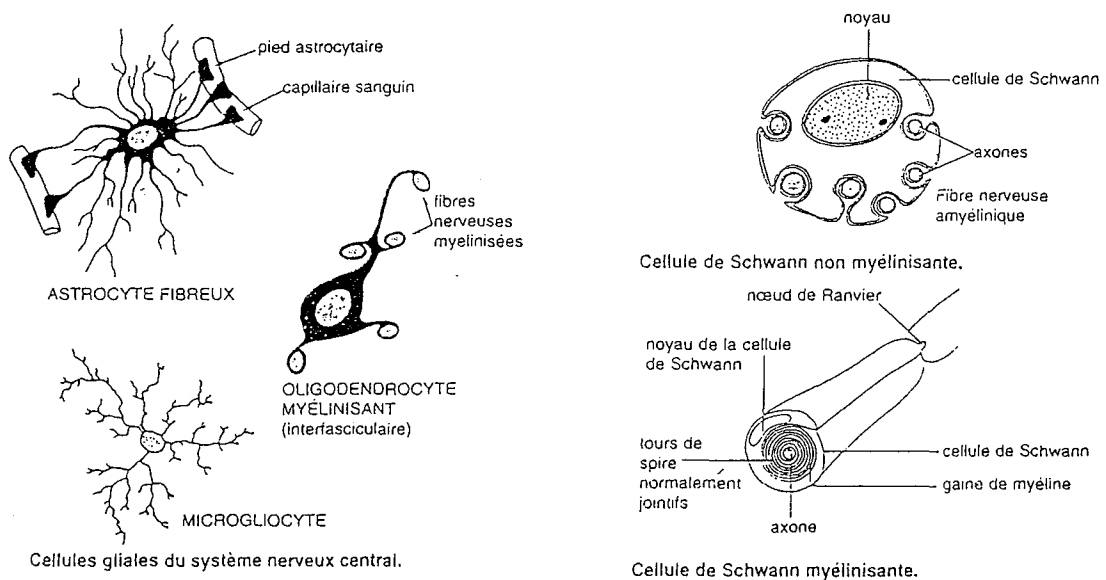


Fig. 2- Organisation des cellules du système nerveux (Aimé-Genty et al, 1997)

**Les cellules microgliales** sont les « satellites » des capillaires sanguins. Elles proviennent de la transformation de certains globules blancs du sang, les monocytes, qui entrent dans le système nerveux central pendant le développement embryonnaire sous forme de microglie amiboïde, avant que ne soit constituée la barrière hémato-encéphalique. Parvenue dans le SNC, la microglie amiboïde se différencie en microglie ramifiée. Cette dernière représenterait une forme quiescente de la microglie, incapable de phagocytose. Cependant, à la faveur d'une lésion du tissu nerveux, les microgliocytes pourraient de nouveau se multiplier, tout comme des monocytes sanguins, en **macrophages**, c'est à dire en cellules douées de propriétés migratoires et phagocytaires. En cas de rupture de la barrière hémato-encéphalique, il devient cependant difficile de faire la distinction entre macrophages d'origine sanguine et macrophages issus de la microglie ramifiée propre au tissu nerveux.

**Les cellules épendymaires** constituent un épithélium ou couche de cellules unies par des jonctions intercellulaires étanches. Cet épithélium revêt toutes les cavités du névraxe ; les cavités cérébrales (ventricules) et le canal central (épendymaire) de la moelle épinière. Leur face apicale, au contact du liquide céphalorachidien, comporte soit des microvillosités soit, des cils. On distingue d'une part, les cellules épendymaires des plexus choroïdes qui constituent la barrière méningo-cérébrale et d'autre part, les cellules épendymaires extrachoroïdiennes qui comprennent les cellules épendymaires ciliées et les **tancytes**, qui assurent la circulation du liquide céphalorachidien.

**Les cellules de Schwann** forment la gaine de myéline et assurent le soutien du système nerveux, tout en participant à la conduction nerveuse. On en distingue trois types : les cellules *myélinisantes* qui assurent la myélinisation de certains axones des nerfs périphériques. Chaque cellule engaine un seul segment d'un seul axone qu'elle entoure d'un manchon de myéline, les cellules non *myélinisantes* qui engainent plusieurs, voire plusieurs dizaines de petits axones sans les myéliniser, formant ainsi des fibres nerveuses dites amyéliniques, et finalement les cellules *satellites* (non myélinisantes) qui entourent les corps cellulaires des neurones sensoriels primaires des ganglions crâniens et rachidiens.



## I-2. Le cytosquelette neuronal

Quelques notions de bases sur certains éléments du cytosquelette sont indispensables à la compréhension de la recherche sur la maladie d'Alzheimer (MA).

Les neurones sont des cellules très polarisées qui projettent de longs prolongements, les axones et les dendrites, pour entrer en contact avec des cellules cibles. La formation et le maintien de cette morphologie spécialisée nécessitent un assemblage correct du réseau du cytosquelette neuronal. Le cytosquelette est donc l'élément qui permet de soutenir la structure cellulaire et de donner leur forme aux neurones. Il est responsable de l'élaboration des arborisations axonales et dendritiques au cours du développement, de leur maintien au long de la vie et de leur altération en réponse à des changements fonctionnels. Le cytoplasme des cellules est traversé par trois classes de protéines filamenteuses : les **microtubules** (25 nm de diamètre), les **neurofilaments** ou les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre) et les filaments d'**actine** (8 nm de diamètre). Les microtubules et les neurofilaments sont concentrés dans les axones et dans les dendrites où ils sont orientés longitudinalement et liés les uns aux autres. Les filaments d'actine sont organisés en un réseau lâche qui s'étend au-dessous de l'ensemble de la membrane cellulaire.

Ces trois composants du cytosquelette sont connectés les uns aux autres pour former un réseau, lui même en connexion avec le noyau, le cytosquelette membranaire et la membrane cytoplasmique au travers de sites d'ancrage. De plus, les microtubules et les filaments intermédiaires sont liés au cytosquelette des cellules voisines et à la matrice extracellulaire afin de former les tissus cellulaires.

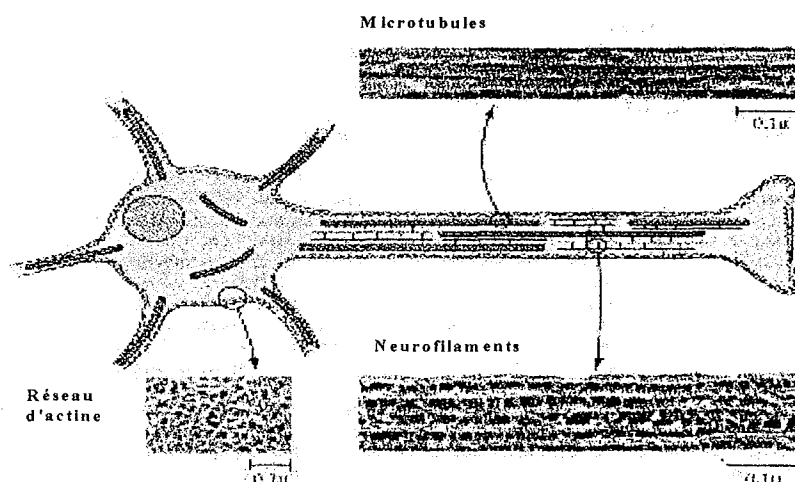


Fig. 3- Organisation du cytosquelette neuronal (Vale et al, 1994)

Le cytosquelette est caractérisé par une très grande stabilité tout en ayant une grande plasticité. Ces propriétés proviennent de l'organisation polymérique non covalente, particulièrement au niveau de l'actine et des microtubules.

L'actine est une protéine globulaire de 43 kD qui s'assemble en polymères linéaires formant une double hélice. La sous-unité monomérique des microtubules est la **tubuline** un hétérodimère de deux protéines très voisines d'environ 50 kD chacune, les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Les microtubules sont organisés sous forme cylindrique creuse.

Les neurones contiennent à la fois des formes monomériques et polymériques d'actine et de tubuline. L'équilibre entre ces deux formes est étroitement contrôlé par la cellule qui gère l'assemblage et le désassemblage en réponse à des stimuli physiologiques et environnementaux. Les neurofilaments sont eux, composés de trois sous-unités polypeptidiques : le NF-H (lourd de 112 kD), le NF-M (moyen de 102 kD) et le NF-L (léger de 68 kD). La structure des neurofilaments est différente de celle de l'actine et de la tubuline et est caractérisé par un coeur en hélice  $\alpha$  formant des dimères « coiled coil ». Les protéines des neurofilaments sont spécifiques des neurones et font partie d'une famille de protéines de filaments intermédiaires qui comprennent les kératines (dans les cellules épithéliales), la vimentine (dans les tissus lymphatiques), la desmine (dans les muscles), la protéine acide gliales (GFAP) et les laminines nucléaires. Les filaments intermédiaires forment un réseau dense de fibres ancrées du côté cytoplasmique de la membrane nucléaire.

Il existe d'autres protéines associées aux microtubules et à l'actine qui sont co-purifiées avec elles et que l'on appelle les protéines associées aux microtubules (**MAP**). Ces protéines jouent des rôles importants dans l'assemblage et la stabilité des microtubules et dans les liaisons des microtubules avec les filaments intermédiaires (Capote and Maccioni, 1994) et les filaments d'actine (Cross et al, 1993). Dans les neurones, ces protéines incluent des MAP de haut poids moléculaire (270-350 kDa) comme les MAP1A, MAP1B, et **MAP2** et des MAPs de faible poids moléculaire (55-82 kDa) comme les protéines **tau**, Map 2c, 2d. La protéine MAP2 est spécifique des dendrites, tau est localisée exclusivement dans les axones.

D'autres protéines assurent la mobilité au niveau cellulaire le long des polymères du cytosquelette et utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP. Parmi ces protéines motrices, se

trouvent la myosine, la dynéine, la kinésine et la dynamine qui sont de véritables moteurs biochimiques qui provoquent le déplacement des organites *in vivo*.

Le cytosquelette est gouverné par une dynamique extraordinaire qui se manifeste, par exemple, durant la mitose, la morphogenèse, la différenciation et la migration cellulaire et nécessite un assemblage, désassemblage et remodelage des composants du cytosquelette. Ce dynamisme est régulé par des signaux intra- et extra-cellulaires impliquant les kinases à tyrosine et sérine/thréonine, de petites molécules régulatrices à GTP et d'autres molécules de transduction de signaux (Schaller and Parsons, 1993; Pfeifer, 1995; Machesky and Hall, 1996).

### ***I-3. Le liquide céphalorachidien***

#### **I-3-1. Composition**

Le liquide céphalorachidien (LCR) contient 99% d'eau contre 93% pour le plasma et son volume total est estimé de 100 à 160 ml chez l'adulte. Il représente 6,3% du contenu du compartiment intracranial. La concentration en protéines du fluide lombaire est comprise physiologiquement entre 0,15 et 0,45 g/l. Alors que les protéines présentes dans les ventricules latéraux sont sécrétées par les plexus choroïdes, les protéines présentes dans le LCR lombaire proviennent d'un passage par les espaces sous-arachnoïdiens, expliquant que les concentrations d'une même protéine sont 3 fois plus élevées dans le LCR lombaire que dans les ventricules latéraux (Appleyard and Mc Donald, 1992).

On estime que environ 80% des protéines du LCR proviennent du plasma par diffusion à travers la barrière hémato-encéphalique. Le reste est synthétisé localement.

Les composants protéiques principaux du LCR sont l'albumine (la plus abondante des protéines d'origine exclusivement plasmatique), la transthyréline, la transferrine, la cystatine, l' $\alpha_1$ -antitrypsine, l' $\alpha_1$ -macroglobuline, les immunoglobulines, les apolipoprotéines (apo) principalement, l'apoE.

Le LCR contient des lipoprotéines que l'on peut séparer par ultracentrifugation. Ces particules ressemblent aux HDL plasmatiques et sont composées de protéines (34%), phospholipides (34%), cholestérol libre (13%), esters de cholestérol (17%) et triglycérides (2%) (Rebeck, 1997). Parmi les apolipoprotéines, on trouve majoritairement les apoE, AI, D, AIV et J.

### I-3-2. Circulation du LCR

Les plexus choroïdes produisent plus de 70 % du volume total de LCR. Le reste est formé à partir des activités métaboliques du cerveau et du parenchyme de la moelle épinière. Le LCR est sécrété dans les plexus choroïdes et dans les ventricules cérébraux latéraux. Il suit ensuite un courant circulatoire vers les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ventricules et traverse l'espace sous-arachnoïdien. Dans cet espace, le LCR investit le parenchyme cérébral, où il sera réabsorbé au niveau des veines à partir des structures membranaires comme les granulations de Pacchioni. Une partie du flux est descendante à travers la moelle épinière pour retourner vers l'espace sous-arachnoïdien. Les granulations arachnoïdiennes permettent au LCR de quitter les espaces sous-arachnoïdiens vers le sang, à travers des valves à sens unique. Normalement, le transit des biomolécules de l'espace lombaire vers l'espace crânien nécessite approximativement 1 heure, le flux inverse est plus rapide. Le LCR est entièrement renouvelé toutes les 5 à 7 heures, ou autrement dit, le taux de production de LCR est de 0,35 ml/min. Le flux du LCR varie avec l'âge de 0,4 ml/min chez le jeune à 0,19 ml/min chez le sujet âgé (May et al, 1990; Reiber, 1994)

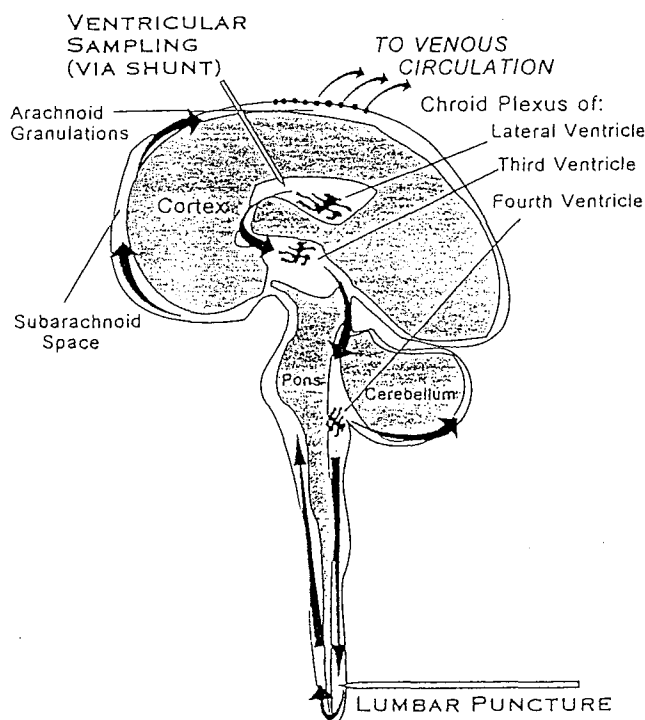


Fig. 4- Flux du LCR dans le système nerveux. Les sites d'obtention lombaires et ventriculaires sont montrés (Watson and Scott, 1994)

### **I-3-3. Biochimie et physiologie du LCR**

Le LCR assure les fonctions physiologiques suivantes:

- 1- un rôle mécanique comme support physiologique du cerveau, considéré comme un « lit d'eau ». La poussée d'Archimède réduit le poids du cerveau d'un facteur 30 grâce à laquelle le LCR constitue une protection continue et souple contre les chocs et les changements de pression au sein de la cavité cérébrale, au niveau de l'espace sous-arachnoïdien et des ventricules.
- 2- le transport intracérébral des biomolécules, l'élimination des métabolites et des déchets du SNC (CO<sub>2</sub>, choline) et le maintien de la stabilité de l'environnement chimique du cerveau. Un exemple de ce rôle est l'élimination en quelques jours des cellules pathologiques après une hémorragie méningée.
- 3- une défense contre l'invasion pathogène, ce qui explique la rareté de l'infection du cerveau au cours des infections généralisées.

### **I-3-4. Pathologie**

Les changements dans la composition biochimique du LCR sont souvent le résultat d'activités métaboliques altérées, de la mort cellulaire ou de réactions inflammatoires. En raison de ses liens étroits avec le cerveau et de sa facilité de recueil, le LCR est le liquide biologique qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux, partant du postulat que la mesure de la concentration dans le LCR des substances qui ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique permet d'estimer leur production dans le système nerveux central. Nous nous intéressons aux variations pathologiques liées à la maladie d'Alzheimer, dont le relevé bibliographique est exposé dans le paragraphe V.

#### ***I-4. La barrière hémato-encéphalique (blood-brain-barrier)***

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est constituée de cellules épithéliales capillaires qui, contrairement aux cellules épithéliales capillaires d'origine systémique, sont liées par des jonctions intercellulaires serrées étanches (« tight junctions » selon la terminologie anglo-

saxone). Ces cellules ont des interactions anatomiques et fonctionnelles avec d'autres cellules telles que les astrocytes, les péricytes, les neurones et la microglie (Davson et al, 1993; Meresse et al, 1989). Le concept de la BHE est basé sur le fait que cet ensemble gliovasculaire régule l'homéostasie du milieu neuronal plutôt que d'être un simple obstacle à l'échange de solutés. On estime la surface de l'endothélium des capillaires cérébraux à  $100 \text{ cm}^2$  par gramme de tissu. Dans le cerveau de l'homme adulte, la surface totale microvasculaire est estimée à  $12 \text{ m}^2$ , la longueur totale des capillaires à  $650 \text{ km}$ , le diamètre de la lumière d'un capillaire à  $6 \text{ }\mu\text{m}$  et les capillaires distants de  $40 \text{ }\mu\text{m}$  les uns des autres (Zlokovic, 1995).

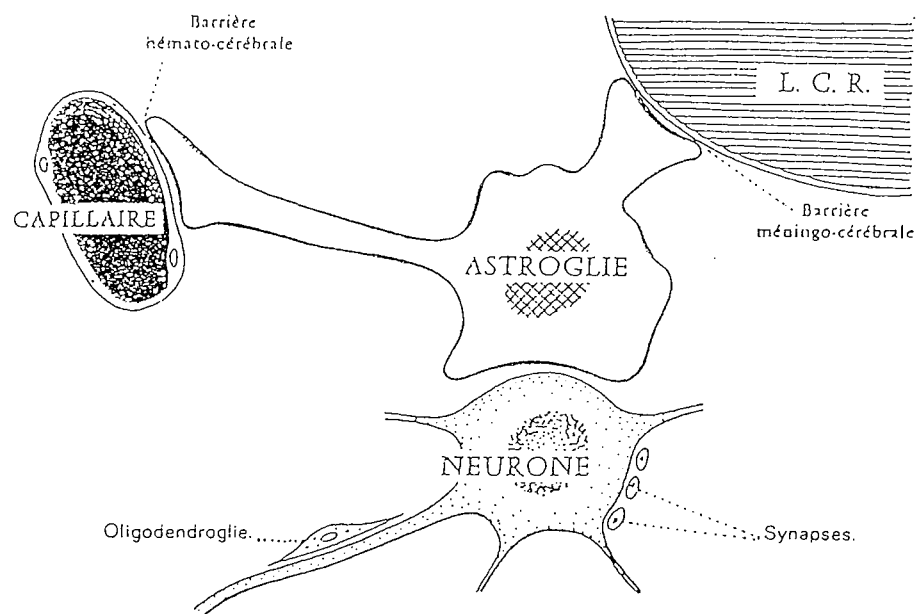


Fig. 5- Localisation des barrières sang-LCR et sang-cerveau (Lazorthes, 1973)

La BHE est sélective : elle permet généralement le passage des composés liposolubles de taille inférieure à  $600 \text{ kDa}$  via un mécanisme de diffusion à travers la membrane plasmatique endothéliale et possède des systèmes de transport de plusieurs substances que le cerveau consomme rapidement et en grande quantité comme le glucose, les acides aminés neutres, le lactate et les ribonucléosides nécessaires au métabolisme du cerveau (Davson et al, 1993; Meresse et al, 1989). Les mécanismes de transport à travers cette barrière sont de nature différente et incluent:

- 1- La simple diffusion à travers la membrane lipidique des molécules lipophiles (hormones) et des métabolites physiologiques ( $H^+$ ,  $HCO_3^-$ , ammonium).
- 2- Les transporteurs spécifiques pour les petites molécules hydrophiles (vitamines et autres nutriments).
- 3- Le transport par l'intermédiaire de protéines plasmatiques dans le cas du fer et de certains médicaments acides.
- 4- La transcytose par l'intermédiaire de récepteurs, utilisée par les peptides et protéines (vasopressine, encéphalines, glutathione, insuline, transferrine).
- 5- La pinocytose ou simple absorption par l'endothélium capillaire (albumine, immunoglobuline G).

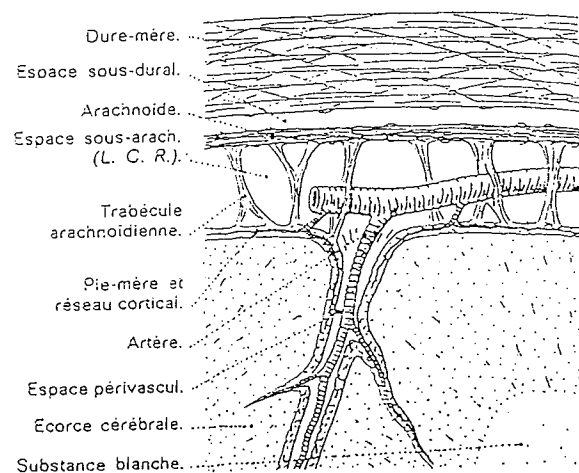


Fig.7- Siège de la barrière hémocérébrale au niveau de l'espace périvasculaire (Lazorthes, 1973).

Il est important de noter que la plupart des nutriments de base nécessaires à la survie neuronale et gliale sont d'origine systémique et doivent passer à travers la BHE. Bien que certains nutriments puissent atteindre le cerveau via le LCR, ce type de transport est moins important par rapport à la BHE dont la surface est 5 000 fois supérieure à celle du LCR (Pradrigé, 1984). La BHE a également une dimension biochimique et physiologique. Ses cellules endothéliales contiennent une plus grande densité de mitochondries que les cellules des autres endothéliums, reflétant un niveau élevé de production oxydative d'ATP (Beggley, 1996). De plus, elle est le site d'une plus grande activité enzymatique destinée à inactiver les toxines et les composés actifs provenant de la circulation plasmatique (Audus et al, 1992). Parmi les enzymes

présentes, on note la monoamine oxydase (MAO) de type A et B, l' amino-acide décarboxylase (AAD), la catéchol-O-méthyl transférase (COMT), la gamma-glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT), la NADPH cytochrome P450 réductase et la glutathione-S-transférase (GST). Ces enzymes jouent un rôle dans le métabolisme des médicaments et des xénobiotiques.

### *I-5. La barrière hémoméningée*

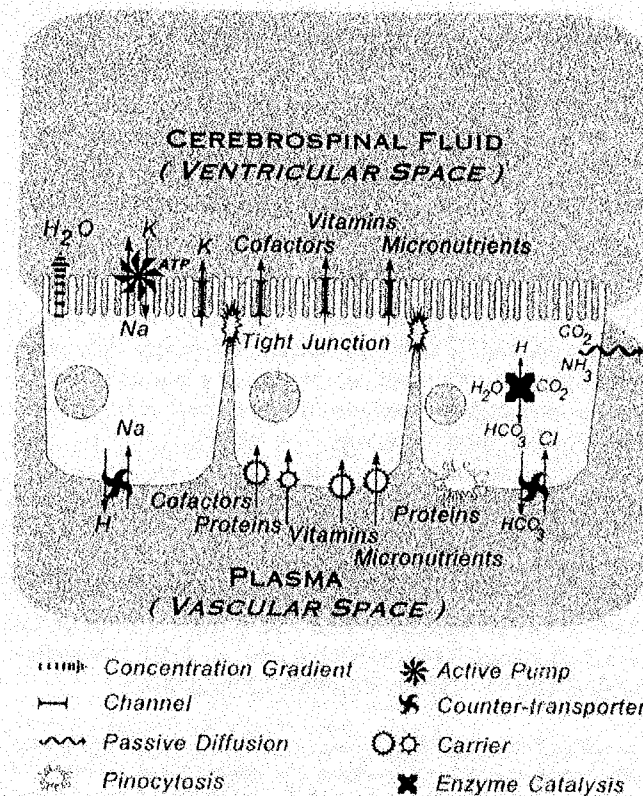
Cette barrière hémoméningée est située au niveau des plexus choroïdes qui sont considérés comme une porte directe entre le sang et le LCR. Entre les cellules adjacentes des plexus choroïdes, des jonctions serrées assurent une fonction similaire à celle des jonctions entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Les plexus choroïdes commandent activement et sélectivement les échanges de molécules entre le LCR et le sang. Ils assurent généralement le transport des micro-nutriments comme la vitamine C, les folates, les désoxyribonucléosides et la vitamine B6. Une substance injectée dans les espaces sous-arachnoïdiens passe dans la circulation sanguine mais l'inverse n'est pas vrai. La concentration d'une protéine d'origine plasmatisque dans le LCR est influencée par plusieurs facteurs:

- 1- La taille de la protéine qui est inversement liée à sa concentration dans le LCR en raison de l'effet de filtration de la barrière sang-LCR (Felgenhauer and Renner, 1977)
- 2- La charge globale de la protéine (Griffin and Giffels, 1982).
- 3- La concentration plasmatisque de la protéine (Felgenhauer, 1974).
- 4- L'état fonctionnel de la barrière sang-LCR.

Il existe, pour les membranes méningées comme pour les glomérules rénaux, des substances sans seuil et des substances à seuil. L'urée est une substance sans seuil. Ainsi chez les insuffisants rénaux, son taux est identique dans le LCR et dans le sang. Par contre, le glucose est une substance à seuil: son taux dans le LCR du sujet sain comme chez les sujets diabétiques, est toujours inférieur à celui du sang.

Grâce à la barrière hémoméningée, le LCR assure au cerveau la stabilité de son milieu en dépit de la plupart des variations sanguines.





**Fig. 8-** Mécanismes d'échanges au niveau de la barrière hémoméningée (Watson and Scott, 1994)

### ***I-6. La barrière méningo-cérébrale***

Le LCR pénètre dans la substance cérébrale à travers les fentes de l'épendyme, circule dans l'espace extracellulaire au contact des cellules nerveuses et aboutit dans l'espace sous-arachnoïdien. Cette barrière est constituée essentiellement par les membranes basales qui séparent le tissu nerveux du LCR. Contrairement aux cellules épithéliales des choroïdes, les cellules épendymaires ne sont réunies que par des jonctions communicantes, qui limitent peu la diffusion des molécules. Elles permettent donc un contact intime entre le liquide interstitiel des tissus cérébraux et le LCR des ventricules, ces deux liquides ont par conséquent, une composition analogue.

## II- La maladie d'Alzheimer, ses facteurs de risque, son diagnostic

### II-1. Données cliniques - prévalence

La maladie d'Alzheimer (MA) est un désordre neurodégénératif d'étiologie inconnue, caractérisé par un déclin progressif des fonctions intellectuelles, de la mémoire, du jugement, de la capacité à raisonner. Les symptômes précoces peuvent inclure des pertes de mémoire, des difficultés à appréhender les idées abstraites et des désorientations dans le temps et l'espace. Les complications associées à la MA aboutissent généralement à la mort de l'individu dans les 2 à 10 ans, suivant l'évolution de la maladie. La MA a été décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1907 par un clinicien chercheur allemand Alois Alzheimer, qui a procédé à l'autopsie d'une femme âgée de 51 ans traitée pour démence. Les anomalies observées sont maintenant connues sous le nom de plaques et de lésions et sont les caractéristiques histopathologiques de la MA.

Le diagnostic d'une MA probable est établi après exclusion de plusieurs autres causes connues comparables à cette maladie. Le diagnostic définitif est posé à la mort des patients par la présence dans leur cerveau :

- 1- de lésions neurofibrillaires intraneuronales qui sont des enchevêtrements constitués de filaments en double hélice ("paired helical filaments" ou PHF), dont le principal constituant est la protéine tau sous forme hyperphosphorylée.
- 2- de plaques séniles extracellulaires abondantes constituées majoritairement d'un peptide appelé amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ) défini par sa conformation repliée en feuillets  $\beta$ , et constitué de 39 à 43 acides aminés, produit du catabolisme d'un précurseur protéique nommé APP (Amyloid Protein Precursor) .
- 3- une angiopathie amyloïde, constitué de dépôts vasculaires formés majoritairement du peptide  $A\beta$ .

On estime, en France métropolitaine, à environ 360 000 le nombre de patients déments dont 270 000 atteints de MA, 40 000 atteints de démence de type vasculaire et 50 000 atteints d'autres types de démence. La prévalence de la MA dépend de l'âge et, selon les estimations,

elle double tous les 5 ans à partir de l'âge de 65 ans allant de 1 à 4% entre 65 et 70 ans et jusqu'à 22% ou plus entre 85 et 90 ans. Environ 150 000 nouveaux cas de démence sont dénombrés par an dans cette tranche d'âge.

## II-2. Facteurs de risque génétiques

Sur la base des liens génétiques, la MA peut être classée en deux formes : familiale et sporadique qui représentent respectivement 10, et 90 % des cas.

Les formes familiales sont associées à des mutations rares localisées sur les chromosomes 1, 14 et 21 et affectant respectivement les gènes de l'APP (précurseur de la protéine amyloïde), de la préséniline 1 (PS-1 ou S182) et de la préséniline 2 (PS-2 ou SMT-2). Les mutations sur le chromosome 21 comptent seulement pour 2 à 3 % des cas de la MA familiale à début précoce (Schellenberg et al, 1992). L'étude de mutations, en parallèle avec d'autres travaux expérimentaux ont renforcé l'hypothèse de la cascade de l'amyloïde, caractérisée par une série d'événements aboutissant à la démence de type Alzheimer. Les gènes des présénilines codent pour des protéines transmembranaires homologues. Leurs fonctions, comme celles de l'APP, ne sont pas connues. Les mutations dans le gène PS-1 seraient responsables de 70 à 80 % des cas familiaux précoces, celles du gène PS-2 de 20%.

La forme sporadique (à début tardive sans association familiale) est liée majoritairement au locus de l'apoE sur le chromosome 19, qui est associé à 64% des cas de MA sporadique.

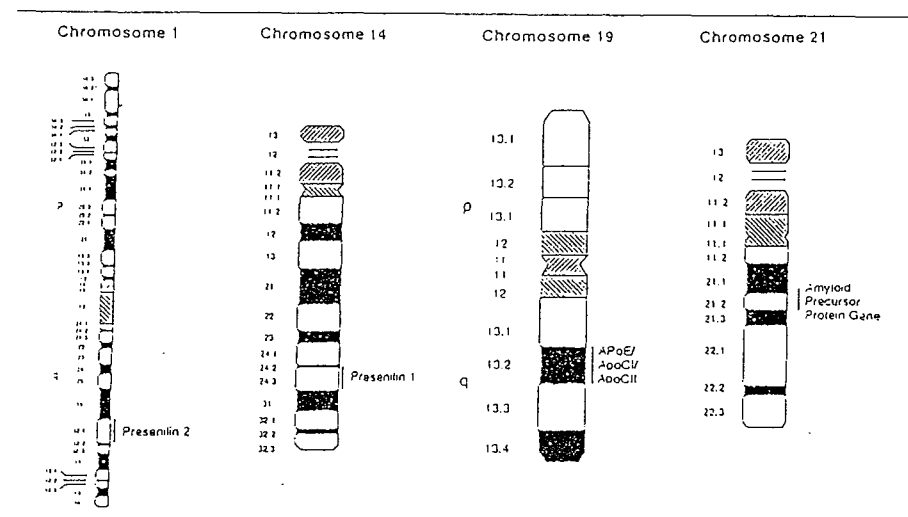


Fig. 9- Localisation chromosomique des 4 marqueurs génétiques de la MA (Levy-Lahad et al, 1996)

La présence d'autres facteurs génétiques est suspectée, notamment au niveau des gènes des récepteurs de l'apoE. Les résultats montrent des divergences entre les différents travaux, dues probablement à la complexité et à l'hétérogénéité de la MA. Certaines études rapportent une association entre la région non codante du gène du récepteur aux VLDL et la MA (Okuizumi et al, 1995). Ces résultats n'ont pas été confirmés par la suite (Okuizumi et al, 1996 ; Arinami et al, 1996 ; Chung et al, 1996 ; Pritchard et al, 1996 ; Lendon et al, 1997 ; Fallin et al, 1997a). D'autres études ont montré que le polymorphisme du gène du récepteur LRP est lié à la MA (Wavrant-DeVrieze et al, 1997 ; Kang et al, 1997). Cette liaison semblant être associée à un faible risque (Lendon et al, 1997). D'autres études n'ont pas confirmé ces associations (Clatworthy et al, 1997; Fallin et al, 1997b). Quant au gène du récepteur aux LDL, aucune association n'a été détectée entre son polymorphisme et la MA (Lendon et al, 1997).

Les études du gène de l' $\alpha$ -antichymotrypsine avec la MA ont connu les mêmes divergences, concernant l'étude de l'association de son polymorphisme à un risque accru de développer la MA. Certaines études ont conclu à une association positive (DeKosky et al, 1996 ; Yoshiiwa et al 1997 ; Morgan et al, 1997), d'autres à une association de nature sexe-dépendante (Kamboh et al, 1997) et la plupart à une absence d'association (Muller et al, 1996 ; Haines et al, 1996 ; Murphy et al, 1997 ; Helisalmi et al, 1997 ; Didierjean et al, 1997 ; Fallin et al, 1997c).

Certains travaux mettent en cause le système HLA et mettent en évidence une association entre la présence d'une forme allélique (A2) et la susceptibilité d'avoir la MA (Small and Matsuyama, 1986; Small et al, 1991; Payami et al, 1991; Payami et al, 1997)

Récemment, Lehman et al, (1997) ont découvert qu'un variant génétique de la butyrylcholinestérase (*BCHE-K*) est associé avec l'allèle  $\epsilon 4$  de l'apoE dans la MA. Leurs résultats montrent que les sujets porteurs des deux allèles *BCHE-K* et  $\epsilon 4$  ont 30 fois plus de risque d'avoir la MA, tandis que le variant *BCHE-K* à lui seul augmente de 7,5 fois ce risque.

Enfin certains travaux ont recherché une association entre des nouveaux polymorphismes au niveau de la région non codante de l'apoE et la MA. Un polymorphisme au niveau de l'intron 1 (IE1G/C) semble être en liaison avec la MA avec un plus grand risque en présence de l'allèle IE1G (Mui et al, 1996) . Toutefois, cette liaison apparente semble être la conséquence d'une forte association entre cet allèle et  $\epsilon 4$ . D'autres résultats très récents décrivent une association

entre l'allèle A du locus polymorphique (-491A/T) localisé au niveau de la région de régulation du gène de l'apoE et un risque élevé pour la MA, et ce indépendamment de l'allèle  $\epsilon 4$  (Bullido et al, 1998). Les auteurs ont montré des activités de transcription plus élevées de cet allèle et ont suggéré que l'association de l'apoE avec MA peut être la conséquence d'une expression locale plus importante de cette protéine. Dans la même optique, Lambert et ses collaborateurs (1997) ont montré une expression plus importante de l'allèle  $\epsilon 4$  dans la MA. Ce qui pourrait suggérer que les fonctions de l'apoE pourrait être modulées aussi bien par ses variations quantitatives que qualitatives.

### ***II-3. Facteurs de risque environnementaux***

Mis à part les facteurs de risque génétiques, des facteurs de risque exogènes pour la MA sont proposés tels que : le niveau d'éducation, les antécédents médicaux personnels, la nutrition, l'exposition aux métaux lourds et aux toxines.

Les hypothèses d'implication des facteurs environnementaux comme agents provoquant la MA ont été suggérées par des études récentes de prévalence chez des groupes ethniques vivant dans plusieurs endroits géographiques. Notamment, les Japonais résidant dans l'état de Washington (Graves et al, 1996) et à Honolulu (White, 1996) avaient une plus grande prévalence par rapport à l'ethnie restant dans le pays d'origine (Fukunishi et al, 1991; Ueda et al, 1992). Les prévalences étaient 3,5%, 4,7% et 1,88 % respectivement.

#### **II-3-1. La nutrition**

Même en se basant sur les rapports nutritionnels du FAO (Food and Agriculture Organization), l'étude à l'échelle mondiale des facteurs nutritionnels se heurte à des problèmes majeurs qui sont les différences entre les populations, notamment des pays européens et nord-américains d'une part, et des pays asiatiques et africains d'autre part. Ces différences concernent surtout la distribution d'âge, l'espérance de vie des malades d'Alzheimer, les différences génétiques, les habitudes alimentaires, les normes des efforts physiques, etc... Une méta-analyse (Grant, 1997) révèle que les études limitées aux pays européens et nord américains (Angleterre, Canada, Espagne, Etats Unis, Finlande, Italie, Suède) montrent que la consommation de lipides est fortement associée au risque d'avoir la MA tandis que le poisson semble y être inversement

associé. D'après cette étude 1 calorie de poisson semble contrer les effets de 0,48 g de lipide (ou approximativement 4,3 calories de lipides).

D'autres études ont montré également la forte association des lipides avec la maladie d'Alzheimer (Harman, 1995; Kalmijn et al, 1997, Sano et al, 1997) et l'effet protecteur du poisson dont l'apport alimentaire semble réduire le risque de développer une démence (Kalmijn et al, 1997), tandis que l'acide linoléique augmente ce risque.

### II-3-2. Le tabac et l'alcool

Plusieurs études cas-témoins ayant étudié le rôle du tabac dans la MA, ont observé que le risque de maladie était inférieur chez les fumeurs, mais cette association n'était pas significative. Les méta-analyses (Graves et al., 1991; van Dujin and Hofman, 1992; Lee, 1994) menées sur ce sujet ont trouvé un effet statistiquement protecteur du tabac. D'autres études ont montré que la nicotine a un effet neuroprotecteur et est inhibiteur de la cytotoxicité du peptide A $\beta$  (Shimohama, 1996; Kihara et al, 1996). La nicotine semble inhiber la précipitation *in vitro* du peptide A $\beta$  en prévenant la transformation conformationnelle amyloïdogénique hélice  $\alpha$ →feuille  $\beta$  de ce peptide (Salomon et al, 1996). Les études épidémiologiques de l'effet de l'alcool sont moins claires. Les travaux reportent des effets non significatifs (Graves et al., 1991; van Dujin and Hofman, 1992), positifs (Ferini-Strambi et al., 1990) et négatifs (Fratiglioni et al., 1993). Une étude récente française a montré un effet protecteur d'une consommation « modéré » de vin (3 à 4 verres par jours) contre la MA (Orgogozo et al, 1997). Il s'agissait d'une étude prospective avec un suivi de 3 ans d'une cohorte de sujets âgés de la région bordelaise et un recueil des cas incidents de démence. Toutefois, les limitations de cette étude ne sont pas négligeables, notamment en l'absence de données concernant les habitudes de vie et de consommation durant les nombreuses années ayant précédé l'étude.

### II-3-3. Les métaux

Plusieurs travaux ont rapporté des taux élevés d'aluminium, de métaux de transition (argent, cobalt, fer, mercure,...), de sodium et de chlorure dans le cerveau des patients décédés de la MA (Ehmann et al, 1986; Thompson et al, 1988 ; Wenstrup et al, 1990). Les fonctions

physiologiques de ces métaux dans le cerveau ne sont pas claires. La question du rôle de l'aluminium dans la MA est controversée malgré les associations notées entre des expositions élevées à l'aluminium et la prévalence de la MA (Doll, 1993; Forbes and McLachlan, 1996). En dépit de ces propriétés neurotoxiques, l'aluminium ne cause pas la MA. Toutefois, il semble qu'il soit suffisamment associé à cette maladie pour qu'il puisse être impliqué dans son développement (Savory et al, 1996).

#### ***II-4. Diagnostic et traitements de la Maladie d'Alzheimer***

Le diagnostic de la MA n'est pas une procédure simple et il est plutôt basé sur l'exclusion d'autres causes probables de démence (maladies de Parkinson, de Huntington, de Creutzfeld-Jacob, de Pick,..). A l'apparition des symptômes, des évaluations neurologiques psychiatriques et physiques complètes devraient être menées par un clinicien spécialiste. Ces examens doivent inclure une histoire médicale détaillée, des examens de laboratoire et des tests neuropsychologiques (le plus répandu est le Mini Mental State Examination ou MMS, Folstein et al, 1975). L'utilisation du CT scanner cérébral, de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), de l'électroencéphalographie, de la spectroscopie RMN et plus récemment de l'imagerie fonctionnelle - tomographie d'émission monophotonique (SPECT) et tomographie d'émission à positons (PET) peuvent être utiles. Ces techniques permettent des mesures directes de l'atrophie cérébrale corticale, des modifications morphologiques de la substance blanche et des mesures du métabolisme cérébral. Parmi les critères de diagnostic les plus répandus sont ceux établis par le NINCDS/ADRDA ou *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (Mc Kakann, 1984) qui incluent, pour un diagnostic de MA probable, une évaluation MMS, des examens cérébraux au scanner et des examens de la composition de LCR. Après des examens complets, le diagnostic d'une maladie Alzheimer probable est certain dans 80 à 90 % des cas. Seule l'autopsie et l'examen histopathologique du tissu cérébral peuvent confirmer le diagnostic par la présence de nombreuses plaques séniles et de lésions neurofibrillaires.

Concernant le traitement de la MA, le premier médicament mis au marché (depuis 1993 aux USA) est la tacrine ou Cognex® (Parke-Davis) qui est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, utilisé

dans le but d'augmenter les niveaux endogènes d'acétylcholine dans le cerveau et d'augmenter, en conséquent, la neurotransmission cholinergique. L'efficacité de la tacrine est limitée au cas modérés de MA et certains patients ont approuvé une amélioration au niveau des performances cognitives et des capacités à exercer plusieurs activités de la vie courantes. Toutefois les effets secondaires, parfois importants et graves, ont entraîné des limitations à son utilisation. Plus récemment, un deuxième médicament est mis sur le marché, l'Aricept® (Pfizer), un autre inhibiteur de l'acétylcholinestérase. L'Aricept semble être caractérisé par des meilleures efficacité et tolérabilité. Beaucoup d'autres médicaments sont au stade d'essai (phase II et III) ou encore au stade de recherche de base. De multiples approches de traitement ont été proposées par la recherche sans aboutir à une amélioration significative chez la majorité des patients souffrant de la MA. Deux principales stratégies thérapeutiques sont retenues :

- La stratégie étiologique dont les objectifs sont d'éliminer les éventuelles causes pathogènes, toxiques, auto-immunes... par l'utilisation d'inhibiteurs de l'agrégation du peptide A $\beta$ , d'inhibiteurs de l'oxydation, d'agents chélateurs de métaux et des immunotroques. La plupart de ces stratégies sont au stade expérimental.
- La stratégie symptomatique par l'utilisation des facteurs neurotroques (exemple : le Facteur de Croissance Neuronale, NGF), et l'utilisation au niveau du système de la neurotransmission cholinergique, de précurseurs de l'acétylcholine, d'agonistes post-synaptiques et d'inhibiteurs de la cholinestérase (comme la tacrine et l'Aricept). D'autres produits sont utilisés dans une stratégie symptomatique plus générale comme les médicaments psychotropes qui luttent contre les troubles du comportement et les réactions émotionnelles (les antidépresseurs, les neuroleptiques).



### **III- L'apolipoprotéine E, son rôle dans le métabolisme lipidique, ses récepteurs et sa place dans la maladie d'Alzheimer**

Les apolipoprotéines (apo) ont des propriétés physico-chimiques qui assurent le maintien des lipoprotéines, particules circulantes formées de lipides et de protéines et contenant la totalité des lipides sanguins, à l'exception des acides gras non estérifiés. Ces apolipoprotéines jouent également un rôle dans la sécrétion, le transport et le métabolisme de ces particules via des récepteurs cellulaires. Elles ont également des propriétés d'inhibiteurs ou d'activateurs enzymatiques. La liste des apolipoprotéines, leurs répartitions et leurs fonctions sont résumées dans le tableau 1.

L'apolipoprotéine (apo) E est une protéine de 299 acides aminés, d'un poids moléculaire de 34200 Da (Rall et al, 1992). Elle est polymorphe, son locus localisé sur le chromosome 19 (en position 19q12) possède trois allèles majeurs  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ .

L'isoforme E3, la plus fréquente, présente une cystéine en position 112 et une arginine en position 158 ; l'isoforme E4 se différencie de E3 par la substitution de la cystéine en position 112 par une arginine; l'isoforme E2 se distingue de E3 par la substitution de l'arginine en position 158 par une cystéine. Les trois isoformes diffèrent par leurs points isoélectriques (PI) en isoélectrofocalisation : apoE2 (PI=5,3), apoE3 (PI=5,4) et apoE4 (PI=5,55). Les isoformes humaines intracellulaires hépatiques et du LCR diffèrent des isoformes sériques par leur sialylation, ajoutant une complexité supplémentaire au polymorphisme de l'apoE.

Dans de nombreuses espèces, dont l'homme, le cerveau est le second site de synthèse de l'apoE après le foie (Elshourbagy et al, 1985). Les astrocytes et les oligodendrocytes sont les principales cellules de production de l'apoE dans le cerveau (Boyles et al, 1985; Pitas et al, 1987). L'apoE est synthétisée au niveau du système nerveux périphérique par les cellules de Schwann.

**Tableau 1-** Principales apolipoprotéines et leurs caractéristiques (Mahley et al, 1984; Doré et al, 1994)

	Masse moléculaire	Concentration sérique (mg/l)	Présence	Fonction principale
<b>Apo(a)</b>	500 000	0,01-1	Lp(a)	inhibiteur de la fibrinolyse
<b>ApoAI</b>	28 016	0,8-1,6	HDL	Activateur de la LCAT
<b>ApoAII</b>	17 414	0,20-0,55	HDL	Activateur de la lipase hépatique
<b>ApoAIV</b>	46 000	<0,05	chylomicrons	métabolisme des TG, cofacteur de la LCAT
<b>ApoB100</b>	550 000	0,60-1,6	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	sécrétion des VLDL, protéine de structure des LDL
<b>ApoB48</b>	264 000	0-0,02	chylomicrons, VLDL, IDL	synthèse et sécrétion des chylomicrons
<b>ApoCI</b>	6 600	0,03-0,11	chylomicrons, HDL	activateur de la LCAT
<b>ApoCII</b>	8 850	0,01-0,07	chylomicrons, VLDL, HDL	activateur de la LPL
<b>ApoCIII</b>	8 800	0,03-0,23	chylomicrons, VLDL, HDL	inhibiteur de la LPL
<b>ApoD</b>	22 000	0,08-0,10	HDL	activateur de la LCAT
<b>ApoE</b>	34 100	0,02-0,60	chylomicrons, VLDL, HDL	métabolisme des chylomicrons et des IDL
<b>ApoF</b>	30 000	0,02	HDL	-
<b>ApoG</b>	72 000	<0,05	VLDL	-
<b>ApoH</b>	45 000	0,2	chylomicrons	activateur de la LPL
<b>ApoJ</b>	70 000	0,1	HDL	inhibiteur du complexe du complément
<b>ApoK</b>	34 500	0,05-0,3	HDL	paroxonase
<b>ApoL*</b>	41 041	0,005-0,007	HDL, VLDL	spécifique du pancréas

\* Duchateau et al, 1997

### **III-1. APOE ET METABOLISME LIPIDIQUE**

L'apoE est l'un des composants des lipoprotéines riches en triglycérides dans la circulation sanguine (chylomicrons, lipoprotéines de très faible densité (VLDL)) et des lipoprotéines de haute densité (HDL). L'apoE est le ligand de ces lipoprotéines aux récepteurs cellulaires dont le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL) se trouve dans le foie, le neuropile et les astrocytes ; le récepteur apoB/E ou LDLR et le récepteur LRP (protéine proche des récepteurs LDL) dans les neurones et en petite quantité sur les astrocytes, et le récepteur des VLDL et des chylomicrons (VLDLR).

La forme E2 qui est principalement associée à la fraction HDL des lipoprotéines plasmatiques, et dont l'affinité est réduite pour les récepteurs apoB/E entraîne une cholestérolémie plus basse que la forme E3. La forme E4, quant à elle, a une plus grande affinité pour les VLDL et pour les récepteurs apo B/E provoquant une cholestérolémie plus élevée par rapport à E3.

Nous avons montré que, dans la population lorraine, 17% de la variabilité génétique du cholestérol est imputable aux variations alléliques de l'apoE (Boerwinckle et al, 1987) et que les sujets porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  présentent des taux de triglycérides plus élevés que les sujets porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  lorsque leur poids augmente (Gueguen et al, 1989).

### **III-2. APOE ET RECEPTEURS DES LIPOPROTEINES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL**

Les récepteurs des LDL (LDLR) appartiennent à une famille multifonctionnelle qui accepte des ligands autres que les lipoprotéines, tels que les complexes protéases-inhibiteurs de protéases. Les membres de cette famille diffèrent aussi dans leur distribution tissulaire (Tableau 2). Néanmoins, ils ont tous une propriété commune, celle de lier l'apoE.

Le nombre de membres de cette famille s'enrichit régulièrement en parallèle avec les progrès de la biologie moléculaire, et la découverte de nouveaux récepteurs de l'apoE tels que le LR7/8B (Kim et al, 1996) et le LR11 (Yamazaki et al, 1996). Ces deux récepteurs sont exprimés de façon abondante dans les neurones et au cours du développement du SNC. Ils sont donc candidats à des fonctions spécifiques importantes dans la physiopathologie du cerveau.

**Tableau 2-** Principaux récepteurs de l'apoE et localisation dans le cerveau chez l'homme

Récepteurs	Ligands (lipoprotéines)	Localisation dans le cerveau
Récepteur des LDL (LDLR)	ApoE, ApoB (LDL, $\beta$ VLDL, remnants)	neurones, glie
Récepteur des VLDL (VLDLR)	ApoE, LPL (VLDL, $\beta$ VLDL, IDL)	microglie, couches corticales
Mégaline / GP330 / LRP-2	ApoE, LPL, ApoJ (remnants)	cellules de l'épendyme
LRP (LDLR related protein)	$\alpha$ 2M, ApoE, APP, HL, LPL, RAP, LF, TSP, t-PA, t-PA-IC, Nexine, l'exotoxine pseudomonas A (protéoliposomes, chylomocions, $\beta$ VLDL)	plexus choroïde, neurones pyramidaux, cellules granulaires, astrocytes actifs
Récepteur 2 d'ApoE (LR7/8B)	ApoE, RAP ( $\beta$ VLDL)	cortex cérébral, plexus choroïde, hippocampe, épendyme, bulbe olfactif
LR11 ou sorLA-1 ( <i>sorting protein-related receptor containing LA repeats</i> )	ApoE, RAP ( $\beta$ VLDL)	régions CA de l'hippocampe, gyrus dentate, cortex cérébral,

$\alpha$ 2M :  $\alpha$ -2-macroglobuline, HL : lipase hépatique, LF : lactoferrine, RAP : *Receptor-associated protein*, TSP : thrombospondine, t-PA : activateur tissulaire du plasminogène, t-PA-IC : activateur tissulaire du plasminogène - complexe inhibiteur,

### III-2-1. Organisation structurale des récepteurs d'apoE

La superfamille des LDLR est définie par la présence de cinq domaines structuraux et fonctionnels communs très conservés à travers les espèces et caractérisés par une grande identité de séquence (70 à 100%) :

- 1- un domaine N-terminal extracellulaire de liaison au ligand composé de répétitions d'environ 40 a.a. et riche en cystéine (six résidus).
- 2- un domaine de répétitions homologues au facteur de croissance épidermique (EGF) contenant également six cystéines.
- 3- un domaine de liaison de chaîne glucidique (de type O-liaison)
- 4- un domaine transmembranaire.
- 5- un domaine cytoplasmique avec une séquence signalé FDNPVY (hexapeptide contenant une tyrosine).

La différence structurale entre les membres de la famille des récepteurs LDL réside au niveau des répétitions dans le domaine de liaison au ligand, ce qui explique la spécificité de liaison à des ligands différents. Par exemple, le récepteur LDLR contient 7 répétitions, le VLDLR en contient 8 (voir Fig 10).

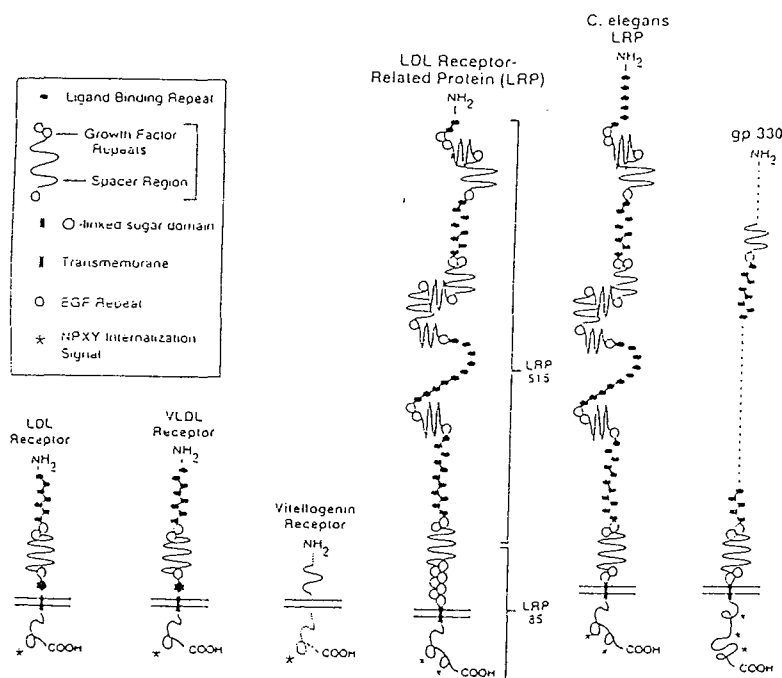


Fig 10- Membres de la famille des récepteurs des LDL et leurs domaines structuraux.

Le récepteur LR7/8B d'abord a été identifié comme étant le récepteur-2 de l'apoE (ApoER2) (Kim et al, 1996) et a été appelé LR7 en raison de sa composition dans le domaine du ligand avec 7 répétitions organisées de façon différente de celles du LDLR et il possède en plus de ce dernier, une insertion de 59 a.a. dans le domaine cytoplasmique. Par la suite, un autre récepteur avec 8 répétitions (dans le domaine du ligand) a été découvert (Novak et al, 1996) et caractérisé par une expression abondante dans le cerveau et a été baptisé LR8B (B= brain). Le LR8B a une structure qui ressemble plus au VLDLR qu'au LDLR. Récemment, l'ApoER2 (LR7) et le LR8B ont été identifiés comme étant deux variants d'un même gène produits par épissage alternatif (Kim et al, 1997). Cela constitue une première dans la famille de récepteurs LDLR.

### III-2-2. Fonctions des récepteurs de l'apoE dans le cerveau

Les lipoprotéines contenant de l'apoE interagissent avec des récepteurs tels que LDLR, VLDLR et LRP, afin de moduler le catabolisme des lipoparticules riches en triglycérides (Goldstein et al, 1985; Takahashi et al, 1992; Beisiegel et al, 1989). Les complexes lipoprotéines-récepteurs sont dirigés vers la voie de dégradation endosomale/lysosomale où l'apoE se dissocie du récepteur qui sera recyclé vers la membrane plasmatique (Brown and Goldstein, 1986). Les autres composants protéiques des lipoprotéines peuvent être dégradés et les lipides utilisés par les compartiments cellulaires.

Dans le LCR, les lipoprotéines contenant l'apoE sont des particules de type HDL contenant d'autres apolipoprotéines (AI, AIV, D, J) (Pitas et al, 1987; Borghini et al, 1994). Dans le cerveau, le cholestérol semble être synthétisé localement (Edmond et al, 1991; Juvernics and Morell, 1995), ce qui suggère une implication importante de l'apoE dans l'homéostasie du cholestérol au niveau du SNC (Pitas et al, 1987, Borghini et al, 1994). Contrairement au compartiment plasmatique où les lipoprotéines contenant de l'apoB (VLDL and LDL) sont également impliquées dans le transport du cholestérol, dans le LCR seules les lipoprotéines contenant l'apoE possèdent les propriétés de se lier aux récepteurs des LDL et de participer au transport du cholestérol par la voie des récepteurs.

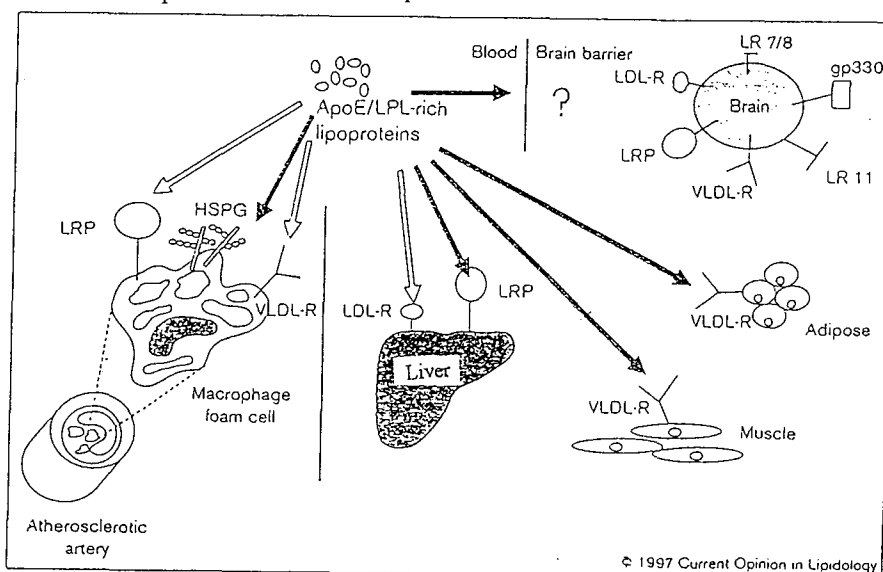


Fig. 11- Récepteurs des lipoprotéines riches en apoE et/ou LPL dans les cellules (St Clair and Beisiegel, 1997).

Boyles et ses collaborateurs (1989) ont développé un modèle de régénération des nerfs périphériques impliquant les lipoprotéines contenant l'apoE et les récepteurs des LDL. Dans ce modèle, les lipides provenant des neurones en dégénérescence sont capturés, stockés localement et réutilisés au cours du processus de régénération et de remyélinisation des axones où les LDLR sont présents à forte concentration. Cela suggère que l'apoE est un intermédiaire dans la livraison des lipides aux axones en régénération (Handelmann, et al, 1992).

La synthèse de l'apoE augmente après des lésions et des dommages cellulaires des neurones périphériques (Snipes et al, 1986) et centraux (Poirier et al, 1991). Le cholestérol nonestérifié libéré après les lésions est estérifié et transporté par l'apoE vers les neurones en cours de réinnervation et sera capté par la voie des LDLR afin de servir comme précurseur pour les nouvelles terminaisons synaptiques (Poirier et al, 1993).

### III-2-3. Domaines structuraux de l'apoE

Une digestion protéolytique limitée de l'apoE a montré que la protéine est composée de deux domaines structuraux (Wetterau et al, 1988; Aggerbeck et al, 1988). Le domaine N-terminal de 22-kDa s'étend de l'acide aminé 1 à 191 et présente une structure globulaire hydrosoluble. Plusieurs évidences montrent que la région 136-150 participe directement à l'interaction de l'apoE avec le LDLR (Mahley, 1988; Mahley et al, 1977; Weisgraber and Mahley, 1978; Innerarity et al, 1983 ; Dyer and Curtiss, 1991). Ce site de liaison est caractérisé par un enchaînement d'acides aminés basiques (lysine, arginine) qui réagissent avec les acides aminés du récepteur apoB/E. Le domaine C-terminal de 10 kDa qui s'étend des acides aminés 201 à 299, est riche en hélices  $\alpha$  amphipathiques et contient le site de liaison aux lipides des lipoprotéines (Weisgraber, 1990). Entre ces deux régions fonctionnelles, se trouve une région de structure non ordonnée sensible au clivage protéolytique, contenant le site d'attachement potentiel d'une chaîne glycanique en position 194.

La structure tridimensionnelle du fragment thrombolytique de 22-kDa de l'apoE a été établie (Wilson et al, 1991). Ce fragment est organisé en quatre hélices allongées où les résidus chargés positivement impliqués dans la liaison au récepteur sont situés dans la 4ème hélice (**Fig 12**) et exposés à l'extérieur. Il a été proposé que, en présence de lipides, la structure en 4

hélices du domaine N-terminal de l'apoE change de conformation afin de pouvoir se lier aux récepteurs (Weisgraber, 1994).

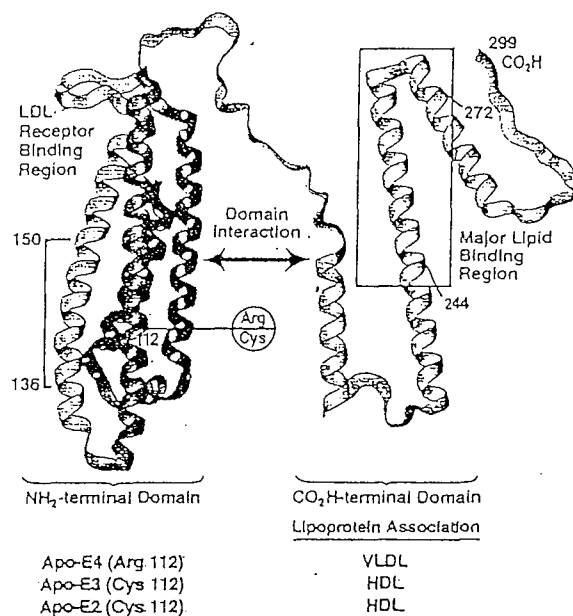


Fig. 12- Modèle des domaines structuraux de l'apoE (Weisgraber and Mahley, 1996).

L'apoE peut former des dimères grâce aux résidus cystéines situés dans le domaine de liaison au récepteur. Ainsi l'apoE3 n'a qu'une seule cystéine peut-elle former des homodimères ApoE3-ApoE3 (Weisgraber and Mahley, 1978) ou des hétérodimères ApoE3-ApoAII. L'apoE2 qui a deux cystéines peut former des homodimères ApoE2-ApoE2, des trimères ApoAII-ApoE2-ApoAII ou autres multimères (Tozuka et al, 1992). L'apoE4, ne possédant pas de cystéines, ne peut être que sous forme monomérique.

### III-2-4. Comportement allèle-spécifique de la liaison de l'apoE aux récepteurs - conséquences fonctionnelles

Récemment, un effet spécifique de l'isoforme de l'apoE dans la régénération neuronale a été mis en évidence dans un système cellulaire de racines de ganglions dorsaux (Nathan et al, 1994). L'apoE3 humaine, en présence des  $\beta$ -VLDL, augmente la pousse neuritique. Toutefois quand l'apoE4 est ajoutée, les branchements et les extensions des neurites sont considérablement réduits.



Cela a permis de suggérer que l'apoE3 pourrait promouvoir la croissance neuronale, tandis que l'apoE4 l'inhiberait. Ces résultats suggèrent que les effets spécifiques à l'allèle impliquent la liaison et/ou l'internalisation des  $\beta$ -VLDL enrichies en apoE par les récepteurs des lipoprotéines et que l'apoE pourrait interagir de manière isoforme-dépendante avec une ou plusieurs protéines cellulaires telles que les protéines du cytosquelette impliquées dans la fonction et la structure des neurones.

Toutefois, Takahashi et ses collaborateurs. (1996) en utilisant les cellules CHO surexprimant les VLDLR et déficientes en LDLR, ont montré que les VLDLR lient les VLDL provenant de sujets normolipidémiques ayant un génotype  $\epsilon 3/\epsilon 3$  aussi bien que celles provenant de sujets  $\epsilon 2/\epsilon 2$ . Mais les lipoprotéines des patients  $\epsilon 4/\epsilon 4$  n'ont pas été étudiées.

Plus récemment, il a été démontré que les liposomes contenant l'apoE sont capables de lier sélectivement le peptide amyloïde  $\beta$  (1-40) soluble et de catalyser l'internalisation de ce peptide dans les neurones et les astrocytes par la voie du récepteur des LDL (Beffert and Poirier, 1996). Ce processus peut être complètement bloqué par la présence d'un anticorps monoclonal dirigé contre la région de liaison du LDLR à l'apoE.

Par contre Guillaume et ses collaborateurs (1996) ont montré des altérations isoforme-spécifiques dans la voie des lipoprotéines contenant l'apoE, en étudiant la liaison des liposomes enrichis en apoE aux astrocytes et aux neurones. Les auteurs ont constaté que la liaison de l'apoE4 a été similaire à celle de l'apoE3 à la fois sur les astrocytes et les neurones, tandis que la liaison de l'apoE3 a été significativement supérieure sur les neurones par rapport aux astrocytes. Il est concevable pour les auteurs que l'internalisation de l'amyloïde  $\beta$  par les astrocytes et les neurones pourrait se produire de façon dépendante à la fois de la concentration et de la nature de l'isoforme de l'apoE dans le SNC.

Ces processus pourraient être considérés comme la clé d'entrée de l'apoE dans les neurones afin qu'elle puisse moduler le métabolisme de la protéine tau. Si la présence cytoplasmique de l'apoE dans les neurones peut être fermement établie (Han et al, 1994), son origine n'est pas claire. De plus, une fraction de cette protéine doit contourner le phénomène de sécrétion après dégradation endosomale des lipoprotéines pour pouvoir interagir avec les composants du cytosquelette.

### *III-3- Place des apolipoprotéines E dans la maladie d'Alzheimer*

Les études génétiques ont établi le lien entre la région chromosomique 19q13.2 (Perikak-Vance et al, 1991) et la MA. Ce n'est que plus récemment que l'étude des marqueurs génétiques polymorphes de la région q13.2 du chromosome 19, regroupant le gène de l'apoE, le gène D19s47, les gènes des apoCI, apoCII, apoCI' et apoCIII, a indiqué que la localisation du variant fonctionnel se limitait au locus de l'apoE (Chartier-Harlin et al, 1994).

De nombreuses études biologiques, épidémiologiques ont montré le lien étroit unissant le polymorphisme de l'apoE à la MA et le rôle central probable que pourrait jouer cette apolipoprotéine dans la physiopathologie de la maladie.

L'équipe de Namba (1991) est la première à montrer par une méthode immunohistochimique la présence de l'apoE aux côtés de la protéine amyloïde A $\beta$  dans les plaques séniles extracellulaires et les vaisseaux sanguins cérébraux ainsi que dans les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) des patients atteints de MA. Une interaction forte entre apoE et A $\beta$  a été démontrée et des complexes apoE-A $\beta$  sont trouvés dans le LCR (Strittmatter et al, 1993). L'équipe de Rebeck (1993) confirme la présence d'apoE et du récepteur LRP dans les plaques séniles des malades. Enfin, le niveau de transcription de l'ARNm de l'apoE dans le cerveau et en particulier dans les astrocytes est augmenté chez les malades (Yamada et al, 1995; Diedrich et al, 1991).

D'autres études indiquent que le rôle de l'apoE dans la MA semble lié à son polymorphisme. Les malades porteurs de l'allèle  $\epsilon$ 4 ont davantage de plaques séniles et la densité des dépôts d'A $\beta$  dans leurs plaques séniles et leurs vaisseaux cérébraux est plus grande (Rebeck et al, 1993; Schmechel et al, 1993; Berr et al, 1994). Selon certains auteurs, les complexes entre apoE4 et A $\beta$  se forment plus rapidement et avec une affinité plus importante que les complexes apoE3 -A $\beta$  (Strittmatter et al, 1993).

L'équipe de Strittmatter et Roses montre le lien entre le polymorphisme de l'apoE et la protéine tau, composant principal des DNF, qui est sous forme hyperphosphorylée dans la MA : la protéine tau non phosphorylée se lie davantage à l'apoE3 qu'à l'apoE4 alors que ni l'apoE4 ni l'apoE3 ne se lie à tau phosphorylée (Strittmatter et al, 1994a and 1994b).

Le rôle probablement important joué par le polymorphisme de l'apoE dans la physiopathologie de la MA est confirmé par les études épidémiologiques.

Roses et ses collaborateurs (Strittmatter et al, 1993) ont été les premiers à montrer une association statistiquement significative entre la MA familiale et la présence de l'allèle  $\epsilon 4$ . Nous avons, peu de temps après, obtenu des résultats superposables chez les malades atteints de MA sporadique à début tardif (0,46 vs 0,12) (12, 13). De nombreuses autres équipes, dont celle d'Amouyel ont également trouvé cette association (Amouyel et al, 1993).

La fréquence des différents allèles varie suivant les études (variations géographiques et ethniques) et l'expression de la maladie (familiale ou sporadique). La fréquence moyenne de l'allèle  $\epsilon 4$  est de 0,37 (0,24-0,52) en cas de MA sporadique à début tardif contre 0,16 (0,12-0,2) pour les témoins.

Le risque de développer la MA pour les porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  est 3 à 15 fois plus grand que celui des non-porteurs selon les études. Dans notre population nous obtenons un odds ratio calculé de 11,82 (Lucotte et al, 1993). Le risque de voir apparaître une MA augmente de 20 à 90% suivant que l'on a 0, 1 ou 2 allèles  $\epsilon 4$ . Actuellement, on estime que 65% des MA seraient attribuables à la présence de  $\epsilon 4$  (Roses et al, 1996). L'âge de début de la MA à début tardif décroît proportionnellement au nombre d'allèles  $\epsilon 4$ . A contrario, l'allèle  $\epsilon 2$  diminuerait le risque de MA et retarderait l'âge d'apparition de la maladie (Corder et al, 1993; Corder et al, 1994). L'effet protecteur de  $\epsilon 2$  contre la MA, cause importante de morbidité chez les personnes âgées, pourrait expliquer en partie la grande fréquence de cet allèle chez les centenaires (Shachter et al, 1994).

Trois hypothèses principales concernant l'intervention de l'apolipoprotéine E dans la physiopathologie de la MA ont été avancées :

### III-3-1. Apolipoprotéine E et croissance neuronale

L'apoE a un rôle certain dans la réparation nerveuse périphérique. En cas d'altération nerveuse périphérique, des macrophages sont mobilisés et produisent en grande quantité l'apoE qui participe à la maintenance des membranes de myéline en redistribuant les lipides de dégradation vers les axones en régénération et vers les cellules de Schwann responsables de la remyélinisation par l'intermédiaire des LDL-récepteurs (Goodrum, 1991).

L'apoE a probablement un effet proche sur la croissance et la réparation du neurone via la voie des récepteurs (voir plus haut). L'apoE3 provoquerait une croissance neuritique (élongation et ramification) alors que l'apoE4 l'inhiberait (Nathan et al, 1994), probablement en raison

d'affinités différentes avec les lipoprotéines et les récepteurs, impliquant des qualités différentes de transport des lipides dans le système nerveux central. Les isoformes pourraient aussi interagir différemment avec la matrice extracellulaire par leur liaison aux protéoglycanes à héparine sulfate ou en déplaçant les facteurs de croissance.

### III-3-2. ApoE et dépôt amyloïde

La deuxième hypothèse, appelée "cascade de l'amyloïde" est proposée dès 1992 par Hardy et Higgins .

La MA serait due à :

1- une hyperproduction de peptide A $\beta$  responsable de la formation de substance amyloïde toxique pour le neurone. Cette hyperproduction d'A $\beta$  pourrait être secondaire à :

- un excès de production d'APP: le modèle type est la trisomie 21, où les patients ont 3 copies du gène codant pour l'APP. Dans cette maladie, on observe une hyperproduction d'APP par un effet gène-dose et l'apparition d'une MA à début précoce.

- un défaut de maturation de l'APP: la MA à début précoce et familiale est liée au chromosome 14q24.3, probablement impliqué dans la maturation de l'APP: les gènes candidats sont des inhibiteurs de protéases, la cathepsine D(14q11), c-Fos ou une protéine de choc thermique (HSPA2) fonctionnant comme un chaperon positif. Il a été décrit des familles suédoises et hollandaises dont les membres présentent une MA précoce par mutation ponctuelle du gène de l'APP. Les cellules de neuroblastome transfectées par une forme d'APP qui présente la mutation "suédoise" expriment 6 à 8 fois plus de protéine A $\beta$  que les cellules transfectées par l'APP de type sauvage.

2- une potentialisation de l'effet neurotoxique de l'A $\beta$  sécrétée en quantité physiologique où l'apoE interviendrait probablement. En effet, en réponse aux lésions neuronales physiologiques produites lors du vieillissement, la microglie activée et les astrocytes réactifs produiraient davantage d'apoE par activation de protéines kinases C. Les cellules microgliales, riches en LDL-récepteurs, peuvent lier l'apoE4 qui est capable à son tour de se lier avec une grande affinité au peptide A $\beta$  (Strittmatter et al, 1993), directement ou par l'intermédiaire de glycosaminoglycanes. La production et la fixation à la microglie de l'apoE4 pourrait faciliter la concentration et le dépôt de A $\beta$  sur et autour de la microglie, formant ainsi le noyau des plaques amyloïdes (transformation des plaques séniles diffuses en plaques séniles fibrillaires et

insolubles), transformant les monomères d'A $\beta$  en agrégats insolubles. En effet, la formation de substance amyloïde semble dépendante d'un phénomène de nucléation. La liaison apoE4-A $\beta$  serait le grain (*seed*) qui activerait la "cristallisation" de la protéine A $\beta$ . Les apoE2 et E3 pourraient inhiber cette polymérisation et apoE4 la favoriser. L'apoE pourrait ainsi être une molécule chaperone pathologique (Wisniewski and Frangione, 1992).

La neurotoxicité de l'A $\beta$  pourrait être secondaire à une activation de mécanismes apoptotiques (Loo et al, 1990) ou à augmentation de l'entrée cellulaire du calcium par une déstabilisation de la membrane. Ces phénomènes entraîneraient une phosphorylation anormale de la protéine tau avec formation de filaments en paire hélicoïdaux (PHF), conduisant à une dépolymérisation des microtubules, une altération du transport axonal, une déconnection des synapses, une repousse anarchique avec dégénérescence du neurone et une gliose active qui entretiendrait le cercle vicieux par une augmentation de la sécrétion de l'apoE par les astrocytes (Fukuyama et al, 1994).

Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'indométacine (anti-inflammatoire non stéroïdien inhibiteur de prostaglandines et de l'IL1, qui supprimerait l'activation de la microglie) semble prévenir ou retarder le début de la MA (Breitner et al, 1994). D'autres antagonistes de l'IL1 $\beta$  pourraient avoir la même action inhibitrice sur la prolifération gliale.

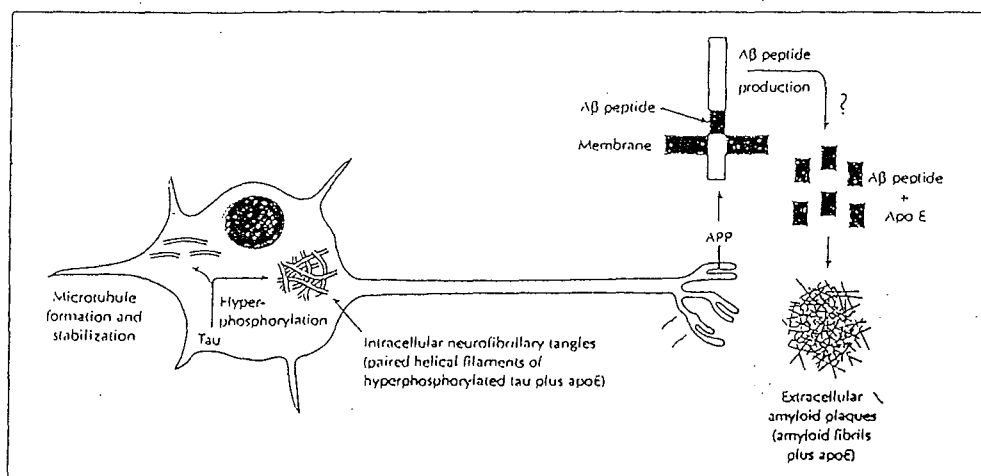


Fig. 13- Représentation schématique de la formations des plaques séniles et des lésions neurofibrillaires dans la MA (Weigraber and Mahley, 1996).

L'hypothèse de Hardy et Higgins (Hardy and Higgins, 1992) est controversée. L'apoE pourrait être impliquée dans la clairance de la substance amyloïde physiologiquement produite. L'équipe de Whitson (Whitson et al, 1994) montre que l'apoE tend à abaisser la neurotoxicité de l'A $\beta$  dans des cultures de neurones hippocampiques, suggérant qu'à concentration normale dans le LCR, l'apoE aurait un rôle neuroprotecteur. Cette neuroprotection pourrait être due à une augmentation de la disponibilité des lipides recyclés à partir des membranes des neurones endommagés. D'autre part, l'A $\beta$  pourrait être éliminée du neuropile par les neurones et les astrocytes par l'intermédiaire de la liaison apoE-LRP. L'apoE4 pourrait être moins neuroprotectrice que l'apoE2 en raison d'une durée de vie plus courte. La plus grande affinité de l'apoE4 pour l'A $\beta$  pourrait la soustraire à ses mécanismes de régulation, induirait sa plus grande production et favoriserait l'amyloïdogénèse. Cet effet neuroprotecteur de l'apoE est corroboré par l'observation d'une augmentation de l'ARNm de l'apoE dans l'hippocampe après lésion du cortex entorhinal avec un délai superposable à l'augmentation de tubuline1 impliquée dans les mécanismes de repousse neuronale (Poirier et al, 1991) : les lésions du cortex entorhinal entraînent une dégénérescence de la voie perforante allant du cortex entorhinal à l'hippocampe par destruction des cellules pyramidales CA1. La conséquence est une activation des astrocytes et une hyperproduction d'apoE favorisant la repousse des cellules pyramidales hippocampiques glutaminergiques et des cellules cholinergiques du septum. Il semble enfin que l'apoE puisse aussi moduler la neurotoxicité de A $\beta$  en modifiant les taux de cholestérol cellulaire et membranaire en particulier, qui comme les facteurs de croissance, semblent agir sur la fonction neuronale en modulant l'homéostasie calcique. Le cholestérol pourrait contrer les effets neurotoxiques de l'A $\beta$ , expliquant ainsi l'augmentation de la neurotoxicité de A $\beta$  dans les zones pauvres en cholestérol telle que la substance grise corticale (Hartmann et al, 1994). Cette hypothèse est démentie par Sparks et ses collaborateurs (1994) qui observe, chez des animaux nourris avec une grande quantité de cholestérol (2%) une accumulation d'A $\beta$  dans les cellules cérébrales, sans induire pour autant d'altération du cytosquelette, indiquant que le cholestérol pourrait avoir une action directe sur le métabolisme de l'APP.

### III-3-3. ApoE et lésions neurofibrillaires

La troisième hypothèse met en jeu l'interaction entre l'apoE et la protéine tau. Dans la MA, le cytosquelette neuronal est progressivement détruit et remplacé par des agglomérats de

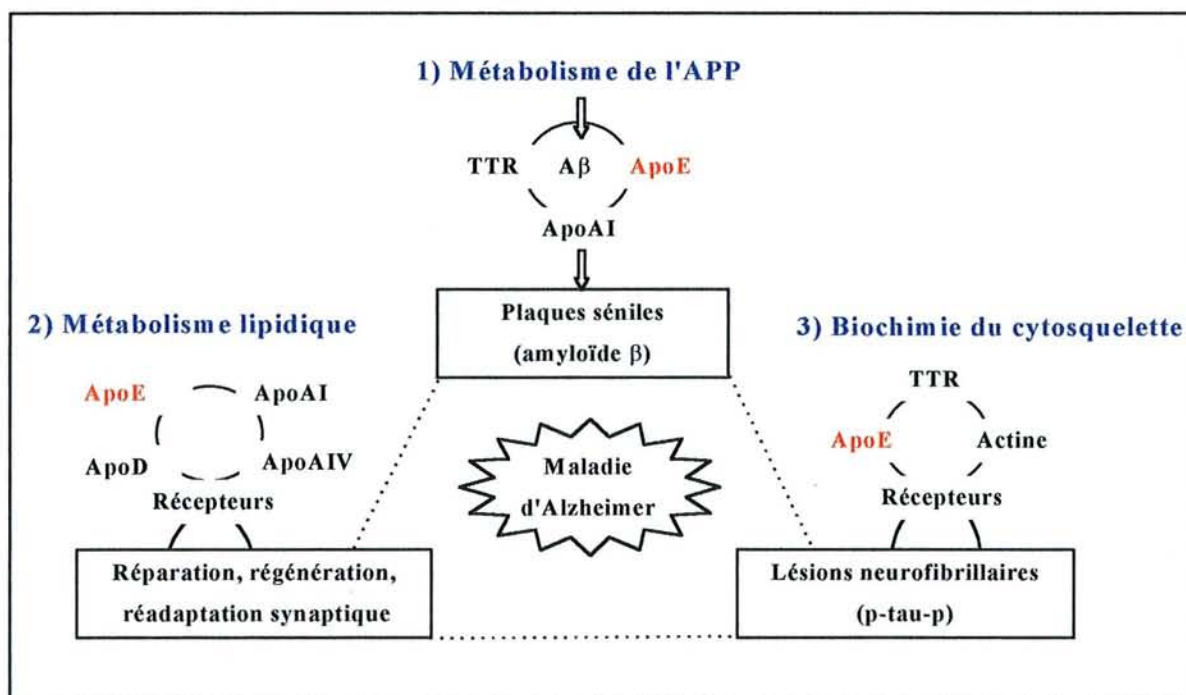
filaments en double hélice (PHF) qui sont composés en grande partie de protéines tau sous forme hyperphosphorylée. L'assemblage et l'intégrité des microtubules sont inhibés par la phosphorylation de tau, probablement par défaut de liaison de la protéine tau normale à la tubuline dans les microtubules. Les neurones présentant ces dégénérescences neurofibrillaires de filaments en double hélice perdent l'assemblage microtubulaire de leur cytosol et dégèrent.

L'apoE est l'un des constituants des DNF des patients présentant une MA (Namba et al, 1991). Quand l'apoE3 est incubée avec la protéine tau, l'apoE3 forme des complexes stables avec cette dernière sous sa forme non-phosphorylée contrairement à l'apoE4, alors qu'aucune des deux isoformes ne se lie à tau phosphorylée. Les isoformes E3 et E2 pourraient être des cofacteurs bénéfiques ou des agents séquestrants de la protéine tau en la protégeant de la phosphorylation, ce qui lui permettrait de conserver son action sur les microtubules (Strittmatter et al, 1994a). Ce rôle protecteur de l'apoE nécessite sa présence dans le neurone et des études de détection immunohistochimiques démontrent sa présence dans les neurones (Strittmatter et al, 1994b).

D'autres hypothèses alternatives aux possibles implications de l'apoE dans la MA ont été proposées. Plusieurs travaux ont étudié, notamment, la neurotoxicité de l'apoE et de son fragment de clivage par la thrombine (Marques et al, 1996 ; Marques et al, 1997 ; Crutcher et al, 1997). Le fragment provenant de la dégradation de l'isoforme E4 semble provoquer plus de toxicité chez les neurones en culture que le fragment provenant de l'isoforme E3. Cette action nécessiterait l'interaction avec le complexe récepteur LRP (LDL-receptor Related Protein) protéoglycane à héparine sulfate (Talor et al, 1997). Ces hypothèses sont appuyées par d'autres résultats décrivant, d'une part, la présence de la thrombine dans les plaques séniles (Akiyama et al, 1992) et d'autre part, une diminution de l'inhibiteur le plus important de la thrombine, la protéase-nexine-1 dans le cerveau en *post mortem* des patients atteints de la MA, notamment autour des vaisseaux sanguins (Wagner et al, 1989 ; Vaughan et al, 1994), impliquant des activités importantes de la thrombine dans cette maladie.

## IV- Place des apolipoprotéine E, D, AI, AIV, de la transthyréline et de l'actine dans la maladie d'Alzheimer

Les marqueurs biochimiques et génétiques que nous avons étudiés sont présentés brièvement dans ce chapitre. Il s'agit pour la plupart d'apolipoprotéines (voir Tableau 2) dont le choix est justifié par leur place potentielle dans des fonctions essentielles au sein du SNC, notamment dans le maintien de l'intégrité et de la plasticité et dans la réparation neuronale : c'est le cas des apolipoprotéines **AI**, **AIV**, **D** et **E**. D'autres fonctions importantes dans la MA, notamment au niveau de la biochimie et de l'équilibre du peptide  $A\beta$ , pourraient être assurées ou modulées par la **transthyréline** mais également par l'apoAI. Finalement, nous avons suivi les variations de **l'actine** afin de faire le lien entre la biochimie du cytosquelette, aspect aussi important que l'amyloïdogenèse dans la MA, et les éventuelles fonctions régulatrices de l'apoE et de la TTR. Toutes ces protéines, par comparaison à d'autres protéines importantes dans le métabolisme lipidique telles que les ApoAII, B, CI et CII, sont synthétisées dans le cerveau et possèderaient des fonctions propres à celui-ci. Nous avons donc essayé de d'étudier la nature de ces fonctions dans un environnement biochimique et génétique lié à la MA.



**Fig. 14** - Présentation des marqueurs étudiés, de leur implication potentielle et de leur possible interaction au niveau de trois voies physiopathologiques essentielles dans la maladie d'Alzheimer : la régulation du métabolisme du peptide amyloïde  $\beta$ , la biochimie du cytosquelette et le métabolisme lipidique. Abréviations :  $A\beta$  : peptide amyloïde  $\beta$  ; APP : précurseur de l' $A\beta$  ; TTR : transthyréline ; p-tau-p : protéine tau sous forme hyperphosphorylée.



#### IV-1. L'APOLIPOPROTEINE D

L'apolipoprotéine D (apoD) est une composante protéique des HDL plasmatiques, elle représente 5% du total des HDL (Fielding and Fielding, 1980). Elle est associée, dans ces particules, à l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) (Draya et al, 1986). L'apoD présente une grande homologie avec la protéine vectrice du rétinol (*retinol binding protein*) plasmatique et appartient à la superfamille des  $\alpha$ -2-microglobulines ou lipocalines, qui appartiennent, elles, à la famille des *calycines*. La caractéristique des lipocalines est leur structure organisée en huit feuillets  $\beta$  antiparallèles qui forment une poche (ou calice) qui leur confère la potentialité de lier des ligands hydrophobes. La plupart des gènes des lipocalines sont organisés sous forme de cluster sur le bras long du chromosome 9. Le poids moléculaire de cette glycoprotéine est estimé à 33kDa. Le gène humain est localisé sur le chromosome 3 région p14.2-qter (Drayna et al, 1987a), celui de la souris sur le chromosome 16 (Warden et al, 1992). Le ligand physiologique de l'apoD reste peu connu. Toutefois, cette protéine est capable de lier la progestérone, la bilirubine et l'acide arachidonique (Pearman et al, 1973, Peitsch and Boguski, 1990; Morais Cabral et al, 1995). Le locus de l'apoD présente de multiples RFLPs (Drayna et 1987b). Komboh et ses collaborateurs (1989) ont été les premiers à démontrer le polymorphisme de l'apoD à l'aide de techniques d'isoélectrofocalisation et d'immunorévélation. Les auteurs ont rapporté l'existence de deux allèles ApoD\*1 et ApoD\*2. Holmquist (1992) a montré l'hétérogénéité de l'apoD en isoélectrofocalisation, il a pu mettre en évidence 7 isoformes de l'apoD réparties entre des pI de 4.6 à 6.2.

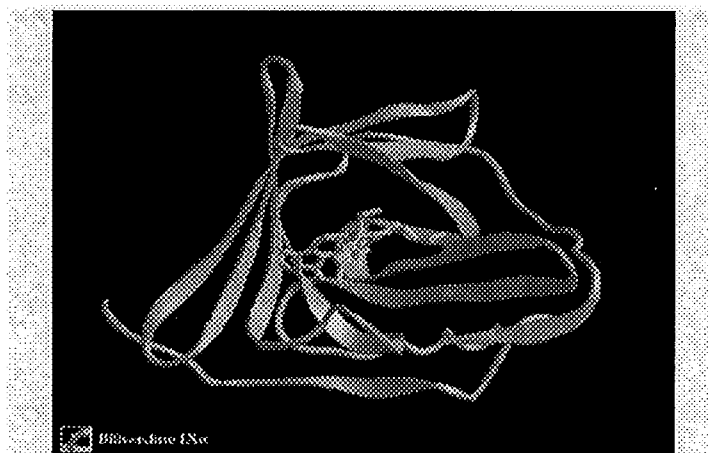


Fig. 15- Structure tridimensionnelle de l'apoD

L'apoD correspond à la protéine GCDPF-24, protéine liant la progestérone retrouvée dans le liquide des kystes chez les patients atteints de la maladie 'gross cystic' du sein (Pearlman et al, 1973; Lea et al, 1987; Balbin et al, 1990).

Dans le plasma, elle est associée aux particules lipoprotéiques, notamment aux HDLs et aux VLDLs. Cette liaison semble être réalisée principalement par l'intermédiaire de l'apoAII via des interactions dissulfures (Blanco-Vaca et al, 1992; Yang C-Y et al, 1994). Elle est également associée à la LCAT et pourrait la stabiliser et jouer un rôle dans l'estérification du cholestérol (Chajek and Fielding, 1978, Steyer and Kostner, 1987). Smith et ses collaborateurs (1990a) ont proposé un rôle dans le transport du cholestérol ou de ses dérivés à travers la barrière hémato-encéphalique. Toutefois, aucune affinité de l'apoD vis-à-vis du cholestérol n'a été mise en évidence (Morais Cabral et al, 1995).

L'apoD s'accumule avec les apo E, AI, AIV durant la régénération neuronale périphérique (Spreyer et al, 1990), son taux augmente de 500 fois (l'apoE 250 fois) dans ces conditions (Boyles et al, 1990) A l'exemple de l'apoE, elle joue un rôle potentiel dans le processus de dégénération-régénération dans le système neuronal périphérique et central.

Chez la souris, l'apoD est très exprimée dans le système nerveux central, contrairement à l'homme et au lapin. Les sites de synthèse sont localisés majoritairement dans les cellules gliales - les astrocytes et les oligodendrocytes- (Provost et al, 1990 and 1991; Séguin et al, 1995 ; Patel et al, 1995).

### ***IV-3. L'APOLIPOPROTEINE AI***

L'apoAI mature est un polypeptide de 243 aminoacides, de poids moléculaire d'environ 28 kDa. Le gène de l'apoAI est localisé sur le bras long du chromosome 11 dans le locus contenant les gènes de l'apoCIII et de l'apoAIV (Li WH et al 1988). L'apoAI est la protéine majoritaire des HDLs, elle représente approximativement 70% de leur masse protéique totale. Elle intervient dans l'efflux et l'élimination du cholestérol cellulaire grâce à ses propriétés physicochimiques et son organisation structurale particulière (Allan et al, 1992; Dalton and Swaney, 1993; Sviridov et al, 1996). L'activation de la lécithine cholestérol acyltransférase est une autre fonction de l'apoAI qui est également assurée par les apo AIV, CI, D et E (Mahley et al, 1984; Steinmetz et Utermann, 1985; Steyer and Kostner, 1987).

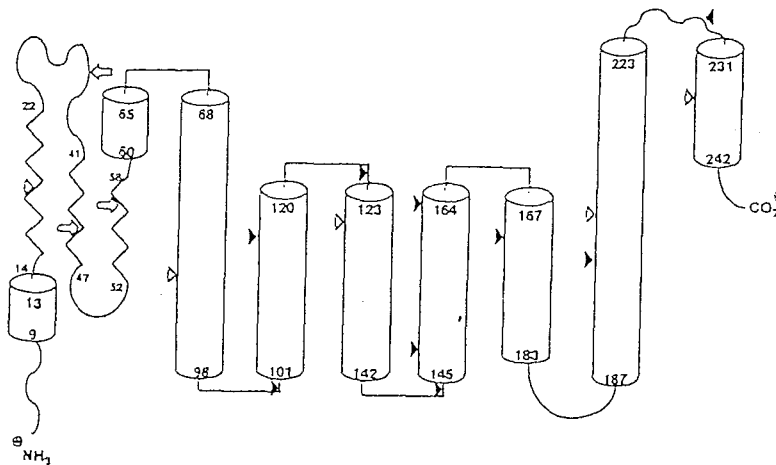


Fig. 16- Modèle de la structure de l'apoAI liant les lipides (Roberts et al, 1997). Les sites de clivage sont montrés par de triangles. Les cylindres représentent une structure hélicoïdale, les lignes en zig zag des régions hélicoïdales probables mais pas nécessaires.

### L'apolipoprotéine AI dans la maladie d'Alzheimer

L'apoAI est une des apolipoprotéines (apoE, AIV et D) qui s'accumulent dans les conditions de régénération des nerfs périphériques et centraux (Boyles et al, 1989; Goodrum, 1991). Le cholestérol provenant des cellules en dégénérescence s'accumule dans des lipoprotéines riches en apoE et AI dans les sites de régénération et sera utilisé par les cellules qui expriment des niveaux élevés de récepteurs aux LDL. Plus récemment, deux équipes (Kuriyama et al, 1994; Kawano et al, 1995) ont étudié le niveau plasmatique des apoAI et AII dans la maladie d'Alzheimer. Bien que leur étude comportait un nombre limité de patients (n=45 et 44, respectivement), ils ont montré que la concentration plasmatique de ces deux apolipoprotéines est plus faible chez les patients atteints la MA par rapport aux sujets contrôles appariés à l'âge et que cette différence est indépendante de l'âge et du sexe.

Quant à la fonction de l'apoAI dans le cerveau, une étude récente a montré la présence d'un ensemble d'apolipoprotéines (AI, AIV, D, E et J) dans un homogénat du cortex frontal des patients atteints de la MA et des sujets contrôles (Harr et al, 1996). L'étude a porté sur un nombre limité de cerveaux (11-13 dans chaque groupe) et n'a pu montrer de différence significative entre cas et témoins. Les mêmes auteurs ont montré la présence de l'apoAI dans certaines plaques séniles. Auparavant, Koudinov et ses collaborateurs (1994) ont mis en

évidence l'affinité de cette apolipoprotéine pour le peptide A $\beta$ , et d'autres travaux ont suggéré que l'apoAI pourrait jouer un rôle dans l'agrégation du peptide A $\beta$  par l'adoption d'une conformation amyloïdogénique (Wisniewski et al, 1995).

### ***IV-3. L'APOLIPOPROTEINE AIV***

Chez l'homme, l'apoAIV est associée aux lipoprotéines riches en triglycérides et aux HDL (Ohta et al, 1985) mais existe également sous forme libre. L'apoAIV est donc liée au métabolisme de ces lipoprotéines et intervient dans les échanges des apolipoprotéines entre les différentes lipoprotéines (Lagrost et al, 1989).

Plusieurs propriétés de l'apoAIV suggèrent un rôle dans le transport reverse du cholestérol : En effet, les lipoprotéines riches en apo AIV sont capables de provoquer un efflux de cholestérol contenu dans les adipocytes de rats (Steinmetz et al, 1990) et les fibroblastes, et de l'estérifier (von Eckardstein et al, 1995). Ces propriétés de l'apoAIV ont été renforcées par la mise en évidence de sa forte affinité pour la membrane des cellules hépatiques (Weinberg and Patton, 1990), selon un mécanisme saturable, réversible et spécifique. Une fonction physiologique de l'apoAIV est l'activation de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), l'enzyme responsable de la formation d'ester de cholestérol dans les HDL. Cette fonction peut être également assurée par les apo AI, CI, D et E (Mahley et al, 1984, Steinmetz et Utermann, 1985; Steyer and Kostner, 1978). De plus l'apoAIV est capable d'augmenter l'activité de la lipoprotéine lipase en présence d'apo CII (Goldberg et al, 1990), enzyme qui est responsable de l'hydrolyse des triglycérides dans les VLDL, IDL et les chylomicrons.

Un polymorphisme génétique de l'apoAIV a été mis en évidence et deux isoformes majeures à transmission autosomale codominante ont été décrites dans la population caucasienne (Menzel et al, 1988). Les deux allèles apoAIV-1 et apoAIV-2 diffèrent au niveau de la 3ème base du codon 360 (G→T) ou Gln→His. La fréquence respective de ces deux allèles dans la population lorraine a été estimée à 92% et à 8% (Zaiou et al, 1994). Certaines études génétiques de population ont montré une association de l'allèle apoAIV-2 (360:His) avec des taux de HDLs élevés (Menzel et al, 1988) et des niveaux bas de triglycérides (Eichner et al, 1989). Cette différence au niveau de la concentration des HDLs pourrait être due à une activation plus efficace de la LCAT par l'isoforme apoAIV-2 (Weinberg et al, 1990).

## **L'apolipoprotéine AIV dans la maladie d'Alzheimer**

Le rôle de l'apoAIV au niveau du cerveau a été appréhendé principalement dans un modèle animal. Certaines études ont attribué à l'apoAIV un rôle dans le processus de régénération mais également dans le développement du système nerveux central et périphérique (Boyles et al, 1989). D'autres travaux ont suggéré que l'apoAIV pourrait agir dans le SNC comme facteur de contrôle de l'appétit ou de la satiété (Fujimoto et al, 1993). Un régime hyperlipidémique chez le rat augmente non seulement la concentration plasmatique de l'apoAIV mais également celle du LCR et des injections intracisternales d'apoAIV inhibent la sécrétion de l'acide gastrique (Okumura et al, 1994). Cette apolipoprotéine est un facteur important de contrôle du comportement nutritionnel. En effet, sa perfusion dans le 3ème ventricule inhibe l'alimentation d'une manière proportionnelle à la dose perfusée (Tso et al, 1995). L'apoAIV est supposée traverser la barrière hématoencéphalique (Elhourbagy et al, 1985; Karathanasis et al, 1986), et la localisation récente de cette apolipoprotéine dans le cerveau (Herr et al, 1996) ainsi que dans le liquide céphalorachidien comme partie intégrante d'une population particulière de lipoprotéines (Borghini et al, 1995) sont en faveur d'un rôle important de cette protéine dans le SNC.

L'expression de l'apoAIV dans le cerveau des patients atteints de la MA a été récemment étudiée (Herr et al, 1996). Les variations du niveau de l'apoAIV dans le cerveau n'étaient pas significatives entre cas et témoins, ce qui nous a permis de suggérer que les variations qualitatives de l'apoAIV reflétées par son polymorphisme génétique, pourraient être plus importantes dans la physiopathologie de la MA.

### ***IV-4. LA TRANSTHYRETINE OU PREALBUMINE***

Appelée d'abord préalbumine, grâce à sa mobilité électrophorétique plus rapide que celle de l'albumine, cette protéine a ensuite été nommée transthyrétine (TTR) pour refléter son rôle de transporteur de la thyroxine, hormone thyroïdienne, et du rétinol ou vitamine A (Ferguson et al., 1975; Van Jaarsveld et al., 1973). La TTR est un tétramère de 54 845 Da formé de 4 sous-

unités de 14 kDa chacune. Elle joue un rôle majeur dans le maintien des concentrations du rétinol et de l'hormone thyroïdienne dans la circulation plasmatique (Episkopou et al., 1993). Dans certaines circonstances pathologiques liées à des mutations de la TTR, cette protéine semble s'agréger et se déposer dans différents tissus. Plus de 40 variants génétiques différents de la TTR sont associés à des dépôts amyloïdes (Saraiva, 1995). Les nerfs périphériques et le coeur sont les cibles particulières de ces dépôts, provoquant des neuropathies et des cardiomyopathies qui sont les symptômes cliniques les plus courants.

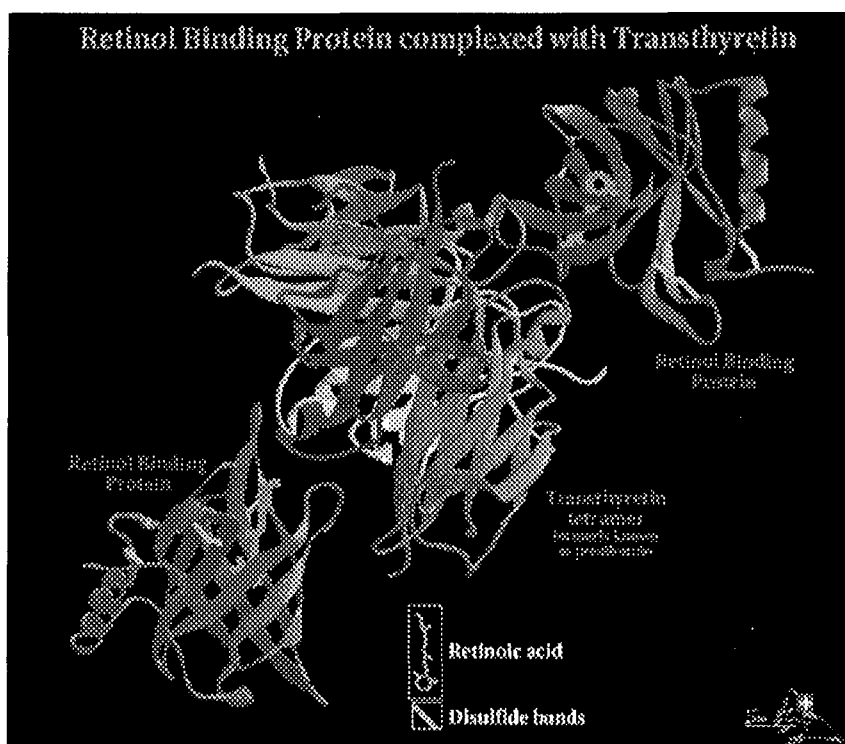
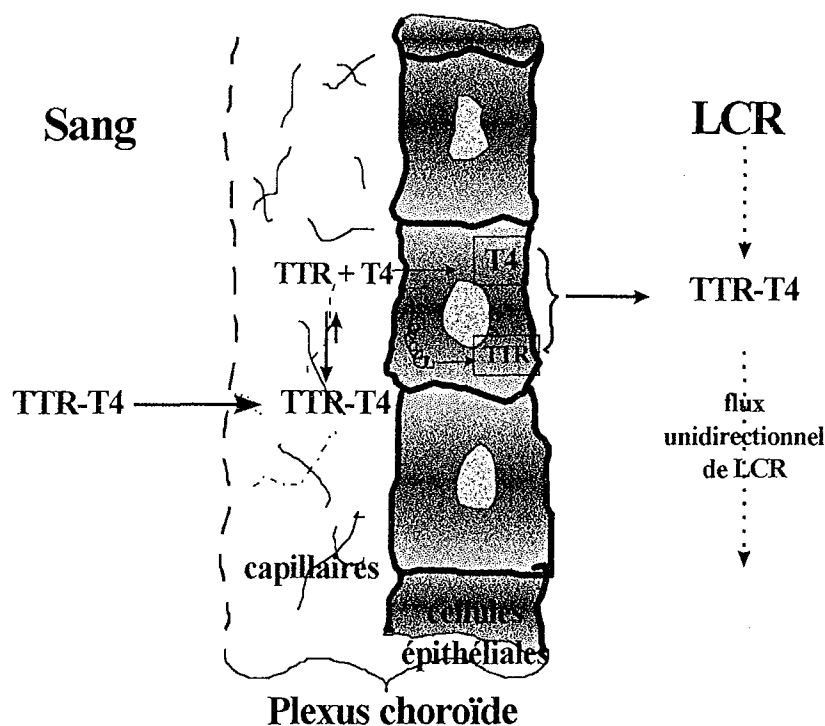


Fig. 17- Structure tridimensionnelle de la TTR complexée avec la protéine vectrice du rétinol (*retinol binding protein*)

### La transthyréline dans la maladie d'Alzheimer

La TTR représente une fraction majeure des protéines du LCR. Dans le SNC du rat et de l'homme, elle est synthétisée *de novo* par les cellules épithéliales du plexus choroïde (Hebert et al., 1986). A masse de tissu égale, les plexus choroïdes contiennent au moins 100 fois plus d'ARN de la TTR que le foie. Toutefois, la TTR est la seule protéine connue du SNC qui soit exclusivement synthétisée par le plexus choroïde. Dans le LCR, elle est la principale protéine de transport de la thyroxine. Elle transporte environ 80% du total d'hormone du LCR (Hagen and Elliott, 1973) et serait probablement impliquée dans le transport actif de la thyroxine à

partir de la circulation sanguine vers le LCR (Dickson et al, 1987; Mendel et al, 1987) (voir modèle Fig. 18). Les astrocytes pourraient être une des cibles de l'effet hormonal de la thyroxine qui semble réguler la polymérisation de l'actine du cytosquelette et les interactions entre les intégrines et la laminine. La thyroxine semble donc intervenir dans la modulation de l'organisation des microfilaments, et la régulation de la migration neuronale et les interactions cellulaires (Siegrist-Kraiser, 1990). La livraison de la thyroxine par la TTR semble être permise par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques localisés à la surface astrocytaire (Divino and Schussler, 1990b).



**Fig 18-** Modèle hypothétique de transport de la thyroxine du sang vers le LCR à travers le plexus choroïde (adapté de Dickson et al, 1987). TTR, transthyréline; CSF, liquide céphalorachidien; T4, thyroxine.

Ces propriétés de transporteur hormonal de la TTR n'ont jamais été prises en compte dans la MA. Toutefois, les propriétés de cette protéine à lier le peptide A $\beta$  ont attiré l'attention de certaines équipes de recherche sur la MA. En effet, plusieurs propriétés expérimentales de la TTR ont suggéré un important rôle protecteur de cette protéine contre la déposition du peptide A $\beta$  dans les plaques séniles, avec une possibilité d'un rôle de compétition pour l'apoE. En effet, l'ApoE se lie *in vitro* au peptide A $\beta$  avec une grande affinité (Strittmatter et al., 1993), semble promouvoir la fibrillogénèse de l'A $\beta$  et induire l'accumulation de ce peptide dans les cultures de cellules vasculaires musculaires lisses (Ma et al., 1994; Wisniewski et al., 1994;

Mazur-Koleka et al., 1995) tandis que la TTR inhibe et prévient cette formation fibrillaire (Schwarzmann et al., 1994; Mazur-Koleka et al., 1995).

Bien avant la découverte de ces propriétés de la TTR, Riisøen et al (1988) avait montré une corrélation négative entre la concentration de la TTR dans le LCR et la sévérité de la MA, estimée par un score neuropsychiatrique. Depuis, la concentration de la TTR n'a jamais été réétudiée dans le domaine de la MA.

#### *IV-5. L'ACTINE*

L'actine est une protéine qui joue un rôle important dans la structure et la mobilité cellulaire et dans la génération d'une force contractile dans les cellules musculaires et non musculaires. Trois isoformes d'actine peuvent être séparées par isoélectrofocalisation (Whalen et al, 1976) : l'isoforme  $\alpha$  trouvée dans les tissus musculaires comme constituant majeur de l'appareil contractile, les isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  qui coexistent dans la plupart des cellules non musculaires comme composants du cytosquelette et sont des médiateurs de la mobilité cellulaire interne. Les isoactines sont les produits de différents gènes et ont des séquences en aminoacides très similaires. Ces isoformes ont une expression tissu-spécifique bien conservée à travers les espèces. Toutefois la signification fonctionnelle de ces multiples actines n'est pas bien comprise en dehors des cellules musculaires.

Au niveau du cytosquelette, l'actine intervient dans la formation des fibres de « stress » (longs paquets de filaments d'actine) et du squelette membranaire qui est un réseau de protéines fibrillaires attachées à l'intérieur de la membrane plasmique. L'actine se trouve dans un état d'équilibre entre une forme globulaire soluble (G) et une forme fibrillaire (F) insoluble. L'équilibre entre ces deux formes est étroitement contrôlé par les cellules qui peuvent modifier l'équilibre entre l'assemblage et le désassemblage en réponse à de nombreuses sollicitations physiologiques, notamment lors d'interactions avec des facteurs de croissance et des hormones. Par exemple, l'équilibre semble être influencé par la présence de la thyroxine (T4) dans les cultures astrocytaires (Siegrist-Kraiser et al, 1990). En effet, en absence de cet hormone, une désorganisation des filaments d'actine est observée en faveur de la forme soluble. Certaines substances comme la cytochalasine B sont capables d'inhiber la polymérisation de l'actine en se liant aux filaments d'actine. Plusieurs autres facteurs



extracellulaires sont capables de provoquer un changement de l'organisation cytosquelettale de l'actine comme les facteurs de croissance (EGF, PDGF, FGFb), l'insuline et la thrombine (Ridley and Hall A, 1992; Ridley et al, 1992).

### **L'actine dans la maladie d'Alzheimer**

Les études du rôle de l'actine dans la maladie d'Alzheimer sont peu nombreuses. Jabbour et ses collaborateurs (1992) ont rapporté une expression anormale d'actine dans les lymphocytes des patients atteints de la MA ainsi que chez les patients trisomiques. Plus récemment, Mattila and Frey (1995) ont trouvé une diminution quantitative de l'actine dans les plaquettes et les lymphocytes des patients atteints de la MA. Les auteurs apportent des preuves concernant des changements liés à la MA à l'extérieur du SNC et renforcent l'hypothèse de la nature systémique de cette maladie.

## V- LES AUTRES MARQUEURS BIOCHIMIQUES DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN PROPOSES DANS LA LITTERATURE

La concentration de certaines substances dans le LCR qui ne traversent ni la barrière hémocéphalique ni la barrière hémomeningée peut être considérée comme fonction de leur concentration dans le liquide interstitiel du SNC. Beaucoup de travaux relatent les anomalies de la composition du LCR comme reflet du métabolisme cérébral lié au développement de la MA. Plusieurs hypothèses physiopathologiques de la MA, notamment l'inflammation et l'oxydation, ont été analysées à travers des marqueurs spécifiques mesurés dans le LCR. Beaucoup de travaux ont recherché les variations pathologiques des composants des plaques séniles et des lésions neurofibrillaires, d'autres celles des systèmes de transmission et fonctionnement synaptique.

Dans cette partie, les marqueurs étudiés dans le LCR et décrits dans la littérature sont présentés sous forme d'une liste (voir tableau) afin de montrer la diversité de ces substances et les éventuelles difficultés méthodologiques à reproduire certains résultats.

**Tableau 3-** Les marqueurs étudiés dans le liquide céphalorachidien en relation avec la maladie d'Alzheimer

Marqueurs mesurés dans le LCR	Variations observées avec la MA	Références
<b>Neurotransmetteurs</b>		
Acétylcholine	diminué	Davis et al, 1985
	augmenté	Elble et al, 1989
Choline	augmenté	Kumar et al, 1989
Acide homovanilique (HVA)	diminué	Beal et al, 1986
		Atack, 1989
		Kawakatsu et al, 1990
		Prior et al, 1991
		Parnetti et al, 1992
		Blenow et al, 1992a
Chromogranine A	invariable	O'Connor et al, 1993
Norépinéphrine	augmenté	Elrod et al, 1997
3-méthoxy-4-hydroxy-phényl-glycol (MHPG)	diminué	Brane et al, 1989
		Martignoni et al, 1992
	invariable	Beal et al, 1986
		Atack, 1989
		Parnetti et al, 1992
Acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA)	diminué	Brane et al, 1989
		Fukuda et al, 1989
		Kawakatsu et al, 1990
		Prior et al, 1991
		Tohgi et al, 1992
	invariable	Atack, 1989
		Beal et al, 1986
		Blennow et al, 1992a
Somatostatine (SST)	diminué	Bissette et al, 1992
		Hartikainen et al, 1992
		Strittmatter et al, 1997
Acide $\gamma$ -aminobutyrique (GABA)	diminué	Beal et al, 1986
Vasopressine	diminué	Edvinsson et al, 1993
		Jolkkonen et al, 1989
		North et al, 1992
Endothéline-1 (ET-1)	diminué	Yoshizawa et al, 1992
<b>Protéines et constituants neuronaux</b>		
Chromogranine	invariable (LAD)	Blennow et al, 1995
Synaptotagmine	diminué (EAD)	Davidsson et al, 1996
Laminine	invariable	Kittur et al, 1993
Ganglioside	augmenté (EAD)	Blennow et al, 1992b

Tableau 3 (suite 1)

Marqueurs mesurés dans le LCR (Suite)	Variations observées avec la MA	Références
<b>Systèmes enzymatiques</b>		
Glutamine synthase (présence : '+')	'+' 38/39 MA	Gunnensen et al, 1992
Aspartate aminotransférase	'+' 1/44 témoin augmenté	Riemenschneider et al, 1997
Activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine	invariable	Konings et al, 1993
Cholinestérase	diminué	Kawakatsu et al, 1990
Cathepsine D	augmenté	Schwagerl et al, 1995
Enolase spécifique des neurones (NSE)	augmenté	Roydes et al, 1983 Blennow et al, 1990
	invariable	Sulkava et al, 1988 Pauwels et al, 1993
$\alpha$ 1-antichymotrypsine	augmenté	Matsubara et al, 1989 Matsubara et al, 1990 Shinohara et al, 1991 Alstiel et al, 1992 Brugge et al, 1992 Harigaya et al, 1995 Licastro et al, 1995
	invariable	Delamarche et al, 1991 Furby et al, 1991 Tintner et al, 1992 Pirtilla et al, 1994b
Ubiquitine	augmenté	Manaka et al, 1992 Blennow et al, 1994a Kudo et al, 1994
<b>Protéine tau</b>	augmenté	Hock et al, 1995 Jensen et al, 1995 Arai et al, 1995 Munroe et al, 1995 Vigo-Pelfrey et al, 1995 Rösler et al, 1996 Riemenschneider et al, 1997
<b>Constituants des plaques séniles</b>		
Précurseur de la protéine amyloïde (APP)	diminué	Henriksson et al, 1991 Prior et al, 1991 Farlow et al, 1992 van Nostrand et al, 1992
	augmenté	Weidemann et al, 1989 Urakami et al, 1992
	invariable	Chong et al, 1990 Henriksson et al, 1991
Protéine $\beta$ amyloïde (A $\beta$ ) totale	augmenté	Nakamura et al, 1994
	invariable	Van Gool et al, 1995 Southwick et al, 1996
A $\beta$ -42	invariable	Tabaton et al, 1994
	diminué	Pirtillä et al, 1994a Motter et al, 1995

Tableau 3 (suite 2)

Marqueurs mesurés dans le LCR (suite)	Variations observées avec la MA	Références
Apolipoprotéine J (apo J) Apolipoprotéine E (apoE)	augmenté invariable	Choi-Miura et al, 1992 Rösler et al, 1996 Hahne et al, 1997 Lefranc et al, 1997
	diminué	Blennow et al, 1994b Pirttilä et al, 1994c
	augmenté	Merched et al, 1997 Lindh et al, 1997 Song et al, 1997
Composant P amyloïde sérique (SAP) $\beta$ 2-microglobuline	augmenté augmenté	Hawkins et al, 1994 Martinez et al, 1993
<b>Protéines de la réaction inflammatoire</b>		
Interleukine-1 $\beta$ (II- $\beta$ )	augmenté	Cacabelos et al, 1991 Blum-Gegen et al, 1995
	invariable	Pirtilla et al, 1994b Martinez et al, 1993
Interleukine-2 (II-2)	invariable	Blum-Gegen et al, 1995
Interleukine-6 (II-6)	augmenté invariable	Blum-Gegen et al, 1995 Kalman et al, 1997 Hampel et al, 1997
<b>Systèmes d'oxydation / antioxydation</b>		
Ascorbate	invariable	Paraskevas et al, 1997
Superoxyde dismutase	invariable	Bracco et al, 1991 Urakami et al, 1995
Ferritine	invariable augmenté	Keir et al, 1993 Kuiper et al, 1994a
<b>Facteurs de croissance</b>		
Insuline-like growth factor 1 (IGF1)	invariable	Tham et al, 1993
Insuline-like growth factor 2 (IGF-2)	augmenté	Tham et al, 1993
<b>Eléments et minéraux</b>		
Nitrate	diminué	Kuiper et al, 1994b
Cadmium	diminué	Basun et al, 1991
Calcium	diminué	Basun et al, 1991 Subhash et al, 1991
Phosphore	diminué	Subhash et al, 1991

EOD: forme précoce de la MA, LOD: forme tardive de la MA

L'intérêt de l'étude de tous ces marqueurs est d'apporter des informations étiopathologiques importantes concernant la MA. Toutefois, ce qui ressort généralement de ces études est l'absence d'une concordance ferme entre les différentes équipes pour certains marqueurs. Bien que les différences entre les groupes de malades et les contrôles soient significatives pour

certaines marqueurs, ces résultats ne permettent pas de contribuer au diagnostic individuel de la MA en absence d'une spécificité et d'une sensibilité acceptables. A noter l'exemple de la protéine tau qui semble être diminuée dans le LCR des patients atteints de la MA. Ces résultats sont démontrés par plusieurs équipes indépendantes (Hock et al, 1995; Jensen et al, 1995; Arai et al, 1995; Munroe et al, 1995; Vigo et al, 1995; Rösler et al, 1996; Riemenschneider et al, 1997). Néanmoins, ces diminutions de la protéine tau dans le LCR ne sont pas spécifiques de la MA et peuvent être rencontrées dans d'autres maladies neurologiques chroniques ou aiguës, comme l'encéphalite, l'ischémie cérébrale, la dépression, le SIDA et les atteintes des neurones moteurs (Arai et al, 1995; Motter et al, 1995 ; Rösler et al, 1996). En revanche, pour le diagnostic futur, la protéine tau dans le LCR reste un marqueur prometteur en combinaison avec d'autres marqueurs.

Ainsi, l'approche par la recherche d'un seul marqueur ne semble-t-elle pas être la meilleure dans une optique de diagnostic et seule l'utilisation de plusieurs marqueurs peut permettre d'atteindre cet objectif, comme cela a été montré très récemment par la combinaison de la protéine tau et de l'aspartate aminotransférase (Riemenschneider et al, 1997). Les auteurs montrent que la combinaison de ces deux marqueurs augmente la spécificité d'un diagnostic différentiel de la MA de 50% (avec la protéine tau seule) à 83% en utilisant les deux marqueurs.

*TRAVAUX REALISES*

---

## **TRAVAUX REALISES**

---

### **Marqueurs du liquide céphalorachidien**

**I- Etude approfondie des variations physiologiques et pathologiques de la concentration de l'apolipoprotéine E dans le liquide céphalorachidien.**

*page 53-64*

**II- Association de l'apolipoprotéine E avec l'apolipoprotéine D, la transthyréine et l'actine dans le liquide céphalorachidien.**

*page 65-76*

### **Marqueurs génétiques et plasmatiques**

**III- Etude des gènes candidats du métabolisme lipidique dans la maladie d'Alzheimer : les apolipoprotéine AI et AIV**

*page 77-89*

### **Etudes cellulaires**

**IV- Etudes préliminaires de l'affinité des apolipoprotéines E au récepteur humain des VLDL transfecté dans des cellules CHO**

*page 90-96*



## **I- Etude approfondie des variations physiologiques et pathologiques de la concentration de l'apolipoprotéine E dans le liquide céphalorachidien.**

L'objectif de cette partie du travail est d'évaluer l'intérêt de la mesure de la concentration de l'apoE dans le LCR et de son génotypage dans le diagnostic et la physiopathologie de la MA. Nous avons d'abord examiné l'évolution de cette concentration avec l'âge, facteur de risque le plus important de la MA. Ensuite, nous avons comparé les variations de la concentration de l'apoE chez des patients atteints de la MA par rapport à deux groupes de contrôles; un groupe de sujets exempts de toute maladie neurologique et inflammatoire et le second groupe composé de patients souffrant de diverses atteintes neurologiques et inflammatoires autres que la MA.

### ***1.1- Matériels et méthodes***

#### **1.1.1- Patients**

L'effet de l'âge sur la concentration de l'apoE dans le LCR a été étudié dans un groupe témoin de 40 individus (18 hommes, 22 femmes, moyenne d'âge  $60,52 \pm 16,56$  ans, 26-89 ans) sans symptôme ou signe en faveur d'une pathologie du système nerveux central ou périphérique et sans anomalie dans la composition cytochimique du LCR (bilan de fièvre ou d'extension de lymphomes).

L'étude clinique de la concentration de l'apoE comportait 116 LCR provenant de patients atteints de la MA (38), de sujets contrôles âgés exempts de toute maladie neurologique ou inflammatoire (31) et de patients atteints d'autres pathologies que la MA (47). Les échantillons de LCR ont été obtenus par ponction lombaire, recueillis dans plusieurs unités hospitalières de neurologie ou de gériatrie incluant le service de Médecine B de CHU Nancy, neurochirurgie de l'hôpital Saint-Julien et gérontologie de Mont Saint Martin. Les informations physiologiques et cliniques sont exposées dans le tableau 4:

**Tableau 4-** Caractéristiques principales des patients

	Malades d'Alzheimer	Témoins sains	Contrôles neurologiques
n (M%/F%)	38 (39 / 61)	31 (39 / 61)	47 (53 / 47)
Age (ans)	75,4±9,9 <sup>(1)</sup>	67,4±11,0*	64,3±13,0**
MMS (Folstein et al, 1975)	10,71±7,30	>28	>28

\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  par rapport au groupe de MA

Le diagnostic clinique de MA probable a été établi selon les critères NINCDS ADRDA (National Institutes of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, McKhann et al, 1984). Seuls les patients présentant un score MMS (Mini-Mental State, Folstein et al, 1975) inférieur à 25 ont été inclus dans l'étude.

Le groupe des sujets «témoins sains» est composé de sujets ayant bénéficié d'une ponction lombaire dans le cadre du bilan diagnostique d'une fièvre ou d'extension d'un lymphome.

Le groupe «contrôle neurologique» comporte des patients porteurs de pathologies neurologiques autres que la MA : 7 cas d'accident vasculaire cérébral (AVC) ( $70,4 \pm 13,2$  ans), 10 cas d'atteinte du système nerveux périphérique (SNP) ( $58,4 \pm 13,6$  ans), 10 patients avec une méningoencéphalite (ME) ( $65,6 \pm 12$  ans) et 20 patients avec une pathologie disco-vertébrale (CDV) ( $64,3 \pm 12,9$  ans).

### I.1.2- Analyses biochimiques et génétiques

Le LCR obtenu par ponction lombaire a été analysé (concentration des protéines, teneur en glucose, cytologie) et distribué en aliquots de 200  $\mu$ l dans l'azote liquide. L'ADN des cellules nucléées sanguines a été isolé par la technique de Miller (Miller et al, 1988). Le génotypage de l'apoE a été réalisé après PCR spécifique des sites polymorphiques de l'apoE et digestion enzymatique par l'enzyme HhaI (Hixon et al, 1990). Le phénotypage de l'apoE a été réalisé sur les protéines du LCR par électrophorèse bidimensionnelle.

### ***I.1.2.1- Electrophorèse bidimensionnelle***

**Préparation de l'échantillon :** 50 µl de LCR non concentré sont dénaturés par l'ajout de 50µl de la solution *SDS-mix* (contenant 2% de SDS (Biowhittaker, Paris, France), 5% de mercaptoéthanol (Bio-Rad, Paris, France), et 10% de glycerol (Prolabo, Paris, France)) et le mélange est chauffé à 95°C pendant 3 minutes. Les protéines sont séparées par la technique d'électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) à l'aide du système ISO-DALT (Anderson and Anderson, 1977), avec le protocole modifié suivant :

**L'isoélectrofocalisation (IEF)** a été réalisée avec le système ISO (Electro-Nucleonics, TN, USA). La solution du gel d'IEF contient dans 15 ml les produits suivants: urée (Bio-Rad), 8.25 g; ampholytes (Pharmacia/LKB, Uppsala, Sweden), 1.25 ml (500µl de Pharmalyte à pH 3.5-9.5, 300µl à pH 8-10.5, 150µl à pH 2.5-5, 150µl à pH 5-7, 150µl à pH 4-6); acrylamide-bisacrylamide (30%/1.8%), 2 ml; et eau nanopure, 5.71 ml. L'urée est dissoute manuellement en chauffant et en agitant la solution. Après dégazage de la solution, les produits suivants sont ajoutés : 0.3 ml du nonidet P-40 (Sigma, Paris France), 50 µl de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) à 10 % préparé extemporanément, et 7 µl du TEMED (Bio-Rad).

Les tubes capillaires (diamètre : 1.5 mm, longueur : 18 cm) sont remplis de cette solution et laissés pendant 2 heures jusqu'à polymérisation. Une étape de préfocalisation pendant 2 à 3 heures à 200 V est nécessaire avant l'IEF proprement dite qui se déroule pendant 17 heures à 1200V suivies d'une heure à 1500V. Ces migrations se font dans une solution basique de soude (1M) comme tampon cathodique, et une solution d'acide phosphorique (0.085%) comme tampon anodique.

Les gels capillaires sont extraits et mis pendant 5 à 10 min, dans un tampon d'équilibration (10% de glycérol, DTE (Dithioérythritol) à 6 mM (Bio-Rad), 2% de SDS, tris-base à 0.125M, et une pointe de bleu de bromophénol, le pH est ajusté à 6.8 avec de l'acide chloridrique à 6N, et la solution est conservée à 4°C). Alternativement, les gels capillaires peuvent être conservés dans le tampon d'équilibration pendant plusieurs semaines à -20°C.

**La 2ème dimension :** les gels capillaires sont déposés à la surface des gels en plaque (système DALT, Electro-Nucleonics, TN, USA) en gradient (10% à 20 %, T=10.05%, C=2.5% et

T=20.22%, C=2.5% respectivement). Afin d'éviter la coloration négative des protéines et d'optimiser la reproductibilité de la coloration, nous avons ajouté dans la composition du gel de 2ème dimension du thiosulfate de sodium à 5mM (Hochstrasser et al, 1988). La migration se déroule pendant environ 4 heures à 400V pour 10 gels à la fois. Ensuite, les gels peuvent être colorés au bleu de Coomassie, à l'argent (voir paragraphe suivant) ou préparés pour autres analyses et détections spécifiques (électrotransfert et immunodétections).

### *1.1.2.2- Coloration argentique*

Nous avons adapté la coloration argentique décrite par Rabillou et ses collaborateurs (Rabillou, 1992), dont le protocole comporte les étapes suivantes:

**Fixation** des gels de la 2ème dimension pendant 4x30 minutes dans une solution contenant 10% d'acide acétique et 30% d'éthanol.

**Sensibilisation** pendant la nuit dans une solution contenant de l'acétate de potassium (0,5 M), du tétrathionate de potassium (2,5 g/l), du glutaraldehyde (0,5%) et de l'éthanol (20%).

**Lavage** de 6x20 minutes avec de l'eau distillée

**Bain argentique** contenant du nitrate d'argent (12 mM ou 0,2%), du formaldéhyde 37% (600 µl/l) et du sel HEPES hémisodique (5 mM) pendant 1 à 2 heures et rinçage de 5 à 15 secondes à l'eau

**Développement** dans une solution contenant du carbonate de potassium (3%), du formaldéhyde 37% (250-300 ml/l) et du pentahydrate de thiosulfate de sodium (10%).

**Arrêt du développement** dans une solution contenant de l'acide acétique (2,5%) et du tris (5%).

### *1.1.2.3- Mesure de la concentration de l'apolipoprotéine E*

La mesure de la concentration de l'apoE dans le LCR a été réalisée par une méthode ELISA (GaE/E de LM Havekes, Leiden, Hollande) (voir publication N°1) et vérifié indépendamment par turbidimétrie (Daiichi Pure Chemical, Tokyo, Japon) en utilisant l'appareil Cobas Mira (Roche, Neuilly-sur-Seine, France).

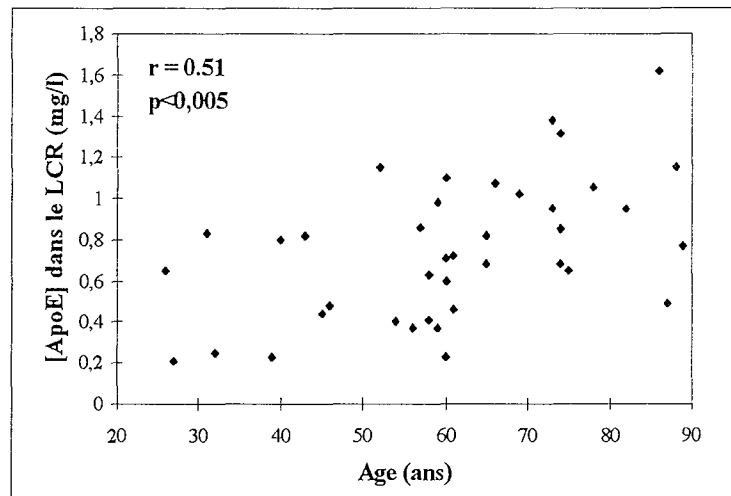
### I.1.3- Analyses statistiques

L'évolution de l'apoE avec l'âge a été étudiée par régression linéaire. Le test de *t* a été utilisé afin de comparer les concentrations protéiques moyennes brutes ou ajustées à l'âge et au sexe entre les différents groupes. Les analyses sur les sous-groupes de faibles effectifs ont été réalisées par la méthode non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Les fréquences alléliques ont été comparées en utilisant le test de  $\chi^2$ . Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel statistique *BMDP*<sup>®</sup> (Los Angeles, USA).

### I.2-Résultats

#### I.2.1- La concentration de l'apoE dans le LCR augmente avec l'âge

L'analyse de l'effet de l'âge a montré une augmentation significative (fig. 19) de la concentration de l'apoE dans le LCR des sujets indemnes de toute maladie ou symptôme psychiatrique ( $r = 0,51$ ;  $p < 0,005$ ). Le rapport de cette concentration au protéino-arachie suit la même tendance significative ( $r = 0,38$ ;  $p < 0,01$ ). Ces évolutions ne sont influencées ni par le sexe ni par le polymorphisme de l'apoE.



**Fig. 19-** Evolution de la concentration de l'apoE dans le LCR avec l'âge chez des sujets contrôles. Le coefficient de corrélation ( $r$ ) et sa significativité ( $p$ ) sont présentés

### I.2.2- La concentration de l'apoE dans le LCR augmente avec la maladie d'Alzheimer

Le tableau 5 montre les caractéristiques des patients et des témoins et contrôles inclus dans l'étude. Les patients présentant une MA sont plus âgés que les patients témoins et que les contrôles neurologiques ( $p < 0,05\%$  et  $0,01\%$  respectivement).

Avant ou après ajustement sur l'âge et le sexe, la concentration de l'apoE dans le LCR chez les patients présentant une MA est plus élevée que celle des contrôles neurologiques ( $2,07 \pm 0,80$  mg/l vs  $1,57 \pm 0,67$  mg/l,  $p < 0,01$ ), qui ont une concentration d'apoE plus élevée que les témoins sains ( $0,85 \pm 0,4$  mg/l  $p < 0,0001$  (Fig. 20). Utilisant le rapport apoE/protéinorachie totale du LCR, nous n'avons observé une différence significative qu'entre le groupe Alzheimer et témoins sains.

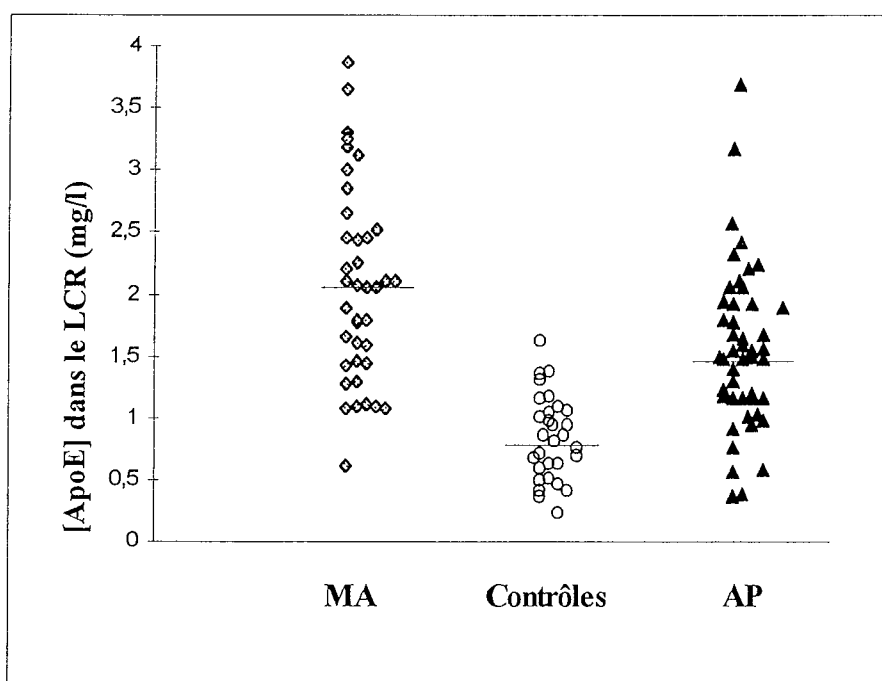


Fig. 20- concentration de l'apoE dans le LCR des groupes étudiés. MA : maladie d'Alzheimer, AP : autres pathologies.

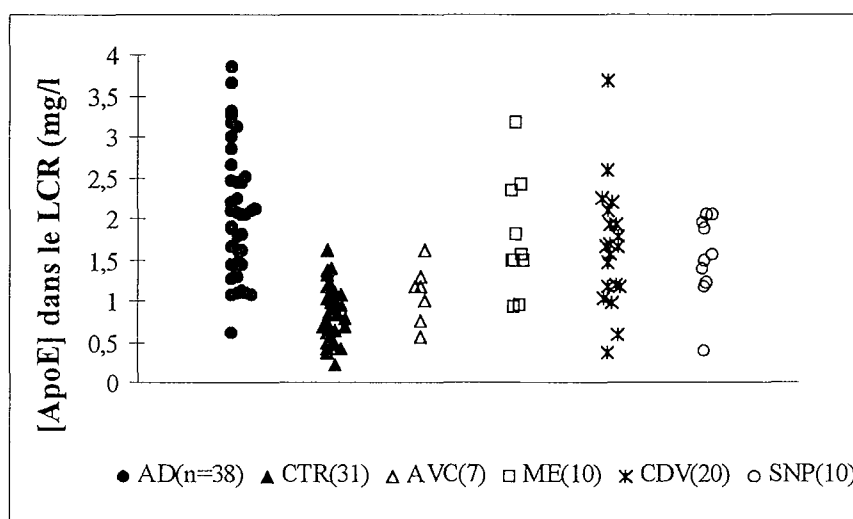
### I.2.3- La concentration de l'apoE dans le LCR varie avec la nature des atteintes du SNC

En sous-groupant les patients présentant une atteinte neurologique en fonction du type de pathologie (Fig. 21), nous avons observé des concentrations comparables chez les témoins sains et les sujets présentant un accident vasculaire cérébral (AVC) et chez les MA et les patients présentant des atteintes du système neuronal périphérique (SNP), des pathologies discovertébrales (CDV) ou une méningoencéphalites (ME). Les groupes SNP, CDV et ME ont des concentrations significativement plus élevées en apoE dans le LCR que les patients du groupe témoins sains ( $p < 0,05$ ; tableau 5).

**Tableau 5-** Concentrations moyennes de l'apoE dans de LCR de différents groupes de pathologies.

	MA	Contrôles	AVC	SNP	CDV	ME
n	38	31	7	10	20	10
[apoE] dans le LCR (mg/l)	2.07±0.80	0.80±0.34	1.08±0.34	1.55±0.51	1.66±0.76	1.76±0.70
( $p < 0,05$ )	-----		-----		-----	
	-----			-----		
	-----					

MA: maladie d'Alzheimer, AVC: accidents vasculaires cérébraux, SNP: atteintes du système nerveux périphérique, ME: méningoencéphalites, CDV: pathologies discovertébrales. Les barres représentent des différences significatives entre les groupes. \* moyenne±SD



**Fig. 22-** Analyse de la spécificité de la variation de la concentration de l'apoE. Abréviations : idem tableau 5.

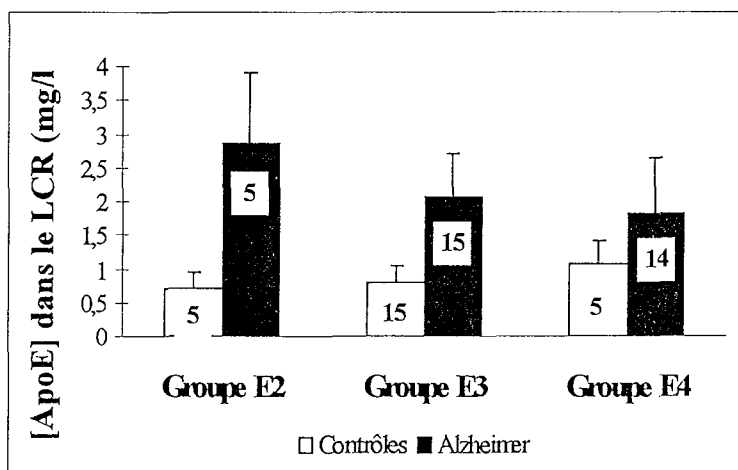
### I.2.4- Effet du polymorphisme de l'apoE sur sa concentration dans le LCR

Nos résultats concernant la fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  dans le groupe Alzheimer (Tableau 6) sont en accord avec les observations préalables (Lucotte et al, 1993, voir Siest et al, 1996). Nous avons rassemblé les patients en trois groupes alléliques groupe  $\epsilon 2$  (génotype  $\epsilon 2\epsilon 2$  -  $\epsilon 2\epsilon 3$ ), groupe  $\epsilon 3$  (génotype  $\epsilon 3\epsilon 3$ ) et groupe  $\epsilon 4$  (génotype  $\epsilon 3\epsilon 4$ ,  $\epsilon 4\epsilon 4$ ). Les patients présentant le phénotype  $\epsilon 2\epsilon 4$  ont été exclus. Le polymorphisme de l'apoE n'agit pas sur la concentration de l'apoE dans le LCR du groupe témoins sains. Dans le groupe Alzheimer, les concentrations d'apoE semblent présenter une diminution en fonction du groupe allélique ( $\epsilon 4 < \epsilon 3 < \epsilon 2$ ) ( $p=0,068$ ; Fig. 23).

**Tableau 6-** Fréquences allélique de l'apoE chez les malades alzheimeriens et les sujets contrôles

	Groupe MA *	Groupe Contrôle *
n	37	25
ApoE4	35%	9,4%
ApoE3	59%	75%
ApoE2	6%	15,6%

\*  $p < 0.01$  ( $\chi^2 = 11,884$ ), différence entre le groupe de MA et les contrôles



**Fig. 23-** Variation de la concentration de l'apoE dans le LCR des patients MA et des contrôles en fonction des groupes alléliques d'apoE. Le nombre de patients par groupe est présenté.

Le niveau de l'apoE dans le LCR des patients MA pour chaque groupe allélique est plus élevé que dans les groupes alléliques respectifs des témoins sains. Toutefois, La concentration d'apoE dans le LCR ne varie pas en fonction du nombre d'allèles  $\epsilon 4$  (résultats non montrés).



### **1.3- Discussion et conclusion**

A notre connaissance, nos résultats concernant l'augmentation de la concentration de l'apoE avec l'âge dans une population comportant des sujets âgés, sont les premières décrites dans la littérature. Etant donné que le passage de l'apoE à travers la barrière hématoencéphalique est très limité (Martel et al, 1997), ce résultat est en faveur d'une augmentation de la synthèse locale pouvant refléter la dégénérescence neuronale physiologique liée à l'âge. Alternativement, une anomalie dans le métabolisme des lipoprotéines contenant l'apoE n'est pas exclue. Toutefois, d'après la littérature de la MA, les lésions neuronales semblent coïncider avec une augmentation de synthèse d'apoE dans le cerveau, probablement afin d'induire une synaptogenèse active et compensatrice (Diedrich et al, 1991; Yamada et al, 1995).

Cette information est importante pour plusieurs raisons. D'une part, du point de vue physiologique, ces données décrivent l'augmentation de la concentration d'une protéine dans l'environnement du SNC avec le vieillissement, facteur de risque le plus important de la MA. Cette protéine se trouve dans les dépôts amyloïdes du cerveau des patients atteints de la MA. D'autre part, sur le plan méthodologique, ces résultats mettent en évidence l'importance de tenir compte de l'âge comme variable concomitante dans les études épidémiologiques et cliniques qui sont nombreuses dans ce domaine.

La fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  dans la MA est comparable à la plupart des études récentes (Poirier et al, 1993; Kuusisto et al, 1994; Yoshizawa et al, 1994; voir revue Siest et al, 1995). La concentration élevée de l'apoE dans le LCR des patients MA trouvée dans notre étude confirme l'augmentation de la concentration de l'ARNm codant pour l'apoE dans le cerveau des patients MA par rapport aux témoins (Diedrich et al, 1991; Yamada et al, 1995). Nous confirmons la présence de concentrations élevées d'apoE dans le LCR des patients neurologiques comparés aux patients témoins (Carlsson et al, 1991) (Tableau 7).

**Tableau 7-** Résumé des résultats publiés concernant la concentration de l'apoE dans le LCR

	Méthodes	MA	Contrôles	Autres pathologies
Rifai et al (1987)	Immunoturbidimétrie	ND	1,4 ± 0,5 (n=26)	1,63 ± 0,6 <sup>a</sup> (n=33)
Carlsson et al (1991)	ELISA	ND	5,9 ± 1,6 (n=64)	7,4 ± 3,1 ** (n=483)
Pirttilä et al (1994c)	ELISA	4,93 ± 2,2* (n=69)	5,58 ± 1,7 (n=71)	
Blennow et al (1994b)	ELISA	1,5 ± 1,2*** (n=11)	5,0 ± 2,7 (n=10)	3,1 ± 1,5 <sup>b</sup> * (n=10)
Gaillard et al (1995)	TR-IFMA <sup>†</sup>	ND	5,5 ± 1,1 (n=10)	3,4 ± 2,3 <sup>a</sup> *** (n=29)
Rösler et al (1996)	ELISA	1,49 ± 0,07 (n=16)	1,68 ± 0,14 (n=10)	1,60 ± 0,11 (n=20)
Lefranc et al (1996)	ELISA	3,65 ± 1,52 (n=49)	4,16 ± 2,24 (n=18)	3,44 ± 1,33 (n=55)
Hahne et al (1997)	immuno-révélation	~ 7,0 (n=14)	7,0 ± 2,4 (n=12)	ND
Nos résultats	ELISA	2,07 ± 0,80*** (n=38)	0,80 ± 0,34 (n=31)	1,57 ± 0,67*** (n=47)
Lindh et al (1997)	ELISA	4,66 ± 1,96*** (n=18)	1,92 ± 1,49 (n=27)	5,76 ± 2,93 <sup>o</sup> *** (n=9)
Song et al (1997)	ELISA	5,90 ± 1,94** LOAD (n=15)	4,16 ± 1,69 (n=23)	
		2,65 ± 1,69 * EOAD (n=11)	idem	

<sup>a</sup> patients atteints d'une sclérose multiple, <sup>b</sup> démence du lobe frontal, <sup>o</sup> autres types de démence

<sup>†</sup> immunofluorimétrie par temps retardé, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  par rapport aux contrôles

ND: non déterminé, LOAD : MA à début tardif, EOAD : MA à début précoce

Nos résultats corroborent certaines études qui ont montré une augmentation de la production d'apoE après une altération neuronale (Mahley, 1988; Poirier et al, 1993).

Certaines études (Blennow et al, 1994b; Pirtilla et al, 1994c; Lehtimaki et al, 1995) ont observé que la concentration d'apoE dans le LCR est plus faible chez les patients MA par rapport aux contrôles. Une étude plus récente (Rösler et al, 1996) n'a pas montré de différence (Tableau 7). Ces discordances sont probablement imputables à des différences

méthodologiques (Tableau 7), en particulier des critères de sélection des patients contrôles et/ou par l'hétérogénéité des patients du groupe Alzheimer. Une erreur quant aux dosages semble pouvoir être éliminée par notre étude puisque nos résultats par méthode ELISA ont été confirmés par une méthode immunoturbidimétrique. Les sujets contrôles des autres études sont différents de ceux de notre étude (céphalées, syndromes cervicaux, migraines, désordres psychosomatiques, polyneuropathie, maladie de Parkinson, tumeur cérébrale, infarctus cérébral) et aucune analyse spécifique pour chaque sous-groupe n'a été réalisée (Lehtimaki et al, 1995).

Notre groupe de patients atteints de la MA comporte moins de patients présentant l'allèle  $\epsilon 4$  que le groupe de Lehtimaki (0,35 vs 0,55), or nos résultats montrent une tendance à la diminution des concentrations d'apoE chez les patients Alzheimer présentant l'allèle  $\epsilon 4$ . La concentration élevée de l'apoE en cas de MA ou d'autres pathologies telles qu'une ME, une SNP ou des CDV pourrait refléter un état inflammatoire et/ou l'altération neuronale commun(e) à ces pathologies. La concentration élevée d'apoE trouvée également dans le plasma des patients présentant des CDV et une SNP (VanderPutten et al, 1993; Ikeda et al, 1993; Cameron et al, 1995) est corrélée à l'état inflammatoire chronique et/ou à la régénération nerveuse chez ces patients.

Après la publication de ces résultats, deux publications ont confirmé nos résultats (Song H et al, 1997; Lindh et al, 1997) en apportant deux informations complémentaires importantes. La concentration de l'apoE dans le LCR est non seulement plus importante par rapport à celle des sujets contrôles mais, de plus, elle augmente avec l'avancement et le stade de la maladie (Lindh et al, 1997). D'autre part, cette concentration est plus élevée dans la forme tardive de la MA mais plus basse dans la forme précoce par rapport à celle du groupe contrôle (Song H et al, 1997).

A la lumière de toutes ces données, nous proposons plusieurs hypothèses afin d'expliquer les divergences entre les différentes études dont les résultats pourraient dépendre de :

- 1- La nature du groupe contrôle, vu les valeurs élevées obtenues avec les maladies neurologiques et inflammatoires (Merched et al, 1996; Carlsson et al, 1991).
- 2- Le stade de la MA, étant donné l'augmentation de la concentration de l'apoE à des stades plus tardifs (Lindh et al, 1997).
- 3- La nature (précoce ou tardive) de la MA, sachant que l'on observe une augmentation de l'apoE en présence d'une forme tardive et une diminution en présence d'une forme précoce de la MA (Song H et al, 1997).

4- Le polymorphisme génétique de l'apoE des patients qui pourrait influencer directement ou indirectement la gravité de la maladie (Merched et al, 1996).

5- L'âge des patients qui pourrait influencer la concentration de l'apoE dans le LCR (Blain et al, 1997).

Sur la base des travaux concernant l'effet de l'apoE sur la régénération du nerf périphérique (Handelmann et al, 1992; Poirier et al, 1993), nous proposons l'hypothèse selon laquelle l'apoE pourrait être un marqueur des lésions neuronales ou d'un processus inflammatoire du système nerveux central et un élément protecteur contre la progression des lésions neuronales qui apparaissent lors de différentes pathologies du système nerveux central. Ce rôle protecteur, via la redistribution locale des lipides provenant de la destruction des neurones, dépendrait d'un certain nombre de récepteurs spécifiques tels que les récepteurs LDLR, VLDLR ou LRP (Rebeck et al, 1993; Tooyama et al, 1993; Okuizumi et al, 1995). Par ailleurs, nous avons montré *in vivo* qu'en plus du génotype de l'apoE, le contenu en apoE du VLDL est un déterminant important des propriétés de liaison aux récepteurs du VLDL (Bohnet et al, 1996). Le lien étroit qui unit l'allèle  $\epsilon 4$  (Rebeck et al, 1993; Schmechel et al, 1993) et la MA pourrait être expliqué par la faible capacité de l'allèle  $\epsilon 4$  à régénérer ou stabiliser les neurones. La tendance à la diminution de la concentration d'apoE chez les patients présentant l'allèle  $\epsilon 4$  par rapport à ceux présentant les allèles  $\epsilon 2$  ou  $\epsilon 3$  pourrait être secondaire à une accumulation de cet allèle dans les plaques séniles. Ce phénomène pourrait être expliqué par une meilleure capacité de liaison à l'A $\beta$  ou au LRP de l'allèle  $\epsilon 4$ .

En conclusion, notre étude révèle une augmentation de la concentration de l'apoE dans le LCR avec la MA et d'autres pathologies neurologiques suggérant que l'apoE pourrait être le témoin d'une réaction inflammatoire locale. Cette étude souligne l'importance des critères de sélection des sujets sains et de l'âge des patients dans l'analyse des concentrations de l'apoE. Ces résultats nous permettent de proposer l'hypothèse que l'apoE joue un rôle important en cas de lésion neuronale dans la synaptogénèse compensatrice.

## **II- Association de l'apolipoprotéine E à l'apolipoprotéine D, la transthyrétine et l'actine dans le liquide céphalorachidien.**

### **II.1- Introduction**

En parallèle à l'apoE, nous avons étudié trois protéines : la TTR, l'apoD et l'actine, dont le choix est justifié par leurs propriétés physicochimiques souvent peu exploitées dans l'étiologie de la MA. Ils s'agit notamment de l'affinité et de la séquestration possible du peptide A $\beta$  par la TTR dans le milieu extracellulaire (Schwarzman et al, 1994), de l'importance de l'apoD dans la régénération et la réparation neuronale (Boyles et al, 1990) et de la place de l'actine comme composant majeur du cytosquelette qui pourraient interagir avec l'apoE (Fleming et al, 1996). Dans des échantillons de LCR, nous avons donc examiné les variations de la concentration de l'apoE avec celle de la TTR, de l'apoD et de l'actine. Nous avons étudié leur état d'équilibre et/ou d'interaction dans ce compartiment en relation avec la MA et en parallèle avec le polymorphisme de l'apoE, le statut mental et les données de l'histopathologie clinique du cerveau.

### **II.2- Population et méthodes**

Les apoD et E ont été mesurées dans les LCR prélevés par ponction lombaire chez 41 patients atteints d'une MA probable selon les critères NINCDS-ADRDA, 11 individus n'ayant pas d'atteintes neurologiques (contrôles), 39 patients ayant diverses atteintes neurologiques périphériques et inflammatoires (maladies cérébrovasculaires, atteintes de neurones moteurs et méningoencephalites).

Les relations de la TTR et de l'apoE avec les plaques séniles et l'actine a été réalisée dans le cadre d'une étude indépendante chez des groupes de patients en *post mortem* incluant 20 patients ayant une MA confirmée sur le plan anatomopathologique et 10 patients avec diverses atteintes neurologiques et inflammatoires inflammatoires (cinq patients atteints de maladies cerebrovasculaires sans démence, 3 atteints de démences mixtes, 2 atteints de maladies discovertébrales). Une détermination semi-quantitative de l'abondance des plaques séniles a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-A $\beta$  (Dako) (Serot et al, 1994) au niveau des

lobes temporal, frontal, pariétal et de l'hippocampe (CA1). L'abondance des plaques séniles a été classée en modérée (+), abondante (++) et très abondante (+++).

Les deux apolipoprotéines ont été mesurées à l'aide des techniques ELISA classiques décrites précédemment (Camato et al, 1989 ; Merched et al, 1997), la TTR par immunonéphélogométrie à l'aide du système Array™ (Beckman). L'étude de l'actine a été réalisée après séparation des protéines du LCR par électrophorèse bidimensionnelle selon le protocole modifié décrit précédemment (voir § I.1.2.1). La quantification de l'actine a été réalisée selon une procédure qui combine les mesures densitométriques à l'analyse automatique qui se résume de la façon suivante: après séparation des protéines du LCR, les gels (18x16x0,15 cm) ont été digitalisés à l'aide d'un scanner laser Agfa 800® caractérisé par 1024 niveaux de gris, une gamme de densité optique entre 0 et 3,2 et une résolution spatiale de 250 µm. Les données de digitalisation ont été analysées par une station de travail SUN à l'aide du programme HERMeS, programme développé par Tarroux et Vincens (1987) incluant toutes les étapes d'analyses nécessaires aux études complètes des gels (acquisition de l'image, débruitage, détection des spots, appariement multiple interactif et analyse des données).

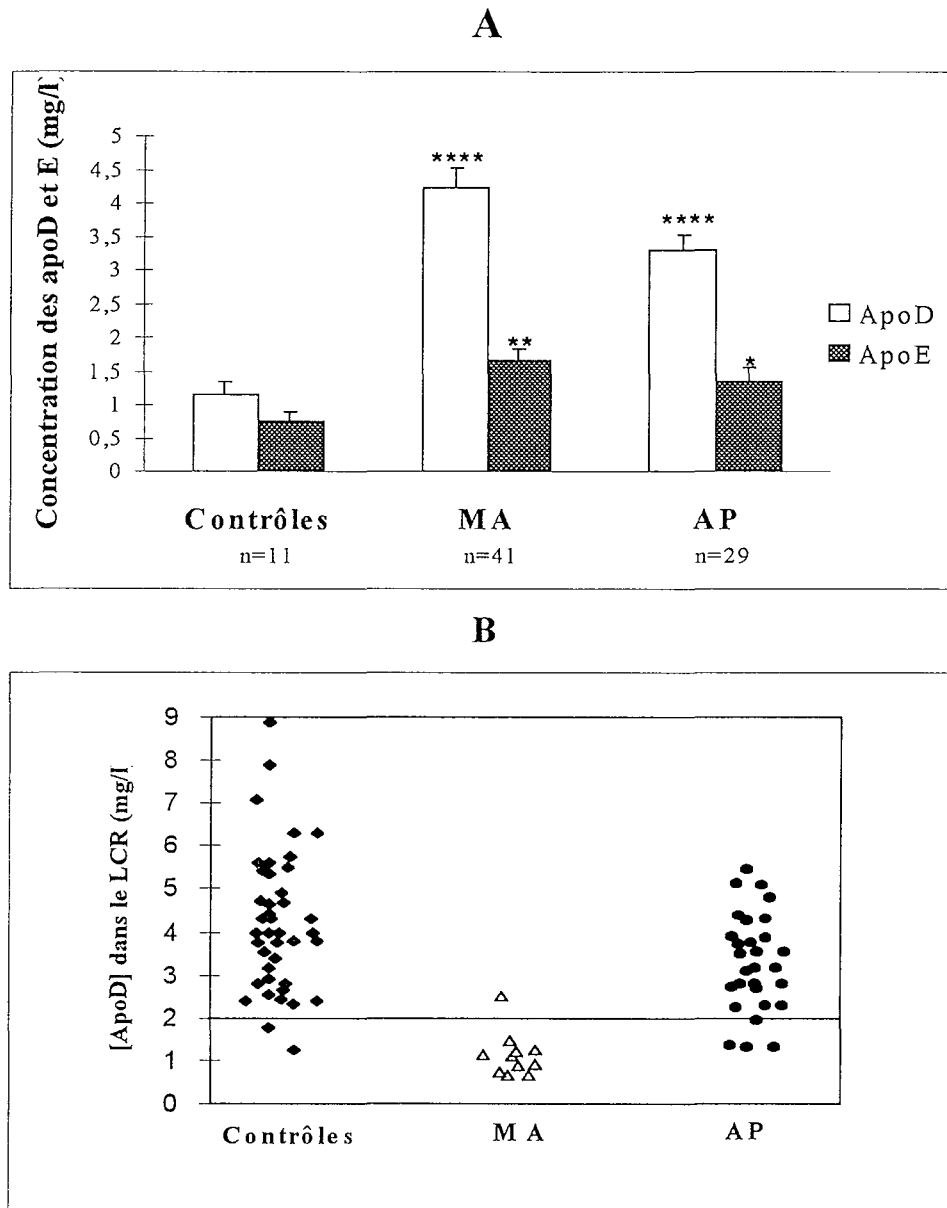
La concentration en TTR des échantillons de LCR a été calculée par des mesures néphélogométriques décrites précédemment. La calibration a été réalisée grâce au contenu des échantillons en TTR. Après calibration et afin d'éviter les variations dues à la coloration argentique et à la détection, nous avons étudié la corrélation entre les spots d'actine et les spots de TTR à l'intérieur des mêmes gels. De cette façon la standardisation était essentiellement interne dans chaque gel. Les valeurs de calcul quantitative d'actine et de TTR dans les échantillons de LCR représentent la moyenne de deux ou plusieurs répétitions.

Le polymorphisme génétique de l'apoE a été déterminé par électrophorèse bidimensionnelle ou par PCR à l'aide de la technique de Hixson et Vernier (1990).

## **II.3- Résultats et discussion**

### **II.3.1- ApoE, ApoD et réparation neuronale**

Nous avons d'abord étudié l'ApoD dont l'expression est stimulée comme celle de l'apoE dans les conditions de lésions expérimentales du tissu périphérique (Boyles et al, 1990). Nos résultats montrent que, parallèlement à la concentration de l'apoE dans le LCR, celle de l'apoD augmente de façon considérable chez les patients atteints de la MA mais aussi chez les patients atteints d'autres pathologies (patients « neurologiques ») par rapport au groupe contrôle ( $4,23 \pm 1,58$  et  $3,29 \pm 1,35$  vs  $1,15 \pm 0,70$  mg/l, avec dans les deux cas  $P < 0,0001$ ) (Fig 24). De même, une augmentation de la concentration de l'apoE, bien que moins marquée que celle de l'apoD, a été observée chez les patients MA et chez les patients « neurologiques » ( $P < 0,001$  et  $P < 0,05$ , respectivement) (Fig 24A).

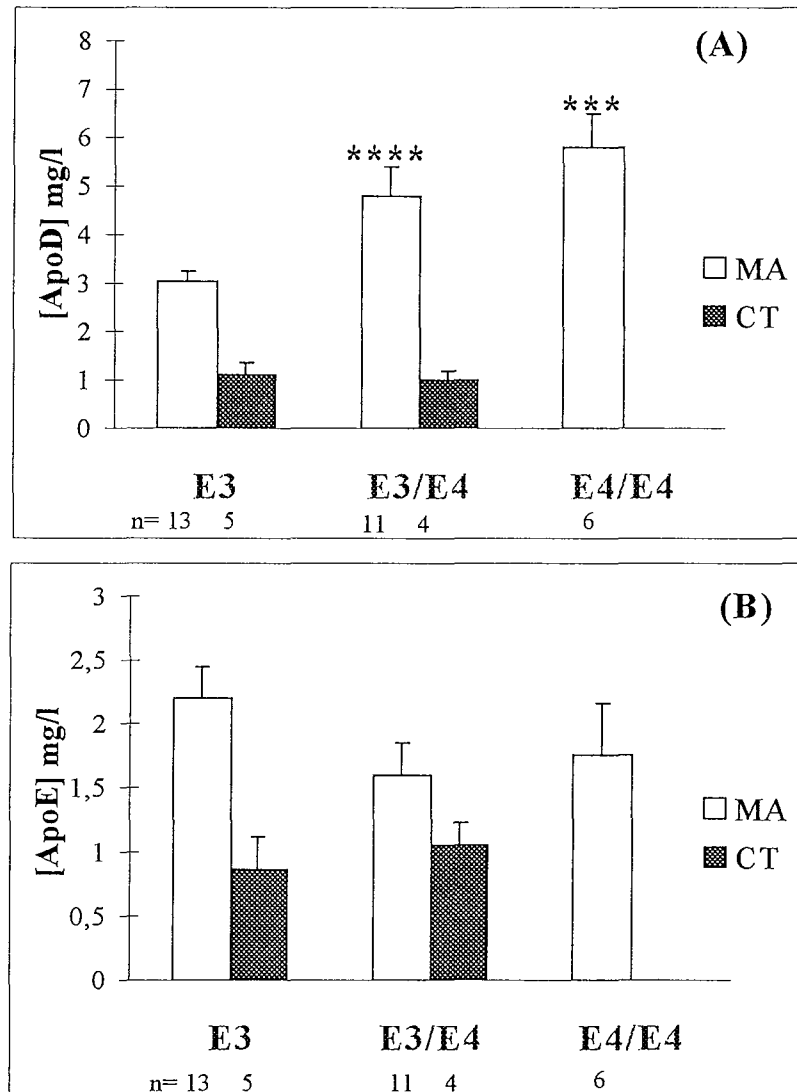


**Fig. 24-** Variation de la concentration des Apo D et E dans le LCR des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), des contrôles et des patients atteints d'autres pathologies neurologiques et inflammatoires que la MA (AP) (A). Les bars représentent les moyennes  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ . (B) Distribution de la concentration de l'apoD dans les 3 groupes par rapport à la valeur de *cut off* de 2mg/l.

Nous avons pris une valeur limite de 2mg/l d'apoD d'après les distributions de ce paramètre dans le LCR (Fig 24B) et évalué les critères de diagnostic de ce marqueur. Bien que l'augmentation de l'apoD dans le LCR n'est pas spécifique de la MA, nous avons trouvé une sensibilité de 95% et une spécificité de 91%. Ces valeurs sont de 93% et 91% en considérant l'ensemble des maladies dégénératives et inflammatoires incluant la MA. Il est évident qu'il faut tenir compte du faible nombre de sujets contrôles.



De plus, la concentration de l'apoD est positivement corrélée avec la dose de l'allèle ApoE- $\epsilon$ 4 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 25). L'âge et le sexe n'affectent pas la concentration des apoD et E, ni dans le LCR des patients atteints de la MA, ni chez les contrôles. Les concentrations des apoD et E ne sont pas liées au score MMS et ne varient donc pas avec la sévérité de la MA.



**Fig. 25-** Variation de la concentration de l'ApoD (A) et l'ApoE (B) dans le LCR des patients en fonction du nombre d'allèle  $\epsilon$ 4. \*\*\* :  $p < 0.005$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$ .

L'augmentation des apoD et E semble être liée aux caractères communs de la MA et des autres pathologies neurologiques et inflammatoires, probablement en réaction aux dommages cellulaires. Ces résultats sont en faveur d'un rôle de coordination des deux protéines dans la réparation et la régénération neuronale. Etant donné l'appartenance de l'apoD à la famille des lipocalines, elle pourrait assurer le transport de ligand(s) hydrophobe(s) essentiel(s) dans les

situations pathologiques ou alternativement l'élimination de substance(s) neurotoxique(s). La corrélation positive entre la concentration de l'apoD dans le LCR et la dose de l'allèle  $\epsilon 4$  souligne une interaction probablement de nature métabolique entre les deux marqueurs. En effet, les apo D et E font partie d'au moins d'une population de lipoprotéines dans le LCR (Borghini et al, 1995) qui pourrait être régulée par un turn-over différent suivant la nature de l'isoforme de l'apoE. L'absence de corrélation entre l'apoE et la dose de l'allèle  $\epsilon 4$  pourrait être due à l'appartenance de l'apoE à plus d'une population de lipoprotéines de régulation différente (Borghini et al, 1995).

### II.3.2- ApoE, transthyréine et formation des plaques séniles

Par ailleurs, afin de mieux comprendre le processus de dépôts de l'amyloïde  $\beta$  dans les plaques séniles (PS) au niveau du cerveau des patients souffrant de la MA, nous avons étudié la contribution potentielle de deux protéines ayant une affinité pour l'A $\beta$  : l'ApoE et la TTR. Nous avons mesuré leur concentration dans le LCR *postmortem* en tenant compte de l'abondance des dépôts amyloïdes estimée par des études immunohistochimiques du cerveau des mêmes patients et en sachant que les résultats peuvent varier en fonction des observateurs (Duyckaerts et al, 1990). Nos résultats montrent que la concentration de la TTR, contrairement à celle de l'ApoE, est plus faible dans le LCR des patients atteints de la MA par rapport aux patients ayant ou non d'autres pathologies neurologiques ( $22.21 \pm 1.41$  vs  $36.52 \pm 4.12$  mg/l  $\pm$  SEM,  $p < 0.01$ ) (Fig 26).

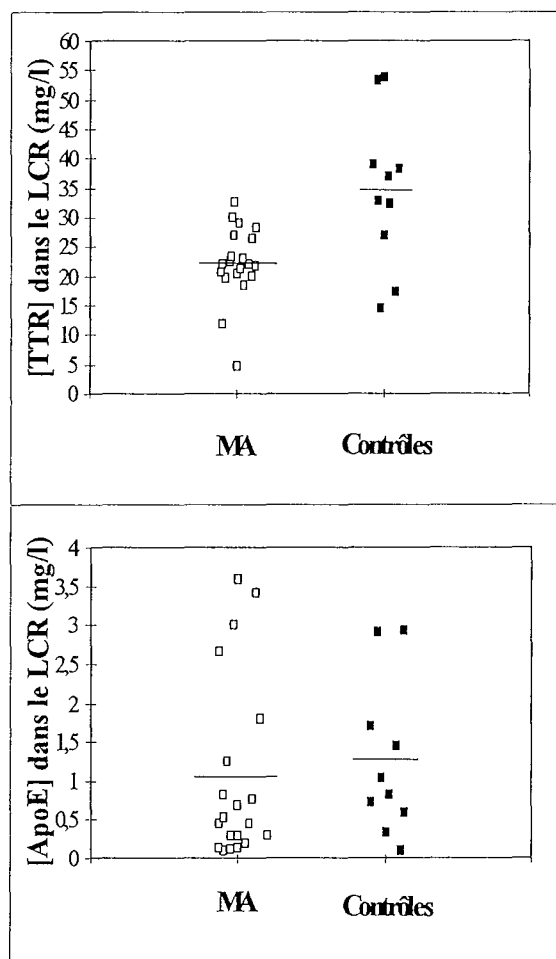


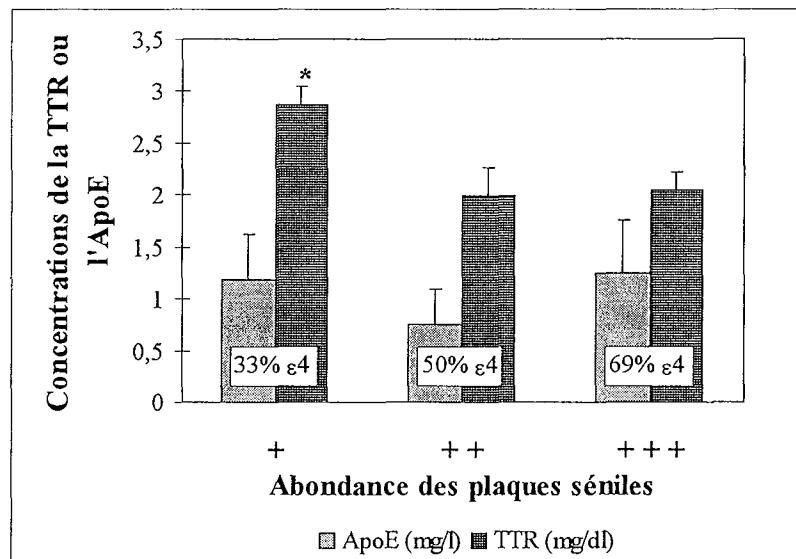
Fig. 26- Concentration de la transthyréine et de l'apoE dans le LCR intraventriculaire des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) et d'autres pathologies neurologiques et inflammatoires (contrôles).

Cette diminution de la concentration de la TTR confirme les résultats récents de Serot et ses collaborateurs (1997b) obtenus avec le LCR prélevé par ponction lombaire chez des patients ayant la MA. Néanmoins, les résultats de l'apoE ici sont différents de ceux décrits dans le chapitre précédent avec le LCR prélevé par ponction lombaire (cf § I.2.2) où nous avons

constaté une augmentation significative avec la MA. Ces divergences peuvent s'expliquer par le fait qu'en *post mortem*, où le stade de la MA est terminal, la mesure de la concentration de l'apoE n'est qu'une sous-estimation de la production cérébrale pendant la progression de la MA et ce en raison de la mort cellulaire excessive concernant les sujets en *post mortem*.

Une seule équipe a étudié la concentration de l'apoE dans les situations post mortem (Rösler et al, 1996) et trouvé les mêmes résultats que les nôtres.

La concentration de la TTR est également négativement corrélée à l'abondance des plaques séniles ( $p < 0.01$ ) (Fig 27). Tandis que le nombre de plaques séniles augmente significativement avec le nombre d'allèle  $\epsilon 4$  ( $p < 0.05$ ). La TTR et l'apoE semblent avoir des effets opposés dans la formation des plaques séniles. Leur affinité pour le peptide  $A\beta$  suggère une relation de compétition entre les deux protéines, avec un rôle protecteur de la TTR et un effet amyloïdogénique de l'apoE4.



**Fig. 27-** Relation entre les concentrations moyennes de l'apoE et la TTR dans le LCR intraventriculaire et l'abondance des plaques séniles dans le cerveau des mêmes patients. La fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  est présentée. (+) abondance moyenne, (++) abondant, (+++) très abondant. \*  $p < 0.05$ .

relation avec la dose de l'allèle  $\epsilon 4$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 29) Ces résultats suggèrent que l'apoE4 pourrait moduler et réguler la plasticité du cytosquelette via des interactions directes avec les composants du cytosquelette.

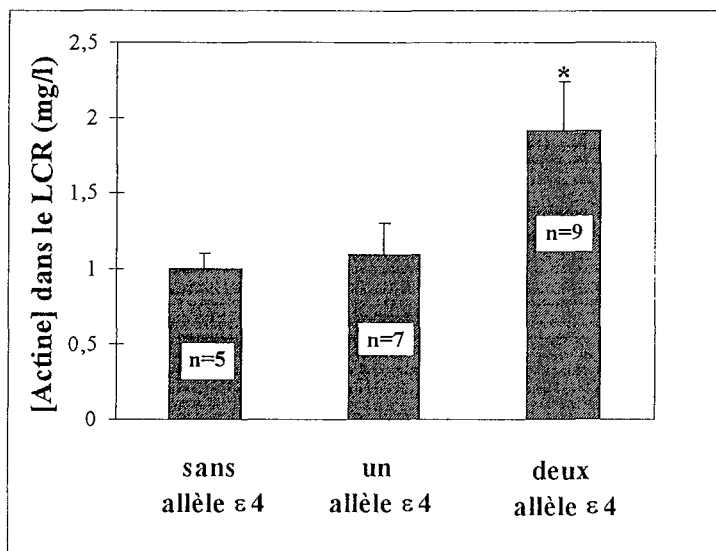
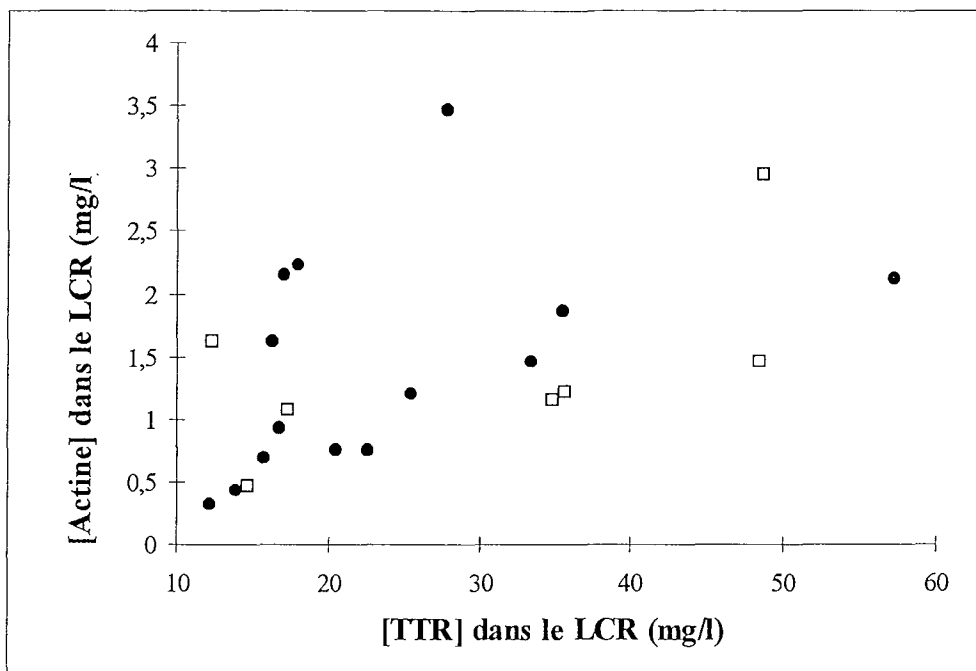


Fig. 29- Variation de la quantité d'actine dans le LCR intraventriculaire des patients atteints de la MA en fonction du nombre d'allèle  $\epsilon 4$ . \* $P < 0,05$ .

La corrélation entre les intensités des spots d'actine et la concentration de la TTR dans le LCR montre une évolution positive pour tous les patients incluant les patients contrôles ( $r = 0,54$ ,  $P = 0,0088$ ,  $n = 21$ , Fig 30). La corrélation reste significative en tenant compte seulement des patients atteints de la MA ( $r = 0,60$  ;  $P = 0,019$ ;  $n = 14$ ), tandis que celle avec le groupe des patients contrôles n'est pas significative ( $r = 0,46$ ;  $P = 0,25$ ;  $n = 7$ ).

La comparaison des moyennes d'actine entre les patients MA et les et les patients contrôles ne montre pas de différence entre les deux groupes ( $1,43 \pm 0,23 \text{ mg/l}$ ,  $n = 14$  vs  $1,41 \pm 0,28 \text{ mg/l}$   $n = 7$ ,  $P = 0,94$ ). Nous attribuons cela aux dommages neuronaux importants dans les deux cas, liés aussi bien à la MA qu'aux autres maladies neurodégénératives.



**Fig. 30-** Corrélation entre la concentration de la TTR et la quantité d'actine dans le LCR. Le coefficient de corrélation de Spearman de tous les patients est de  $r = 0,54$ ,  $P=0,0088$ . Les cercles pleins correspondent aux patients atteints de la MA ( $r=0,60$  ;  $P=0,019$ ;  $n=14$ ), les carrés aux patients contrôles ( $r=0,46$ ;  $P=0,25$ ;  $n=7$ ).

La relation entre l'actine et la TTR pourrait être la conséquence du rôle de cette dernière dans le transport de la thyroxine. En effet, cette hormone semble réguler *in vitro* la polymérisation de l'actine dans les cultures d'astrocytes (Siegrist-Kraiser et al, 1990) en favorisant la formation de la structure filamenteuse de l'actine (F-actine) au dépend de la forme monomérique soluble (G-actine). La diminution de la concentration céphalorachidienne de la TTR dans la MA peut être secondaire à une diminution de sa synthèse dans les plexus choroïde (Serot et al, 1994; Serot et al, 1997a) mais également la conséquence d'un turn over ou d'une absorption rapide par les cellules du système nerveux. On peut noter que l'affinité de la TTR vis-à-vis de ses récepteurs cellulaires augmente si elle est présente sous sa forme complexée à la thyroxine (Divino and Schussler, 1990a) et que la thyroxine favorise la formation de l'actine filamenteuse. La conséquence de l'absorption des complexes TTR-thyroxine pourrait être donc le déplacement de l'équilibre de l'actine en faveur de sa forme filamenteuse.

## II.4- Conclusion

En résumé, l'ensemble de ces résultats suggèrent les hypothèses suivantes :

(i) la présence de l'allèle  $\epsilon 4$  et la diminution de la concentration de la TTR sont les conditions les plus favorables à la formation des plaques séniles. Ces fonctions pourraient être dues à un mécanisme de compétition entre les deux facteurs vis-à-vis du peptide A $\beta$  ou à une implication dans le métabolisme anormal de ce peptide,

(ii) les deux apolipoprotéines D et E sont importantes dans les maladies neurodégénératives telle que la MA, probablement au niveau de la remobilisation du cholestérol et de la réparation neuronale. Toutefois, la présence de l'allèle  $\epsilon 4$  semble inhiber ou ralentir cette remobilisation et pourrait compromettre par conséquence la régénération cellulaire,

(iii) l'apoE semble intervenir activement au niveau de la biochimie du cytosquelette. L'isoforme  $\epsilon 4$  pourrait avoir une contribution négative à la stabilité du cytosquelette à travers l'actine,

(iv) la TTR pourrait avoir des fonctions de régulation du cytosquelette et l'actine pourrait servir comme marqueur de ce dernier dans la MA. La polymérisation de l'actine semble être négativement régulée par l'apoE4 et positivement par la TTR. Cette régulation pourrait s'exercer de manière directe ou indirecte.

L'ensemble de nos résultats montrent que l'apolipoprotéine E4 pourrait être impliquée dans une ou plusieurs voies de corégulation particulière(s) mettant en jeu l'apoD, la TTR, l'actine et probablement d'autres facteurs dans un processus physiopathologique spécifique de la MA.

### **III- Etude de gènes candidats du métabolisme lipidique dans la maladie d'Alzheimer : les apolipoprotéines AI et AIV**

#### **III.1- Introduction**

Bien que l'allèle  $\epsilon 4$  de l'apoE soit le facteur de risque génétique le plus important de la MA, sa présence ne semble ni nécessaire ni suffisante pour développer la MA. D'autres facteurs de risque génétiques ou anomalies métaboliques pourraient être impliqués dans l'étiologie cette maladie. Nous avons étudié deux apolipoprotéines très importantes dans le métabolisme lipidique : l'apoAI, et l'apoAIV. En effet, la première est majoritairement présente dans les HDL, lipoprotéines anti-athérogènes, et est un activateur de la LCAT, enzyme clé du métabolisme lipidique. La seconde possède des fonctions majeures dans le transport reverse du cholestérol, un processus également anti-athérogène.

L'objectif de cette étude est de proposer un des polymorphismes de l'apoAIV localisé dans codon 360, développé au laboratoire (Zaiou et al, 1992), comme facteur de risque ou de protection de la MA. Les conséquences de ce polymorphisme sur les propriétés physico-chimiques de la protéine sont importantes et bien caractérisées (Weinberg et al, 1990). Les résultats sont rapportés comme réponse à la publication récente de Czar et al, (1997) qui ont montré une association entre le polymorphisme au niveau de ce codon et la maladie d'Alzheimer. En outre, nous avons évalué la concentration plasmatique de l'apoAI comme marqueur biochimique de cette maladie. En parallèle, nous avons examiné l'effet de ces variations génétiques et biochimiques sur le métabolisme lipidique et en fonction du polymorphisme de l'apoE.

#### **III.2- Population et méthodes**

Les fréquences alléliques de l'apoAIV et de l'apoE ont été déterminées chez 120 patients atteints d'une MA probable selon les critères NINCDS-ADRDA (33 hommes, 87 femmes, moyenne d'âge  $77,87 \pm 0,79$  ans , 46-94 ans), 119 sujets âgés présumés sains, pour la plupart des visiteurs du Centre de Médecine Préventive de Nancy (59 hommes, 60 femmes, moyenne



d'âge  $70,68 \pm 0,61$  ans, 58-89 ans) et 33 patients ayant diverses formes de démence autre que la MA (8 hommes, 25 femmes, moyenne d'âge  $83,88 \pm 1,00$  ans, 70-95 ans).

Les fréquences alléliques de l'apoAV (codon 360) chez ces groupes ont été comparés à celle d'une population témoins comportant 264 de sujets témoins caucasiens (131 hommes, 133 femmes, moyenne d'âge  $39,00 \pm 9.69$  ans; 20-60 ans), et préalablement décrite dans la littérature (Visvikis et al, 1989).

Le polymorphisme génétique de l'apoAIV au codon 360 a été déterminé à l'aide d'une technique de PCR utilisant une amorce bispécifique (voir tableau 8) établie dans notre laboratoire (Zaïou et al, 1992). Le polymorphisme de l'apoE a été identifié selon la technique de Hixon et Vernier (1988).

**Tableau 8-** les amorces utilisées pour l'amplification des zones polymorphes des gènes d'apoE et AIV

Régions polymorphes amplifiées par PCR	Séquence des amorces
<b>ApoE</b> région (112 - 152) amorce 5' amorce 3'	5' ACAGAATTTCGCCCCGGCCTGGTACAC 3' 3' TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA 3'
<b>ApoAIV</b> codon 360 amorce 5' amorce 3'	5' CGG GTG GAG CCC TAC GGG GA 3' 3' G CTC CTG CTG CTG CTC CAG C 3'

Le sang a été prélevé chez les sujets à jeun depuis au moins 12 heures. Le cholestérol total plasmatique et les triglycérides ont été mesurés par la méthode enzymatique standard (Merck, Darmstadt, Allemagne), en utilisant l'appareil AU5000 (Olympus, Tokyo, Japan). Les concentrations plasmatiques des apoAI et B ont été déterminées par immunonéphélométrie à l'aide de l'appareil Behring Nephelometer Analyser, en utilisant les réactifs de Behring (Rueil-Malmaison, France), le cholestérol des HDL a été mesuré en utilisant les réactifs de Behringer (Mannheim, Allemagne) à l'aide de l'appareil COBAS MIRA (Roche Diagnostics-System, Neuilly-sur-Seine, France).

Les études immunohistochimiques de l'apoAI et d'autres protéines ont été réalisées chez trois patients atteints de la MA confirmée à l'autopsie. Les marquages ont été faites par fluorescence sur coupes sériées en utilisant les anticorps monoclonaux suivant: anti-A $\beta$  humain (DAKO,

La fréquence du polymorphisme de l'apoE corrobore nos précédents résultats obtenus dans la population lorraine, de même pour les patients atteints de la MA (Lucotte et al, 1993; Siest et al, 1996).

### III.3.2- La distribution des allèles de l'apoAIV (360:His) n'est pas influencée par l'allèle $\epsilon 4$

Nous avons donc analysé nos résultats en fonction du polymorphisme de l'apoE, en relation avec la présence ou non de l'allèle  $\epsilon 4$  (Tableau 10). Les sujets possédant ou non l'allèle  $\epsilon 4$  présentent la même distribution allélique de l'apoAIV. De plus dans le groupe de MA, le score mental MMS (Folstein et al, 1975) n'était pas influencé par le polymorphisme de l'apoAIV (résultats non présentés).

**Table 10-** Distribution allélique de l'apoAIV (condon 360) en relation avec l'allèle  $\epsilon 4$ .

Sujets	Avec 1 ou 2 allèle(s) $\epsilon 4$		Sans allèle $\epsilon 4$	
	patients MA	contrôles	patients MA	contrôles
Sans allèle AIV(360:His)	48	20	48	63
Avec 1 ou 2 allèle(s) AIV(360:His)	10	6	12	21
OR [intervalle de confiance]	0,69 [0,22 - 2,15]		0,75 [0,50 - 1,13]	

La fréquence allélique de l'apoAIV(360:Gln:His) dans le groupe de patients atteints de la MA corrobore avec les résultats précédemment reportés (Csazar et al, 1997). Néanmoins, nos résultats concernant cette fréquence dans la population contrôle âgée révèlent une divergence importante (12.17% (n= 119) ici, vs 3.5% (n=71)), sachant que la moyenne d'âge des deux groupes est comparable. La raison de ces différences n'est pas claire. Toutefois, nous avons constaté une différence supplémentaire au niveau du génotype en apoE des sujets. La

fréquence de l'ApoE4 dans notre groupe contrôle est de 12%, tandis que celle de l'étude de Csazar et al est de 7%, laquelle est relativement faible par rapport aux fréquences de diverses populations européennes (voir revue Siest et al, 1996) et notamment par rapport à la fréquence décrite par les mêmes auteurs dans une population plus large (Hallman et al, 1991). Ces derniers ont obtenu une fréquence de 12.9% dans un échantillon de 202 sujets.

En résumé, cette étude montre que la fréquence de la mutation 360 de l'ApoAIV est relativement élevée dans la population âgée et ceci indépendamment de l'état clinique, c'est à dire, aussi bien chez les patients atteints de la MA que chez les groupes de contrôles. Par ailleurs nous avons trouvé une fréquence élevée de cet allèle (9.26%) chez 26 patients atteints d'une démence vasculaire (non présentés). Ces études montrent que cette mutation est plutôt liée à la longévité qu'à une pathologie liée à l'âge.

Il est clair que la fréquence de l'allèle apoAIV(36:His) est différente entre les pays européens avec un gradient croissant du nord (4.9%) au sud (10.5%) (Ehnholm et al, 1994). Néanmoins ces données sont issues de populations jeunes et n'ont pas été estimées chez les personnes âgées.

L'implication potentielle de l'allèle apoAIV(360:His) au niveau du vieillissement ne peut pas être expliquée par les données de ce travail qui ont besoin d'être vérifiées, dans une population de centenaires par exemple. En effet, la fonction de l'apoAIV dans le cerveau est peu connue. Indépendamment de son origine, la présence de cette protéine dans le liquide céphalorachidien (Borghini et al, 1995) et dans le cerveau (Harr et al, 1996), sa fonction dans le transport réverse du cholestérol pourraient suggérer une participation active au métabolisme lipidique du cerveau. La mutation Gln→His pourrait influencer la composition et/ou le métabolisme des lipoprotéines et par conséquent l'utilisation optimale de cette source de lipides dans le remodelage synaptique au cours des situations de stress liées au vieillissement. La mutation au codon 360 semble modifier les propriétés physicochimiques de l'apoAIV (Weinberg et al, 1990) avec une structure plus riche en hélice  $\alpha$  et une hydrophobicité plus importante. Ces modifications semblent entraîner une efficacité plus marquée de cette apolipoprotéine pour l'activation de la LCAT et une plus grande affinité aux lipoprotéines. Ces fonctions semblent être importantes pour la prévention contre les maladies cardio- et cérébro-vasculaires.

### III.3.3- La concentration plasmatique de l'apoAI est diminuée avec la maladie d'Alzheimer

La concentration plasmatique de l'apoAI est significativement plus basse ( $p < 0.001$ ) chez les patients atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles (Tableau 11).

Cette différence reste significative après une analyse multivariée en tenant compte de plusieurs paramètres, tels que l'âge, le sexe, l'albumine et les paramètres lipidiques. Les polymorphismes de l'apoE et de l'apoAIV n'ont pas d'effets significatifs sur la concentration de l'apoAI.

**Tableau 11-** Comparaison des données biologiques et biochimiques entre les malades et les contrôles

	Patients atteints de la MA	Sujets âgés contrôles	P
n (M/F)	87 (26/61)	59 (28/31)	
Age (ans)	77,75 ± 9,03	75,37 ± 5,27	NS
Albumine	39,41 ± 4,42	43,91 ± 2,85	3 10 <sup>-10</sup>
ApoAI (g/l)	1,34 ± 0,31	1,65 ± 0,26	3 10 <sup>-9</sup>
ApoB	1,09 ± 0,32	1,08 ± 0,22	NS
Cholestérol total	5,44 ± 1,32	5,95 ± 0,77	0,02
HDL-C	1,05 ± 0,40	1,28 ± 0,35	3 10 <sup>-7</sup>
Triglycérides	1,22 ± 0,59	1,43 ± 0,58	NS

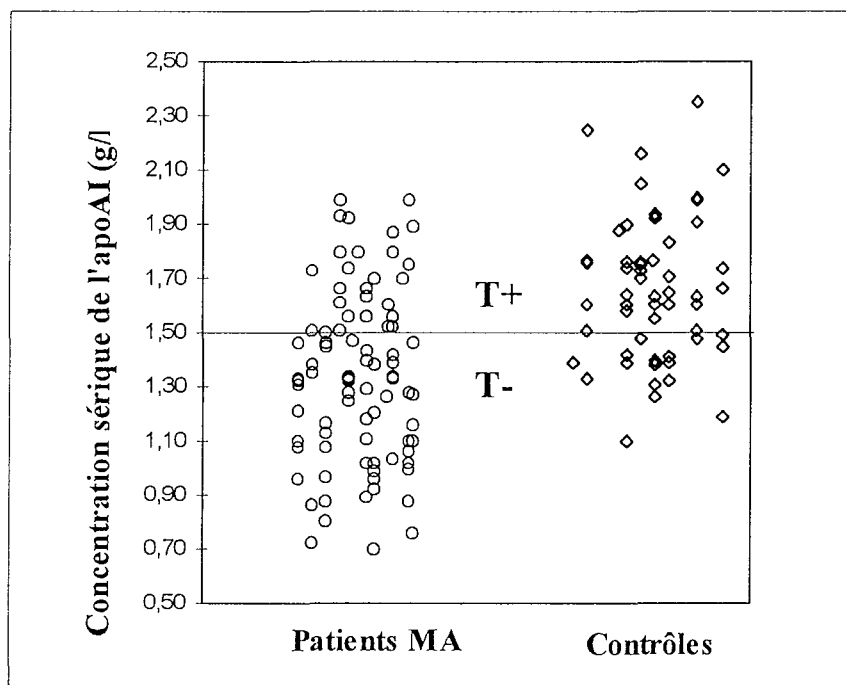
Deux études précédentes ont décrit une diminution de la concentration de l'apoAI dans le plasma des patients atteints de la MA (Kuriyama et al, 1994; Kawano et al, 1995).

Nous confirmons donc ces résultats chez un nombre plus important de malades. Cependant, contrairement à ces deux travaux, nous avons constaté une corrélation négative entre la concentration plasmatique de l'apoAI et celle de l'albumine ainsi qu'avec l'âge des patients. Par conséquent, nous avons tenu compte de ces deux facteurs dans toutes les analyses et les comparaisons ultérieures entre les groupes étudiés.

Parmi les paramètres lipidiques, seule la concentration du cholestérol des HDL est nettement plus faible ( $P < 10^{-6}$ ), chez les patients MA par rapport aux contrôles (Table 11). Les variations

du cholestérol des HDL suivent logiquement celle de l'apoAI, étant donné que cette dernière est la composante principale de ces particules.

Nous notons que la concentration de l'albumine est très significativement plus faible chez les patients atteints de la MA par rapport aux sujets sains. Ces résultats ne sont pas surprenants, en effet, ce dernier paramètre biologique est souvent pris comme marqueur biochimique de santé.



**Fig. 31-** Distribution de la concentration sérique de l'apoAI entre les patients atteints de la MA et les sujets contrôles. La ligne représente la valeur limite (1,50 g/l), base de calcul de la sensibilité et la spécificité. T+ : diagnostic positif; T- diagnostic négatif.

Nous avons évalué l'utilité clinique de la détermination de la concentration sérique de l'apoAI dans le maladie d'Alzheimer par le calcul des paramètres de diagnostic cliniques classiques (d'après Fig 31 et Tableau 12). La valeur limite choisie d'apoAI entre les malades et les sujets contrôles est de 1,50 g/l (voir Fig 31).

**Tableau 12-** Résultats de classification des sujets en fonction de la valeur limite d'apoAI (1,50g/l)

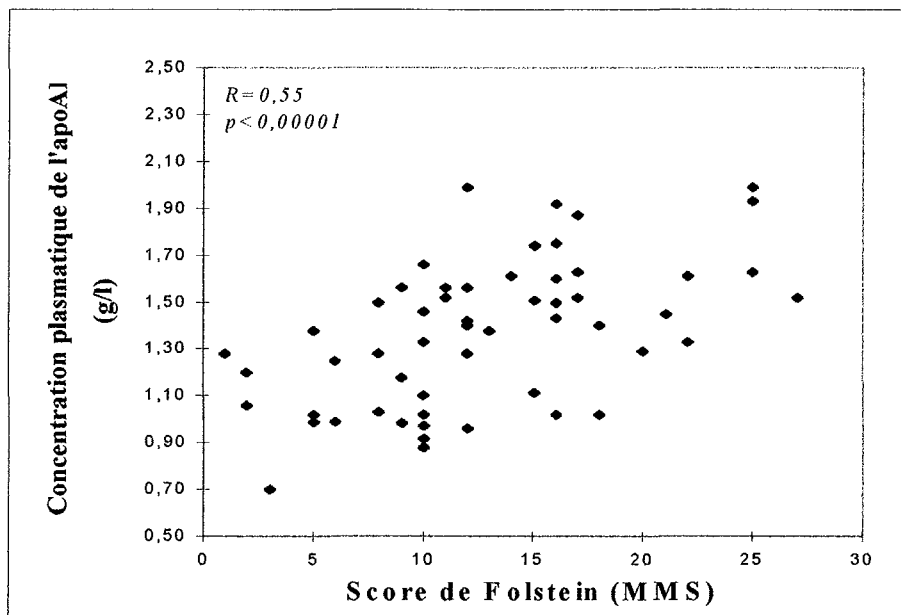
	Malades	Contrôles	Total
Diagnostic positif (T+)	63	19	82
Diagnostic négatif (T-)	24	40	64
Total	87	59	146

La sensibilité (proportion de sujets positifs parmi les malades) est de 72%. La spécificité (proportion de sujets négatifs parmi les sujets contrôles) est de 68%. La valeur prédictive positive (proportion de sujets malades parmi tous les positifs) est de 78%. La valeur prédictive négative (proportion de sujets contrôles parmi tous les négatifs) est de 62%.

La raison de la diminution de la concentration d'apoAI dans la MA n'est pas claire. Toutefois, il a été démontré que la durée de demie-vie de l'apoAI diminue chez les animaux dans des conditions inflammatoires (Tape and Kisilevsky, 1990) qui sont des situations souvent rencontrées dans la MA. En outre, certaines études chez les personnes âgées ont montré que des concentrations plasmatiques élevées d'apoAI sont associées à de faibles taux de mortalité ainsi qu'à une plus grande longévité (Campbell et al, 1993). Nous suggérons que l'apoAI pourrait avoir un rôle beaucoup plus important dans la MA que ce qui a été suspecté .

### **III.3.4- La concentration plasmatique de l'apoAI est corrélée avec la sévérité de la maladie d'Alzheimer**

Nous montrons que la concentration plasmatique de l'apoAI est très significativement corrélée au score mental MMS ( $p < 0.0001$ , Fig 32). Cette relation reste significative indépendamment de tous les paramètres physiologiques et biologiques étudiés (âge, sexe albumine, paramètres lipidiques, génétique des apoAIV et E).



**Fig. 32-** Relation entre la concentration plasmatique de l'apoAI et le score mental MMS de Folstein. Le coefficient de corrélation est présenté.

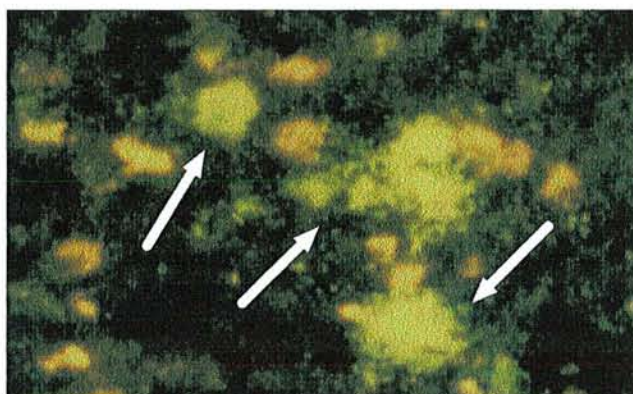
La mise en évidence de la relation entre le MMS et la concentration plasmatique de l'apoAI, décrite pour la première fois, est très importante et pourrait avoir des applications pharmacologiques. En effet, dans la littérature, il existe de nombreux médicaments et produits capables d'augmenter la synthèse hépatique de l'apoAI et sa concentration plasmatique (voir Luoma, 1997), comme le gemfibrozil, le fenofibrate, la cholestyramine, la dexaméthasone et autres produits (Chao et al, 1985 ; Tam et al, 1990 ; Park et al, 1995). Nous avons donc les moyens d'intervenir au niveau de ce déséquilibre au niveau de l'apoAI (et des HDL-cholestérol) qui est en forte relation avec la sévérité de la MA et soulignons cette piste thérapeutique qui pourrait influencer la progression de la MA.

### **III.3.4- L'apoAI est présente dans les plaques séniles des patients atteints de la maladie d'Alzheimer**

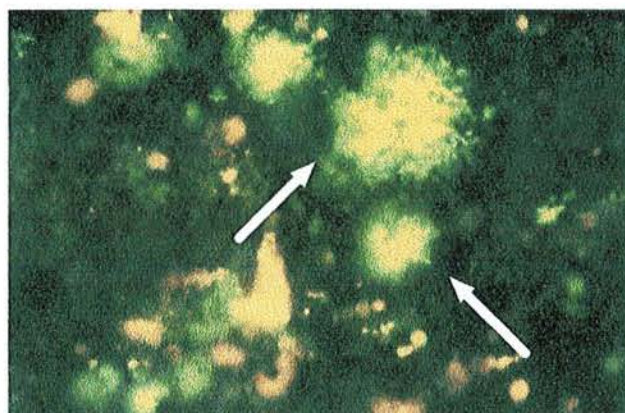
Nous avons réalisé tous les marquages sur des coupes sériées et comparé les résultats à un marquage à l'aide de l'anti A $\beta$ . Nos études immuno-histochimiques utilisant trois anticorps anti-apoAI différents révèlent la présence de l'apoAI dans de nombreuses plaques séniles

corticales (Fig 33). Nous avons vérifié ces résultats dans le cerveau de trois patients décédés de la MA et dont le diagnostic certain fût établi après autopsie. Nous avons examiné les mêmes régions par des anticorps dirigés contre les apoE, J, (Fig 33), B et AII (résultats non montrés). Les coupes ont été fortement réactives avec l'apoE, et faiblement avec l'apoJ. La présence des apoAII et B n'a pas pu être démontrée avec les anticorps utilisés.

**A $\beta$**

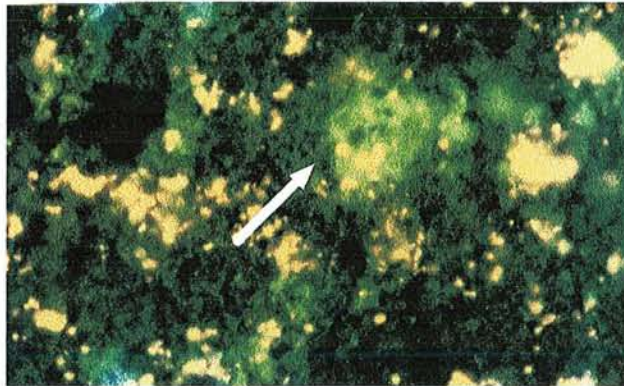
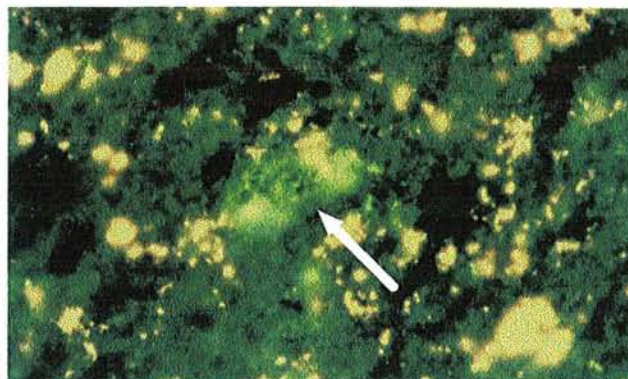


**ApoE**



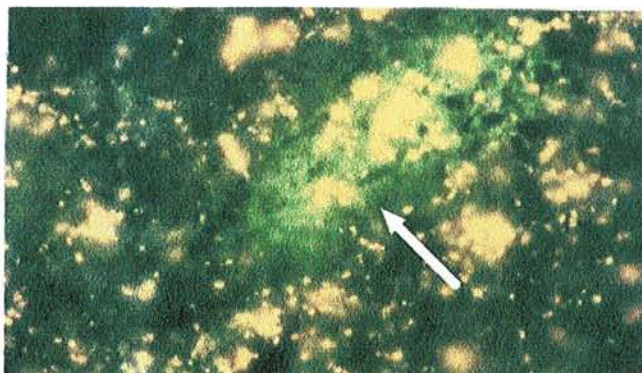
**Fig. 33-** Révélation par immunofluorescence des plaques séniles sur des coupes sériées à l'aide des anticorps : anti-A $\beta$ , 3 anticorps anti-apoAI (A02, A10 et A17), anti-apoE et anti-apoJ. La fluorescence jaune est due à la lipofuschine.



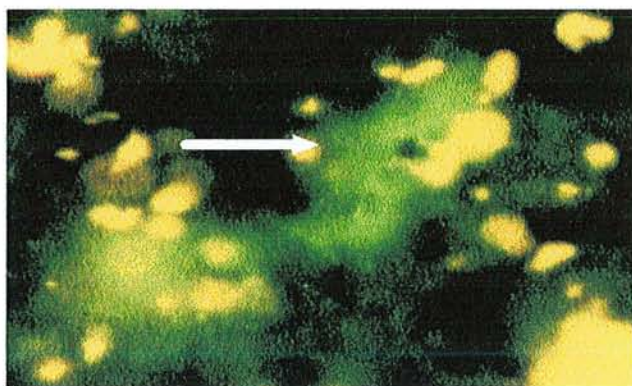
**A $\beta$** **ApoAI (A17)****ApoAI (A10)**

**Fig. 33 (suite)**- Révélation par immunofluorescence des plaques séniles sur des coupes sériées à l'aide des anticorps : anti-A $\beta$ , 3 anticorps anti-apoAI (A02, A10 et A17), anti-apoE et anti-apoJ. La fluorescence jaune est due à la lipofuschine.

### ApoAI (A02)



### ApoJ



**Fig. 33 (suite)**- Révélation par immunofluorescence des plaques séniles sur des coupes sériées à l'aide des anticorps : anti-A $\beta$ , 3 anticorps anti-apoAI (A02, A10 et A17), anti-apoE et anti-apoJ. La fluorescence jaune est due à la lipofuschine.

### **III.4- Conclusion**

Nous avons montré que l'allèle mutant de l'ApoAIV (codon 360) est deux fois plus fréquent dans la population âgée (11,4% vs 5,7%) et pourrait être un marqueur génétique de santé ou de longévité. L'effet de cet allèle peut être la conséquence de ses propriétés physicochimiques particulières, notamment sa structure plus riche en hélice  $\alpha$  et sa plus grande hydrophobicité. Grâce à ces caractéristiques, il pourrait mieux activer la LCAT (Weinberg et al, 1990) et favoriser le transport réverse du cholestérol, et avoir des propriétés anti-athérogéniques et/ou des fonctions importantes dans la régénération et le maintien de l'intégrité neuronale du SNC. Quant à l'apoAI, sa concentration plasmatique faible semble refléter une anomalie associée à la démence. De plus, cette concentration est fortement corrélée au statut mental des patients atteints de la MA reflété par l'état mental (MMS) des patients. Nous avons montré également la présence de l'apoAI dans les plaques séniles des patients décédés de la MA. L'ensemble des résultats est fortement en faveur d'un rôle de ces deux protéines athérogènes dans la modulation des fonctions neurodégénératives.

## IV- Etudes préliminaires de l'affinité de l'apolipoprotéine E au récepteur des VLDL

L'objectif de cette étude est d'examiner l'effet du polymorphisme de l'apoE sur l'affinité au récepteur VLDLR. Ce récepteur est exprimé par les neurones et présent dans les plaques séniles (Christie et al, 1996) pourrait être impliqué dans la modulation des fonctions de l'apoE dans la physiopathologie de la MA. Nous avons utilisé les isoformes de l'apoE recombinante produites dans notre laboratoire (Barbier et al, 1997) que nous avons incorporées dans des liposomes pour étudier la liaison à l'équilibre des liposomes marqués aux récepteurs.

### IV.1- Principe de l'étude d'affinité aux récepteurs

Les cellules sont préparées et activées par des cultures successives. Le ligand (ici l'apoE) est d'abord marqué et son activité spécifique est mesurée, il est ensuite ajouté aux cellules à différentes concentrations. Un essai sera réalisé afin d'étudier la fixation non-spécifique en présence de 20 à 100 fois d'excès de ligand non marqués.

Après 3 à 5 heures d'incubation avec le ligand à 4°C - à cette température, l'internalisation de substrat est minime-, les cellules sont lavées et lysées par la soude. La radioactivité et le contenu en protéines des différents lysats cellulaires sont mesurés afin de calculer la quantité de substrat lié spécifiquement par unité de protéines cellulaires. Les valeurs obtenues pour chaque concentration de substrat sont utilisées pour établir la courbe d'affinité et éventuellement déterminer les constantes d'affinité ( $K_D$  et  $B_{max}$ ).

Deux approches de marquage sont envisageables pour cette étude (i) radiomarquage de l'apoE à l'isotope 125 de l'iode ( $^{125}I$ ), puis incorporation dans les liposomes, (ii) incorporation de l'apoE dans les liposomes puis radiomarquage. Nous avons utilisé la 2ème approche pour éviter l'éventuelle oxydation des lipides.

## IV.2- Matériels et Méthodes

### IV.2.1- Cellules

Les modèles cellulaires utilisés sont deux souches de cellules d'ovaire de hamster (CHO); la souche *IdIA7* sauvage dont les caractéristiques se résument par une absence d'expression du récepteur des LDL et une faible expression du récepteur des VLDL, et les cellules CHO *hVa7*, *p7* qui expriment le VLDLR humain et sont déficientes en LDLR. Ces cellules ont été fournies par le Pr. Lawrence Chan (Houston, Texas)

### IV.2.2- Radiomarquage de l'apoE et Préparation des liposomes

Le protocole de radiomarquage est établi selon les instructions du fournisseur (Pierce) et peut être résumé de la façon suivante :

- ①- Juste avant l'utilisation, laver une ou plusieurs billes (Iodo-Beads<sup>®</sup>) avec 500 µl du tampon d'iodation (fourni avec le kit) par bille.
- ②- Ajouter le(s) bille(s) à la solution de Na<sup>125</sup>I (aproximativement 1mCi par 100µg de protéine) diluée avec le tampon d'iodation et laisser agir 5 minutes.
- ③- Dissoudre ou diluer la protéine à radiomarquer dans le tampon et ajouter à la solution de Na<sup>125</sup>I. Incuber 2 à 15 minutes (Pour connaître le temps optimal de réaction consulter la notice du fabricant (Pierce)).
- ④- Arrêter la réaction en enlevant le(s) bille(s) que l'on peut laver avec du PBS pour récupérer les protéines qui s'y adhéreraient.
- ⑤- La filtration en gel est utilisée pour éliminer l'excès de Na<sup>125</sup>I ou les molécules <sup>125</sup>I<sub>2</sub> non incorporées par la protéine iodée. Utiliser de préférence les colonnes Pierce's Presto<sup>®</sup> Desalting. Alternativement, dialyser contre du PBS en utilisant les cassettes de dialyse Pierce Slide-A-Lyser<sup>™</sup> (Produit No. 66424).

L'activité spécifique des <sup>125</sup>I- VLDL devrait être entre 100 et 300 cpm/ng de protéines.

L'apoE recombinante a été incorporée dans un complexe lipidique de phospholipide dimyristoyl-phosphatidyl-choline (DMPC) (Sigma) avec un rapport de masse DMPC/ApoE 3/1 selon le protocole schématique suivant :

- ⇒ Peser le DMPC dans un eppendorf et dissoudre en vortexant dans 1ml de chloroforme.
  - ⇒ Sécher sous flux d'azote puis sécher sous vide au moins 2 heures.
  - ⇒ Ajouter jusqu'à une concentration de 10 mg DMPC/ml du tampon :  
Tris 10mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 g/l.
  - ⇒ Vortexer et en même temps porter la solution à 25°C
  - ⇒ Incuber 30 min à température ambiante
  - ⇒ Soniquer (90W) 30 minutes à 25°C sous flux d'azote. Après sonication, la solution est plus ou moins claire.
  - ⇒ Ajouter la quantité voulue de protéines en respectant un rapport massique DMPC/ApoE 3/1 (m/m). et mélanger doucement (Ne plus vortexer à partir de cette étape)
  - ⇒ Effectuer 3 cycles autour de la température de transition du DMPC (23°C); une phase à 30°C, suivie d'une phase à 15°C (3 fois).
  - ⇒ Séparer l'apoE libre de l'apoE-liposomes par ultracentrifugation de flottaison en utilisant l'appareil Beckmann TL 100 (tube polypropylène transparents de 3 ml) dans les conditions suivantes : 5 heures à 25°C, 55000 RPM, 9 min accélération / 9 min décélération.
- Pour 5 ml de complexes apoE-liposomes ajouter 0,95g de NaBr en poudre.
- ⇒ Mettre dans le tube à centrifuger 1,9 ml de complexes puis 1ml de tampon de  $d=1.125$  (77.31 g de NaBr dans la solution  $d=1.006$  (11.42 g NaCl, EDTA 0.01%, Azide de Na 0.05% dans 1 l litre d'eau).
  - ⇒ Récupérer la phase supérieure (laiteuse). Doser les protéines dans les deux phases pour calculer le rendement.
  - ⇒ Dialyser contre du PBS 2 fois 2 heures, puis 1fois toute la nuit.
  - ⇒ Redoser les protéines après dialyse puis conserver à - 20°C.
- (Eviter de congeler / décongeler les liposomes plus d'une fois et ne jamais vortexer)

#### IV.2.3- Préparation du sérum humain dépourvu de lipoprotéines

Le sérum humain dépourvu de lipoprotéines (LPDS) utilisé pour la culture des cellules CHO est préparé selon le protocole suivant :

- ⇒ Mélanger 80 ml d'un pool de sérum frais avec 20 ml de la solution de densité 1.291g/l (510g NaBr dans 1 litre de la solution de densité 1.006 g/l) pour amener le sérum à une densité finale de 1.063 g/l.
- ⇒ Distribuer dans des tubes de 10 ml adaptés au rotor 50.3 TI Beckman, centrifuger (20 heures, 38 000 rpm, 4°C)
- ⇒ Aspirer la phase supérieur (VLDL, IDL, LDL), rassembler les phases inférieures et ajouter du KBr (220mg/ml), agiter doucement.
- ⇒ Distribuer dans des tubes de 10 ml adaptés au rotor et centrifuger 48 heures dans les mêmes conditions qu'auparavant.
- ⇒ Enlever la phase supérieure (HDL), rassembler les phases inférieures et dialyser 2 jours contre 3 x 5l de la solution de dialyse.
- ⇒ Préfiltrer avec des filtres HV 0.45 $\mu$  .
- ⇒ Stériliser par filtration (Millipore Millex GV 0.22 $\mu$ )
- ⇒ Chauffer au bain marie, 30 min à 56°C afin d'inactiver toute activité enzymatique

#### IV.2.4- Culture des cellules CHO et étude d'affinité aux liposomes-apoE

Les cellules transfectées sont maintenues dans un incubateur sous 5 % CO<sub>2</sub> à 37°C dans un milieu de culture Ham's F-12 supplémenté de 5 % de sérum de veau nouveau-né, de streptomycine sulfate (100  $\mu$ g/ml), de pénicilline (100 U/ml) et de la généticine (G418) 400  $\mu$ g/ml (Takahashi et al, 1995). Les expériences d'affinités des liposomes pour les cellules CHO sont réalisées dans des plaque 24 puits à une densité de 1x10<sup>5</sup> cellules/puit. Les liposomes marqués à l'<sup>125</sup>I sont ajoutés après deux jours de culture dans le milieu Ham's F-12 supplémenté avec 5 % de sérum déficient en lipoprotéines (LPDS).

Après incubation pendant 4 heures à 4°C, l'association des <sup>125</sup>I-lipoprotéines aux cellules est quantifiée à l'aide des mesures de la radioactivité associée aux cellules après lyse de ces

dernières par la soude (NaOH 1N). Les valeurs sont rapportées aux protéines cellulaires quantifiées dans la fraction de lyse.

#### IV.3- Résultats et discussion

Les principaux résultats de ce travail montrent que l'affinité des apoE incorporées dans les liposomes dépend de la nature polymorphique de l'apoE. D'après la courbe d'affinité de ces liposomes (Fig 33), les liposomes -  $^{125}$ I-ApoE3 présentent une meilleure affinité pour les récepteurs que les liposomes associés aux isoformes ApoE4 et ApoE2. Ces résultats sont attribués essentiellement au récepteur des VLDL humains. En effet, d'une part les cellules CHO utilisées sont déficientes en l'expression du récepteur des LDL, d'autre part, nous avons tenu compte des affinités dues aux cellules CHO sauvages témoins (déficientes en LDLR et exprimant peu de VLDLR de hamster) qui montre de très faibles liaisons (Fig 34) qui peuvent être associées à la présence d'autres récepteurs, par exemple le LRP qui est capable de lier les liposomes-ApoE.

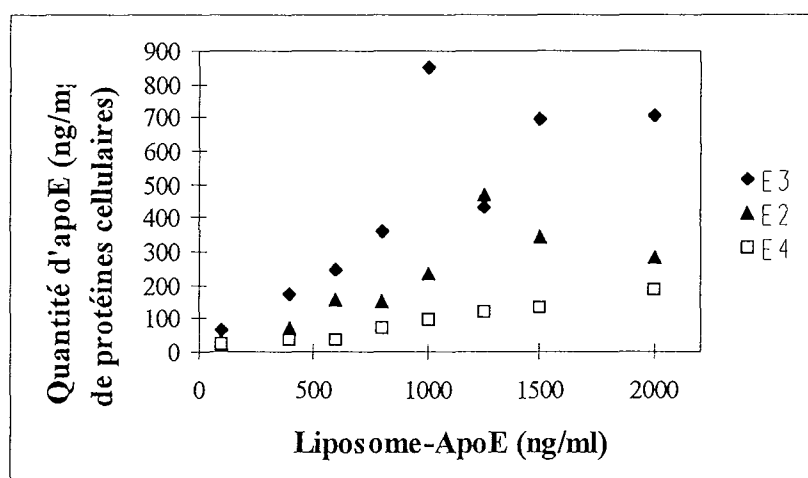


Fig. 33- Effet du polymorphisme génétique de l'apoE sur la liaison des liposomes- $^{125}$ I-ApoE aux cellules CHO surexprimant le VLDLR humain.

En parallèle à nos résultats, Guillaume et ses collaborateurs (Guillaume et al, 1996) ont montré la même tendance (plus affinité avec l'apoE3 que l'apoE4) pour les liposomes associés à l'apoE humaine sur les neurones, contrairement à leur expérience réalisée sur les astrocytes. Dans ces derniers, des liposomes enrichis en isoformes E3 et E4 ont une affinité similaire pour



les récepteurs cellulaires. La nature des cellules utilisées dans ces expériences ne permettant pas d'attribuer les résultats à tel ou tel récepteur, les auteurs ont expliqué cette différence de comportement entre les deux types cellulaires par une expression distincte des récepteurs de l'apoE (LRP, LDLR, VLDLR). En revanche, nos résultats obtenus avec des cellules transgéniques surexprimant le VLDLR, pourraient apporter une explication à ces travaux, en attribuant aux VLDLR cette « préférence » vis-à-vis l'apoE3. L'expression de ce récepteur par les neurones est établie (Christie et al, 1996).

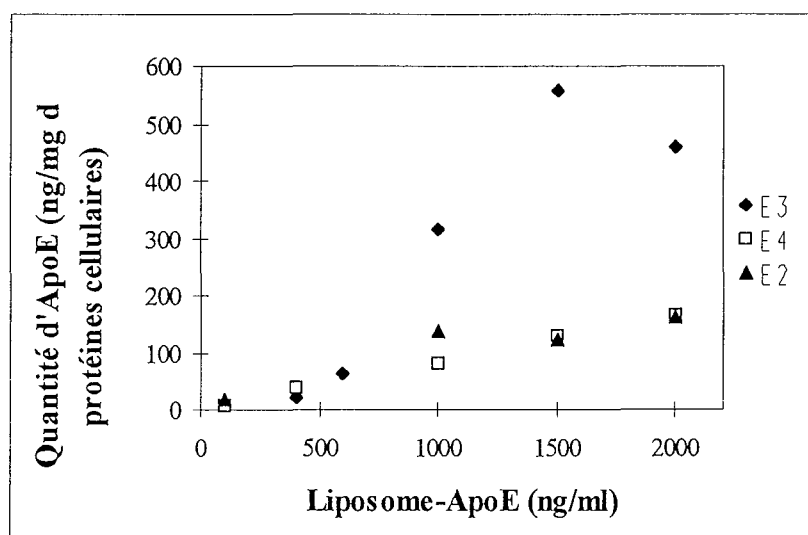


Fig. 34- Effet du polymorphisme génétique de l'apoE sur la liaison des liposomes-<sup>125</sup>I-ApoE aux cellules CHO surexprimant le VLDLR humain, après soustraction des affinités dues aux cellules CHO contrôles qui sont caractérisées par une absence d'expression du récepteur des LDL et une faible expression du récepteur des VLDL.

La différence d'affinité obtenue par les auteurs entre les neurones et les astrocytes pourrait être expliquée par une combinaison différente de VLDLR à la surface cellulaire. Nous notons que la plus grande affinité rencontrée ici des liposomes-ApoE3 par rapport aux liposomes-ApoE4 ne corrobore pas avec nos précédents résultats obtenus, concernant l'affinité du récepteur des LDL et des particules VLDL humaines isolées (Bohnet et al, 1996) et qui montrent une meilleure affinité des VLDL-apoE4/4 par rapport aux VLDL-apoE3/3. L'explication de cette différence de comportement est probablement due à une différence des sites de reconnaissance de l'apoE vis-à-vis les deux récepteurs. En effet, Takahashi et ses collaborateurs (1996) ont montré, en utilisant un anticorps anti-apoE ayant la propriété d'inhiber la liaison de l'apoE3 au

récepteur des LDL, que cet anticorps n'est pas capable d'inhiber la liaison des VLDL-apoE3/3 ni celle des VLDL-apoE2/2 vis-à-vis du récepteur des VLDL. Les auteurs ont proposé que la région de la molécule d'apoE qui se lie au VLDLR soit différente de celle reconnue par le LDLR. Ils ont suggéré que le site de reconnaissance du VLDLR soit localisé au niveau des résidus 132 à 144 de l'apoE, le site de reconnaissance du LDLR est localisé au niveau de la région 136 à 150 de l'apoE. Nous rappelons que la différence structurale entre les deux récepteurs se situe au niveau du nombre de répétitions riche en cystéine localisées du côté N-terminal (voir Fig. 10). Le VLDLR contient 8 répétitions, le LDLR n'en contient que 7.

#### **IV.4- Conclusion**

Le récepteur des VLDL pourrait jouer un rôle important dans la modulation des effets polymorphiques de l'apoE dans les conditions physiologiques ainsi que dans la MA. En effet le VLDLR a été détecté dans les plaques séniles des patients atteints de la MA (Christie et al, 1996), tout comme un autre récepteur le LRP. Toutefois, la découverte d'autres récepteurs exprimés par les cellules du SNC, tels que le LDLR, LRP, et récemment le LR7/8B rendent la compréhension de la régulation des fonctions de l'apoE *in vivo* complexe et difficile. Ces résultats préliminaires vont être approfondis et élargis par l'utilisation d'autres types cellulaires et d'autres récepteurs ainsi que par l'utilisation d'animaux transgéniques adéquats.

# *DISCUSSION GENERALE*

## DISCUSSION GENERALE

Il est actuellement établi que l'apolipoprotéine E est le facteur de risque génétique le plus important de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, ses implications dans l'étiologie de la MA ne sont pas bien définies. Dans cette étude, nous avons approfondi les variations quantitatives et qualitatives de l'apoE et identifié d'autres marqueurs protéiques qui pourraient participer avec cette protéine au schéma physiopathologique de la MA. Dans ce but, nous avons étudié des marqueurs biochimiques et génétiques, principalement dans le liquide céphalorachidien (apoE, D, TTR, actine), mais également dans le plasma (apoAI). Ces études ont été suivies par des investigations *post mortem* au niveau du cerveau, concernant l'abondance des plaques séniles et leur composition protéique (apoE, apoAI, TTR). Finalement, nous avons initié des études d'affinité des apolipoprotéines E humaines, produites par génie génétique, associées aux liposomes vis-à-vis du récepteur humain des VLDL transfecté dans des cellules CHO. Les principaux résultats sont résumés dans le tableau suivant:

**Tableau 13-** Sommaire des résultats obtenus dans cette étude

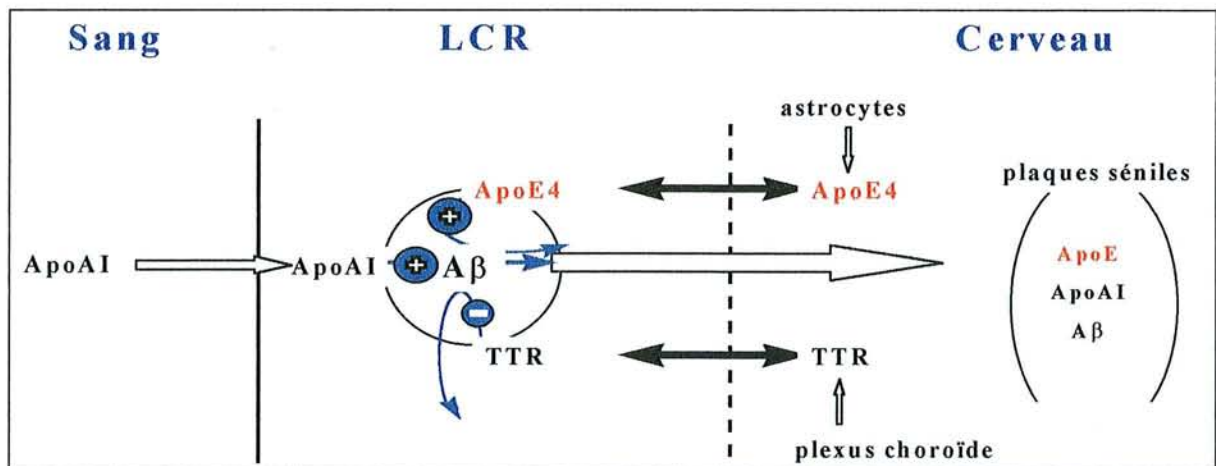
Marqueurs étudiés	Lieu / compartiment	Résultats principaux
<b>ApoE</b>	LCR	↑↑ avec l'âge, ↑↑ avec la MA, ↑↑ avec l'inflammation
	cerveau	présence abondante dans les plaques séniles
<b>ApoD</b>	LCR	↑↑↑ avec la MA corrélée (++) avec la dose de l'allèle ε4
	LCR	↓↓ avec la MA corrélée (-) avec le nombre des plaques séniles corrélée (+) avec la quantité d'actine
<b>TTR</b>	LCR	↓ avec la MA absence dans les plaques séniles
	cerveau	absence dans les plaques séniles
<b>Actine</b>	LCR	corrélée (+) avec la dose de l'allèle ε4 corrélée (+) avec la quantité de TTR
	LCR	corrélée (+) avec la quantité de TTR
<b>ApoAI</b>	sérum	↓↓↓↓ avec la MA corrélée (++) avec le score mental (MMS)
	cerveau	présence abondante dans les plaques séniles
<b>ApoAIV</b>	ADN	allèle (360:His) ↑↑ avec l'âge pas d'effet spécifique sur la MA
<b>ApoEs recombinantes</b>	liposomes	affinités au récepteur VLDL : E3>E4≥E2

Nous pouvons analyser l'ensemble de ces résultats suivant trois processus physiopathologiques (Fig 35-37): le métabolisme du peptide amyloïd  $\beta$ , la biochimie du cytosquelette et la régénération neuronale. Certains marqueurs peuvent être impliqués dans plus d'un de ces processus.

**1) Métabolisme du peptide amyloïd  $\beta$  :** Les protéines étudiées et qui semblent être impliquées dans ce mécanisme sont l'apoE, la TTR et l'apoAI (Fig 35). Les trois protéines ont une affinité vis-à-vis de ce peptide et leur association respective peut être gouvernée par un équilibre qui permet d'assurer la solubilité du peptide  $A\beta$  et son élimination physiologique. Dans certaines conditions pathologiques, le peptide  $A\beta$  peut s'agréger et former des plaques séniles. Nous analysons les résultats en tenant compte de ces conditions pathologiques :

*Comment expliquer les situations pathologiques associées à une diminution de la TTR dans le LCR mais à une augmentation de l'apoE, une diminution de l'apoAI plasmatique et à la présence abondante des apoE et AI mais l'absence de TTR dans les plaques séniles du cerveau?*

*Comment expliquer que le nombre des plaques séniles augmente avec le nombre d'allèle  $\epsilon 4$  mais diminue avec la concentration céphalorachidienne de la TTR?*



**Fig 35-** Régulation de la solubilité du peptide  $\beta$  amyloïde ( $A\beta$ ) par la transthyréine (TTR) et les apoAI et E. Les signes (+/-) correspondent à un rôle catalyseur (apoAI et E4) ou inhibiteur (TTR) de l'agrégation de l' $A\beta$  et de la formation des plaques séniles

Dans le LCR, l'apoE et la TTR sont d'origine quasi-cérébrale, l'apoAI est majoritairement plasmatique. Les deux apolipoprotéines ont des propriétés structurales et conformationnelles amyloïdogéniques pouvant favoriser l'agrégation de l'A $\beta$  et la formation des plaques séniles. La diminution de la quantité plasmatique de l'apoAI, sa corrélation négative avec la sévérité de la maladie d'Alzheimer, ainsi que sa présence dans les plaques séniles, laissent supposer une origine systémique de l'apoAI dans le cerveau des patients. Ce transit du sérum vers le LCR peut concerner l'apoAI sous une forme complexée au peptide A $\beta$  dans une structure lipoprotéique (avec l'apoJ par exemple) ou libre. Ce transport pourrait avoir lieu dans les conditions physiologiques dans le cadre d'un apport lipidique vers le cerveau (voir partie 3) mais qui reste à vérifier.

La TTR, quant à elle, semble avoir un rôle protecteur contre la formation de  $\beta$  amyloïde. Sa diminution dans le LCR pourrait créer un déséquilibre au niveau de la solubilité du peptide A $\beta$  et favoriser la création des dépôts séniles (Fig 35). Ces propriétés semblent s'opposer à l'action de l'isoforme E4 de l'apoE qui pourrait lui, catalyser l'agrégation amyloïde.

**2) Régulation du cytosquelette:** Les protéines impliquées dans ce processus sont : l'apoE, la TTR et l'actine (Fig 36). Rappelons que l'actine est le composant majeur du réseau cytosquelettal de protéines fibrillaires attachées à l'intérieur de la membrane plasmatique et se trouve dans un état d'équilibre entre une forme globulaire soluble (G) et une forme fibrillaire (F) insoluble. La thyroxine est une des hormones capable de modifier l'équilibre entre l'assemblage et le désassemblage de l'actine.

Nous avons étudié la relation entre l'actine et la TTR en raison de la place de cette dernière dans le transport de la thyroxine vers les cellules nerveuses à travers la circulation du LCR. L'apoE a également un rôle important dans la biochimie du cytosquelette grâce à ses affinités vis-à-vis plusieurs composants de ce dernier, telles que l'actine, la protéine *tau* et la protéine *MAP2* (Fleming et al, 1996).

Nous avons montré que la quantité d'actine dans le LCR augmente avec la présence de l'allèle  $\epsilon$ 4. L'état d'équilibre de l'actine est donc déplacé en faveur de la forme soluble présente dans le LCR, et qui pourrait refléter les altérations du cytosquelette qui accompagnent la MA. L'apoE4 pourrait avoir une contribution négative à la stabilité générale du cytosquelette. En effet, l'assemblage et l'intégrité des microtubules sont inhibés par la



D'autre part, l'affinité de la TTR vis-à-vis de ses récepteurs cellulaires augmente si elle est présente sous sa forme complexée à la thyroxine (Divino and Schussler, 1990a).

En tenant compte de ces situations, nous proposons un schéma mécanistique qui se résume de la façon suivante: un métabolisme plus rapide de la TTR complexée à la thyroxine, une livraison hormonale plus rapide et par conséquent une déstabilisation moins importante des filaments d'actine (Fig 36). Néanmoins, cela n'est probablement pas suffisant à maintenir l'intégrité cellulaire étant donné les conditions biochimiques défavorables : faible quantité de TTR, solubilité du peptide A $\beta$  (partie 1) et réparation neuronale (partie 3) affectées.

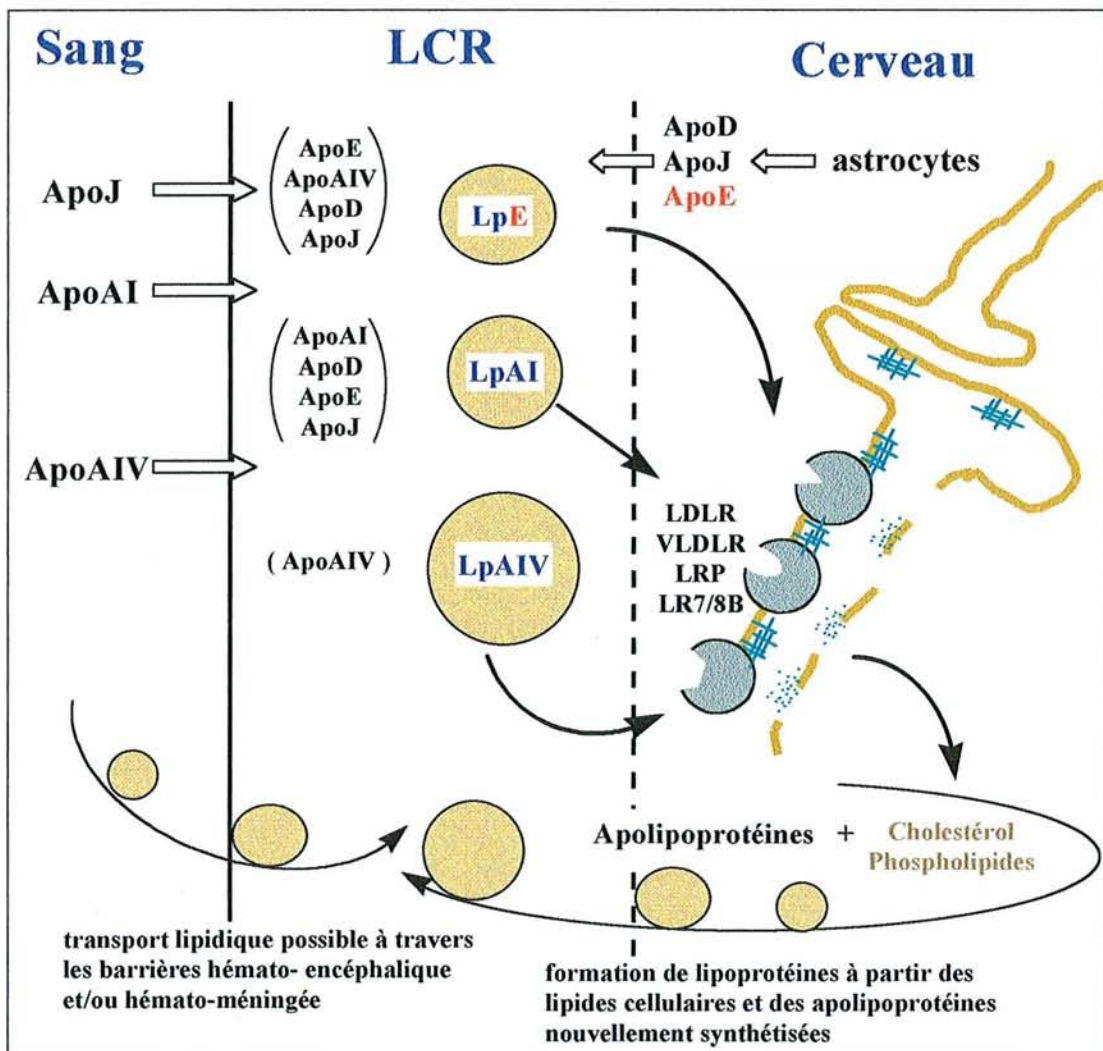
**3) Réparation neuronale et remodelage synaptique :** Ce processus est assuré par les apo D, E, AI et AIV via des voies spécifiques de récepteurs (Fig 37). La concentration céphalorachidienne des deux premières augmente dans la MA. La concentration sérique de l'apoAI diminue considérablement avec la MA et est fortement associée à la sévérité de cette maladie. L'apoAIV a été étudié au niveau génétique, la fréquence de son allèle apoAIV (360 :His) augmente avec l'âge indépendamment de la MA. L'affinité des apoEs humaines recombinantes pour le récepteur des VLDL a été également étudiée et une meilleure affinité de l'isoforme E3 par rapport aux autres a été constatée.

Nous rappelons que les apoD et E sont majoritairement synthétisées dans le cerveau, les apoAI et AIV sont plutôt d'origine plasmatique. Trois populations de lipoprotéines ont été identifiées dans le LCR : CSF-LpAI, CSF-LpE et CSF-LpAIV (Borghini et al, 1995). La première est composée majoritairement d'apoAI mais également d'apoD, E et J, la deuxième majoritairement en apoE mais de faibles quantités d'apoAIV, D et J. La dernière contient essentiellement de l'apoAIV (Fig 37).

L'augmentation des apoD et E dans le LCR est probablement la conséquence d'une synthèse importante de ces deux apolipoprotéines dans le cerveau. Cette production pourrait refléter un processus de réparation et de régénération cellulaire sans pour autant assurer une assimilation optimale des lipides cellulaires. En effet, nous notons que la quantité d'apoD dans le LCR augmente avec le nombre d'allèle  $\epsilon$ 4, ce qui pourrait refléter un ralentissement ou une inhibition du métabolisme des lipoprotéines contenant l'apoD (CSF-LpAI et/ou CSF-LpE) dans l'environnement biochimique lié à la présence de l'apoE4.



Il est clair que la composition des lipoprotéines influence leur métabolisme et leur assimilation dans les conditions de régénération cellulaire. La nature des récepteurs exprimés par les cellules permet d'orienter le métabolisme de lipoprotéine. En effet, les neurones ont plus d'affinité pour les liposomes contenant l'isoforme ApoE3 (Guillaume et al, 1996), et nos résultats attribuent « cette préférence » à une expression plus importante de VLDLR par ces cellules. Dans ces conditions, il est concevable d'imaginer que les lipoprotéines contenant l'apoE4 ne peuvent pas être bien métabolisées par les neurones dans des conditions où le recyclage des lipides est capital.



**Fig. 37-** Modèle de régénération neuronale et remodelage synaptique et implication des apolipoprotéines AI, AIV, D et E. L'origine de synthèse de chaque apolipoprotéine ainsi que la source possible de formation des lipoprotéines dans le LCR sont schématisés.

Dans la même optique, nous analysons les résultats obtenus avec les apoAI et AIV.

Le transport des lipides du plasma vers le cerveau n'est pas bien établi mais reste fort probable, en raison de la présence de récepteurs de lipoprotéines, tels que le LDLR et le gp330, au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Meresse et al, 1989, Zheng et al, 1994 ; Zlokovic et al, 1996). Les diminutions de la concentration sérique de l'apoAI, apolipoprotéine qui semble traverser facilement la barrière hémato-encéphalique, pourrait refléter des diminutions d'une source potentielle de lipide pour le système nerveux central.

Concernant l'apoAIV, nos résultats montrent une fréquence plus importante de l'allèle apoAIV(360 :His) chez les personnes âgées par rapport à la population jeune mais reste sans effet sur la MA. Nous expliquons ces résultats par les propriétés que peut avoir cet allèle dans l'activation de la LCAT, le transport reverse du cholestérol et en générale une meilleure contribution à un métabolisme lipidique moins athérogène. De plus, il est concevable de proposer une meilleure capacité de recyclage lipidique dans les conditions d'altérations physiologiques liées au vieillissement mais qui semble être inefficace ou insuffisante dans les conditions de dégénérescence liées à la MA.

## *CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

## Conclusion et perspectives

L'examen de la composition du LCR permet d'apporter un nombre considérable d'informations que nous avons analysées ici en parallèle avec les données cliniques et histologiques mais aussi avec les données génétiques. Nous avons obtenu des résultats importants concernant les variations physiologiques et pathologiques de l'apoE dans la MA mais également d'autres marqueurs comme l'apoD, la TTR et l'actine. Nous avons mis en évidence un marqueur sérique, l'apoAI, dont la concentration est très affectée dans la MA et liée étroitement à la sévérité de cette maladie. Nous avons discuté l'intérêt de tous ces marqueurs dans la compréhension de l'étiologie de cette maladie ainsi que les applications pharmacologiques et thérapeutiques.

Nos résultats montrent que, dans l'interprétation des variations de la concentration de l'apoE dans le LCR, doivent être prises en compte des paramètres biologiques (âge, population), cliniques (composition du groupe contrôle et nature des maladies incluses) et génétiques (en apoE) qui pourraient influencer les variations de la concentration de l'apoE et expliquer les résultats contradictoires obtenus dans la littérature .

En parallèle à l'apoE, l'étude d'autres facteurs biochimiques et la prise en compte des données immunohistochimiques nous a permis de mieux comprendre le rôle de cette protéine multifonctionnelle au niveau de la biochimie du cytosquelette, du métabolisme lipidique et de la remobilisation du cholestérol, et de la solubilité du peptide  $\beta$ -amyloïde.

Nos résultats suggèrent une implication physiopathologique multifacette de l'isoforme E4 de l'apoE, facteur de risque génétique le plus important de la MA. Les données biochimiques rapportées décrivent un environnement biochimique favorable à la formation des plaques séniles et des capacités plus faibles de réparation ou de régénération neuronale, liées probablement à des anomalies au niveau de la biochimie du cytosquelette et à des problèmes de recyclage des lipides cellulaires.

Les données de la composition du LCR, en apolipoprotéines notamment, doivent être prises en considération et analysées dans le cadre et l'environnement physiologiques des lipoprotéines. L'analyse de la composition des lipoprotéines isolées et l'étude de leur propriétés fonctionnelles par rapport aux récepteurs cellulaires est une approche qui s'impose. Toutefois, les problèmes éthiques qui entourent les prélèvements du liquide céphalorachidien limitent les études de ses lipoprotéines bien qu'elles puissent être performantes. Néanmoins, ces études de récepteurs sont nécessaires pour approfondir certains aspects fonctionnels de nos hypothèses. Nous projetons d'utiliser les animaux transgéniques qui deviennent, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, une approche incontournable dans les investigations futures du rôle des récepteurs dans les maladies cardio- et cérébro-vasculaires.

L'accès aux données de l'imagerie cérébrale anatomique et fonctionnelle et leur combinaison avec les données biochimiques et génétiques actuelles, sont également de bonnes perspectives, vu la force des liens avec ces données et la richesse des informations que l'on peut obtenir. Il est évident que cette stratégie nécessite des collaborations étroites entre cliniciens et chercheurs pour affronter, ensemble, les problèmes que posent, de plus en plus, les maladies neurodégénératives à notre société.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aggerbeck LP, Wetterrau JR, Weisgraber KH, Wu G-S C and Lindgren FT. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxy-terminal domains. *J Biol Chem* 1988, 263: 6240-6248.
- Aimé-Genty N. Le cerveau, Dictionnaire Encyclopédique. In *Vuibert (Ed)*, Paris, France. 1997, pp : 63- 64.
- Akiyama H, Ikeda K, Kondo H and McGeer PL. Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1992, 146(2): 152-154
- Allan CM, Fidge NH and Kanellos J. Antibodies to the carboxy terminus of human apolipoprotein A-I. The putative cellular binding domain of high density lipoprotein 3 and carboxy-terminal structural homology between apolipoprotein A-I and A-II. *J Biol Chem* 1992, 267(19): 13257-13261.
- Alstiel L, Lawlor B, Johannessen D, Mohs R and Davis SK. Acute phase reactants in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1992, S27.
- Amouyel P, Brousseau T, Fruchart JC and Dallongeville J. Apolipoprotein E-ε4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993, 342: 1309.
- Anderson NL and Anderson NG. High resolution two dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74: 5421-5424.
- Appleyard ME and Mc Donald B. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid from different levels of the neuraxis of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992, 55(11): 1074-1078.
- Arai H, Terajima M, Miura M, Higuchi S, Muramatsu T, Machida N, Seiki H, Takase S, Clark CM and Lee VM. Tau in cerebrospinal fluid : a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995, 38(4): 649-652.
- Arinami T, Takekoshi K, Yanagi H, Hamamoto M, Hamaguchi H. The 5-repeat allele in the very-low-density lipoprotein receptor gene polymorphism is not increased in sporadic Alzheimer's disease in Japanese. *Neurology* 1996, 47(5): 1349-1350.
- Atack JR. Cerebrospinal fluid neurochemical markers in Alzheimer's disease. In *Biological markers of Alzheimer's disease. F Boller et al. (Ed)* Springer-Verlag, Berlin, 1989, pp: 1-16.

- Balbin M, Freije JMP, Fueyo A, Sanchez LM, and Lopez-Otin C. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with breast gross cystic disease. *Biochemistry* 1990, 271: 803-807.
- Barbier A, Visvikis A, Mathieu F, Diez L, Havekes LM and Siest G. Characterization of three human apolipoprotein E isoforms (E2, E3 and E4) expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997, 35(8): 581-589.
- Basun H, Forssell LG, Wetterberg L and Winblad B. Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1991, 3(4): 231-58.
- Beal MF and Growdon JH. CSF neurotransmitter markers in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1986, 10(3-5): 259-70.
- Beffer U and Poirier J. Apolipoprotein E, plaques, tangles and cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1996, 777: 166-174.
- Begley DJ. The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J Pharm Pharmacol* 1996, 48: 136-146.
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J and Stanley KK. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 1989, 341(6238):162-164
- Berr C, Hauw JJ, Delaere P, Duyckaerts C and Amouyel P. Apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 is linked to increased deposition of the amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) in cases with or without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994, 178: 221-224
- Bissette G and Myers B. Somatostatin in Alzheimer's disease and depression. *Life Sci* 1992, 51(18): 1389-410.
- Blaco-Vaca F, Via DP, Yang C-Y, Massey JB and Pownall HJ. Characterization of disulfide linked heterodimers containing apoD an plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1992, 33(12): 1785-1796.
- Blain H, Jeandel C, Merched A, Visvikis S and Siest G. Apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid increases with aging. *J Am Geriatr Soc* 1997, 45(12):1536.
- Blennow K, Davidsson P, Wallin A and Ekman R. Chromogranin A in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for synaptic degeneration in Alzheimer's disease? *Dementia* 1995 6(6): 306-311.
- Blennow K, Davidsson P, Wallin A, Gottfries CG, Svennerholm L. Ubiquitin in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int Psychogeriatr* 1994a, 6(1): 13-22.



- Blennow K, Hesse C, Fredman P. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is reduced in Alzheimer's disease. *NeuroReport* 1994b, 5: 2534-2536.
- Blennow K, Wallin A, Davidsson P, Fredman P, Gottfries CG, Svennerholm L. Intra-blood-barrier synthesis of immunoglobulins in patients with dementia of the Alzheimer type. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1990, 4(2): 79-86.
- Blennow K, Wallin A, Gottfries CG, Lekman A, Karlsson I, Skoog I and Svennerholm L. Significance of decrease lumbar CSF of HVA and 5-HIAA in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1992a, 13(1): 107-113
- Blennow K, Davidsson P, Wallin A, Fredman P, Gottfries CG, Mansson JE and Svennerholm L. Differences in cerebrospinal fluid gangliosides between "probable Alzheimer's disease" and normal aging. *Aging* 1992b, 4(4): 301-306.
- Blomberg M, Jeansen M, Basun H, Lannfelt L and Wahlund L-O. Increasing cerebrospinal fluid tau levels in a subgroup of Alzheimer's patients with apolipoprotein E allele  $\epsilon 4$  during 14 months follow-up. *Neurosci Lett* 1996, 214 : 1163-1166.
- Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H and Riederer P. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995, 202: 17-20.
- Boerwinckle E, Visvikis S, Welsh D, Steinmetz J, Hanash S and Sing CF. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. The role of the apolipoprotein E polymorphisms in determining levels, variability and covariability of cholesterol, beta-lipoprotein and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am J Med Genet* 1987, 27: 567-582.
- Bohnet K, Pillot T, Visvikis S, Sabolovic N and Siest G. Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors. *J Lipid Res* 1996, 37(6): 1316-1324.
- Borghini I, Barga F, Pometta D and James RW. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Acta* 1995, 1255: 192-200.
- Boyles JK, Notterpek LM and Anderson LJ. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, 1990, 265 : 17805-17815.

- Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW and Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 1985, 76: 1501-1513.
- Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Piats RE, Weisgraber KH, Hui DY and Mahley RW, Gebicke-Haerter PJ, Ignatius MJ and Shooter EM. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest* 1989, 83: 1015-1031.
- Bracco F, Scarpa M, Rigo A and Bastistin L. Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991, 196(1): 36-41.
- Brane G, Gottfries CG, Blenow K, Karlsson I, Lekman A, Parnetti L, Svennerholm L and Wallin A. Monoamine metabolites in cerebrospinal fluid and behavioral ratings in patients with early and late onset of Alzheimer dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1989, 3(3): 148-156.
- Breitner JCS, Gau BA, Welsch KA, Plassman BL, Mc Donald WM, Helms MJ and Anthony JC. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 1994, 44: 227-232.
- Brown MS, Herz J and Goldstein JL. LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature* 1997, 388(6643):629-630
- Brown MS and Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986, 232: 192-200.
- Brugge K, Katzman R, Hill LR, Hansen LA and Saitoh T. Serological  $\alpha$ 1-antichymotrypsin in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1992; 32(2): 193-197.
- Cacabelos R, Barquero M, Garcia P, Alvarez XA, Varela DE and Seijas E. Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta (Il-1 beta) in Alzheimer's disease and neurological disorders. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1991, 13: 455-458.
- Camato R, Marcel Y, Milne R, Lussier-Cacan S and Weech P. Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J Lipid Res* 1989, 30: 865-875.
- Cameron BM, VanderPutten DM, Merrill CR. Preliminary study of an increase of a plasma apolipoprotein E variant associated with peripheral nerve damage. A finding in patients with chronic spinal pain. *Spine* 1995, 20(5): 581-589.
- Campbell, AJ, Busby WJ and Robertson MC. Over 80 years and no evidence of coronary heart disease: characteristics of a survivor group. *J. Amer. Geriatr. Soc.* 1993, 41: 1333-1338.

- Carlsson J, Armstrong VW, Reiber H, Felgenhauer K and Seidel D. Clinical relevance of the quantification of apolipoprotein E in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 1991, 196: 167-176.
- Chajek T and Fielding CJ. Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75: 3445-3449.
- Chao YS, Pickett CB, Yamin TT, Guo LS, Alberts AW and Kroon PA. Phenobarbital induces rat liver apolipoprotein A-I mRNA. *Mol Pharmacol* 1985, 27(3): 394-398
- Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Perez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V, et al. Apolipoprotein E,  $\epsilon 4$  allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease; analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* 1994, 3(4): 569-574.
- Choi-Miura NH, Ihara Y, Fukuchi K, Takeda M, Nakano Y, Tobe T and Tomita M. SP-40,40 is a constituent of Alzheimer's amyloid. *Acta Neuropathol* 1992, 83 :260-264.
- Chong JK, Miller BE and Ghanbari HA. Detection of amyloid beta protein precursor immunoreactivity in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *Life Sci* 1990, 47(13): 1163-71.
- Christie RH, Chung H, Rebeck GW, Strickland D, and Hyman BT. Expression of the very low-density lipoprotein receptor (VLVL-r), an apolipoprotein-E receptor, in the central nervous system and in Alzheimer's disease. *J Neuropath Exp Neurol* 1996, 55(4): 491-498.
- Chung H, Roberts CT, Greenberg S, Rebeck GW, Christie R, Wallace R, Jacob HJ and Hyman BT. Lack of association of trinucleotide repeat polymorphisms in very-low-density lipoprotein receptor gene with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996, 39(6): 800-803.
- Clatworthy AE, Gomez-Isla T, Rebeck GW, Wallace RB and Hyman BT. Lack of association of a polymorphism in the low-density lipoprotein receptor-related protein gene with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1997, 54(10): 1289-1292.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, Small GW, Roses AD, Haines JL and Pericak-Vance MA. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele decreases risk of late onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 1994, 7: 180-183.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL and Pericak-Vance MA. Gene dose of Apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993, 261: 921-923.

- Cross D, Vial C, and Maccioni RB. A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cell lines. *J Cell Biol* 1993, 105: 51-60.
- Crutcher KA, Tolar M, Harmony JAK and Marques MA. A new hypothesis for the role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease pathology. In : Iqbal K; Winblad; Nishimura T ; Takeda M and Wisniewski H. Eds. Alzheimer's disease : Biology, Diagnosis and Therapeutics . New york, John Wiley and Sons Limited : 1997, pp. 543--552.
- Curran M, Middleton D, Edwardson J, Perry R, McKeith I, Morris C, Neill D. HLA-DR antigens associated with major genetic risk for late-onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997, 8(6): 1467-1469.
- Csaszar A, Kalman J, Szalai C, Janka Z and Romics L. Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation in patients with Alzheimer's disease. *Neurosc Lett* 1997, 230 : 151-154.
- Dalton MB and Swaney JB. Structural and functional domains of apolipoprotein A-I within high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1993, 268(26): 19274-19283.
- Davidsson P, Jahn R, Bergquist J, Ekman R and Blennow K. Synaptotagmin, a synaptic vesicle protein, is present in human cerebrospinal fluid: a new biochemical marker for synaptic pathology in Alzheimer disease? *Mol Chem Neuropathol* 1996, 27(2): 195-210
- Davis BM, Mohs RC, Greenwald BS, Mathe AA, Johns CA, Horvath TB and Davis KL. Clinical studies of the cholinergic deficit in Alzheimer's disease. I. Neurochemical and neuroendocrine studies. *J Am Geriatr Soc* 1985, 33: 741-748.
- Davson H, Zlokovic BV, Rakic L and Segal MB. Introduction to the blood-brain barrier. *MacMillan Press, London*, 1993; pp 1-55.
- DeKosky ST, Aston CE and Kamboh MI. Polygenic determinants of Alzheimer's disease: modulation of the risk by alpha-1-antichymotrypsin. *Ann N Y Acad Sci* 1996, 802: 27-34.
- Delamarche C, Berger F, Gallard L and Pouplard-Barthelaix A. Aging and Alzheimer's disease: protease inhibitors in cerebrospinal fluid. *Neurobiol Aging* 1991, 12(1): 71-74.
- Dickson PW, Aldred AR, Menting JG, Marley PD, Sawyer WH and Schreiber G. Thyroxine transport in choroid plexus. *J Biol Chem* 1987, 262(29): 13907-13915.
- Didierjean O, Martinez M, Champion D, Hannequin D, Dubois B, Martin C, Puel M, Thomas Anterion C, Pasquier F, Moreau O, Babron MC, Penet C, Agid Y, Clerget-Darpoux F, Frebourg T, Brice A. No effect of the alpha1-antichymotrypsin A allele in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997, 63(1): 103-105.

- Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W and Haase AT. Neuropathological changes in Scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol* 1991, 65: 4759-4768.
- Divino CM and Schussler GC. Receptor-mediated uptake and internalization of transthyretin. *J Biol Chem* 1990a, 265(3): 1425-1429.
- Divino CM and Schussler GC. Transthyretin receptors on human astrocytoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1990b, 71(5): 1265-1268.
- Doll R. Review: Alzheimer's disease and environmental aluminium. *Age Ageing* 1993, 22: 138-153.
- Doré D. Les lipides et les maladies cardio-vasculaires. In *Biocimie Clinique* (Beaudoin GJ Eds) 1994, pp. 302-376.
- Drayna D, Fielding C, McLean J, Baer B, Castro G, Chen E, Comstock L, Henzel W, Kohr W, Rhee L, Wion K, and Lawn R. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem*, 1986, 261 : 16535-16539.
- Drayna DT, McLean J W, Wion KL, Trent JM, Drabkin HA and Lawn R. Human apolipoprotein D gene : gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha-2mu-globulin superfamily. *DNA* 1987a, 6 : 199-204.
- Drayna DT, Scott JD, and Lawn R. Multiple RFLPs at the human apolipoprotein D (ApoD) locus. *Nucleic Acids Res* 1987b, 15: 9617.
- Duchateau PN, Pullinger CR, Orellana RE, Kunitake ST, Naya-Vigne J, O'Connor PM, Malloy MJ and Kane JP. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. *J Biol Chem* 1997, 272(41): 22576-22582.
- Duyckaerts C, Delaere P, Hauw JJ, Abbamondi-Pinto AL, Sorbi S, Allen I, Brion JP, Flament-Durand J, Duchen L, Kauss J, et al. Rating of the lesions in senile dementia of the Alzheimer type: concordance between laboratories. A European multicenter study under the auspices of EURAGE. *J Neurol Sci* 1990, 97(2-3): 295-323.
- Dyer CA and Curtiss LK. A synthetic peptide mimic of plasma apoE that binds the LDL receptor. *J Biol Chem* 1991, 266: 22803-22806.
- Edmond J, Korsak RA, Moroow JW, Torok-Both G and Catlin DH. Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in the brain of developing rats. *J Nutr* 1991, 121: 1323-1330.

- Edvinsson L, Minthon L, Eckman R and Gustafson L. Neuropeptides in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and dementia with frontotemporal lobe degeneration. *Dementia* 1993, 4(3-4): 167-171.
- Ehmann WD, Markesbery WR, Alauddin M, Hossain TIM and Brubaker EH. Brain trace elements in Alzheimer's disease. *NeuroToxicol* 1986, 7: 197-206.
- Ehnholm C, Tenkanen H, de Knijff P, Havekes L, Rosseneu M, Menzel HJ and Tiret L. Genetic polymorphism of apolipoprotein A-IV in five different regions of Europe. Relations to plasma lipoproteins and to history of myocardial infarction: the EARS study. European Atherosclerosis Research Study. *Atherosclerosis* 1994, 107(2):229-238.
- Eichner JE, Kuller LH, Ferrell RE and Kamboh MI. Phenotypic effects of apolipoprotein structural variation on lipid profiles: II Apolipoprotein AIV and quantitative lipid measures in the healthy women study. *Genet Epidemiol* 1989, 6: 493-499.
- Elble R, Giacobini E and Higgins C. Choline levels are increased in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 1989, 10(1): 45-50.
- Elrod R, Peskind ER, DiGiacomo L, Brodtkin KI, Veith RC and Raskind MA. Effects of Alzheimer's disease severity on cerebrospinal fluid norepinephrine concentration. *Am J Psychiatry* 1997, 154(1): 25-30.
- Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW and Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 203-207.
- Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris GA, Gottesman ME and Robertson EJ. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993, 90: 2375-2379.
- Fallin D, Gauntlett AC, Scibelli P, Cai X, Duara R, Gold M, Crawford F and Mullan M. No association between the very low density lipoprotein receptor gene and late-onset Alzheimer's disease nor interaction with the apolipoprotein E gene in population-based and clinic samples. *Genet Epidemiol* 1997a, 14(3): 299-305.
- Fallin D, Kundtz A, Town T, Gauntlett AC, Duara R, Barker W, Crawford F and Mullan M. No association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) gene and late-onset Alzheimer's disease in a community-based sample. *Neurosci Lett* 1997b, 233(2-3):145-147.

- Fallin D, Reading S, Schinka J, Hoyne J, Scibelli P, Gold M, Crawford F and Mullan M. No interaction between the APOE and the alpha-1-antichymotrypsin genes on risk for Alzheimer's disease. *Am J Med Genet* 1997c, 74(2): 192-194
- Farlow M, Ghetti B, Benson MD, Farrow JS, Van Nostrand WE and Wagner SL. Low cerebrospinal-fluid concentrations of soluble amyloid beta-protein precursor in hereditary Alzheimer's disease. *Lancet* 1992, 340(8817): 453-454.
- Felgenhauer K and Renner E. Hydrodynamic radii versus molecular weight in clearance studies of urine and cerebrospinal fluid. *Ann Clin Biochem* 1977, 14: 100-104.
- Felgenhauer K. Protein size and cerebrospinal fluid composition. *Klin Wochenschr* 1974, 52: 1158-1164.
- Ferguson RN, Edelhoeh H, Daroff HA and Robbins J. Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin. *Biochemistry* 1975, 14: 282-289.
- Ferini-Strambi L, Smirne S, Garancini P, Pinto P and Franceschi M. Clinical and epidemiological aspects of Alzheimer's disease with presenile onset: a case-control study. *Neuroepidemiology* 1990, 9: 39-49.
- Fielding PE, and Fielding CJ. A cholesterol ester transfer complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77 : 3327-3330.
- Fleming LH, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Troncosco JC and Johnson GNW. Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. *Exp Neuro* 1996, 138 : 252-260.
- Forbes WF and McLachlan DRC. Further thoughts on the aluminum-Alzheimer's disease link. *J Epidemiol Commun Health* 1996, 50: 401-403.
- Fratiglioni L, Ahlbom A, Vittanen M and Winblad B. Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study. *Annals of Neurology* 1993, 33: 258-266.
- Fujimoto K, Fukagawa K, Sakata T and Tso P. Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats. *J Clin Invest* 1993, 91: 1830-1833.
- Fukuda H, Nakamura S, Hara K, Kameyama M. Study on the concentration of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the lumbar cerebrospinal fluid (CSF) in neurological diseases. *Rinsho Shinkeigaku* 1989, 29(9): 1192-1194.
- Fukunishi I, Hayabara T and Hosokawa K. Epidemiological surveys of senile dementia in Japan. *Int J Soc Psychiatry* 1991, 37: 51-56.

- Fukuyama R, Adhwani KC, Galdzicki Z, Rapoport SI and Ehrenstein G.  $\beta$ -amyloid polypeptide increases calcium-uptake in PC12 cells: a possible mechanism for its cellular toxicity in Alzheimer's disease. *Brain Research* 1994, 667: 269-272.
- Furby A, Leys D, Delacourte A, Buee L, Soetaert G, Petit H. Are alpha-1-antichymotrypsin and inter-alpha-trypsin inhibitor peripheral markers of Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991, 54(5): 469.
- Gaillard O, Gervais A, Meillet D, Delattre J, Lyon-Caen O and Schuller E. Apolipoprotein E intrathecal synthesis is decreased in multiple sclerosis patients. *Ann Clin Biochem* 1996, 33( Pt 2):148-150.
- Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U and Bisgaier CL. Lipoprotein apo CII activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein AIV. *J Biol Chem* 1990, 265: 4266-4272.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russel DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1985, 1: 1-39.
- Goodrum JF. Cholesterol from Degenerating Nerve Myelin Becomes Associated with Lipoproteins Containing Apolipoprotein E. *J Neurochem* 1991, 56: 2082-2086.
- Grant WB. Dietary Links to Alzheimer's disease. *Alz Dis Rev* 1997, 2:42-55.
- Graves AB, Larson EB, Edland SD, Bowen JD, McCormick WC, McCurry SM, Rice MM, Wenzlow A and Uomoto JM. Prevalence of dementia and its subtypes in the Japanese American population of King County, Washington State. *Am J Epidemiol* 1996, 144: 760-771.
- Graves AB, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Mortimer JA, Rocca WA, et al. Alcohol and tobacco consumption as risk factors for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol* 1991, 20 Suppl 2: S48-S57.
- Griffin DE and Giffels J. Study of protein characteristics that influence entry into the cerebrospinal fluid of normal mice and mice with encephalitis. *J Clin Invest* 1982, 70(2): 289-295
- Gueguen R, Visvikis S, Steinmetz J, Siest G and Boerwinkle E. An analysis of genotype effects and their interactions using the apolipoprotein E polymorphism and longitudinal data. *Am J Hum Genet* 1989, 45: 793-802.



- Guillome D, Bertarnd Ph, Dea D, Davigon J and Poirier J. Apolipoprotein E and low-density lipoprotein binding and internalisation in primary cultures of rat astrocytes: isoform-specific alterations. *J Neurochem* 1996, 66: 2410-2418.
- Gunnarsen D and Haley B. Detection of glutamine synthetase in the cerebrospinal fluid of Alzheimer diseased patients : a potential diagnostic biochemical marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 11949-11953.
- Hagen GA and Elliott WJ. Transport of thyroid hormones in serum and plexus cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1973, 37: 415-422.
- Hahne S, Nordstedt C, Ahlin A and Nybäck H. Levels of cerebrospinal fluid apolipoprotein E in patients with Alzheimer's disease and healthy controls. *Neurosc Lett* 1997, 224: 99-102.
- Haines JL, Pritchard ML, Saunders AM, Schildkraut JM, Growdon JH, Gaskell PC, Farrer LA, Auerbach SA, Gusella JF, Locke PA, Rosi BL, Yamaoka L, Small GW, Conneally PM, Roses AD and Pericak-Vance M. No association between alpha 1-antichymotrypsin and familial Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1996, 802: 35-41.
- Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A and Utermann G. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet* 1991, 49(2): 338-349
- Hampel H, Schoen D, Schwarz MJ, Ketter HU, Schneider C, Sunderland T, Dukoff R, Levy J, Padberg F, Stubner S, Buch K, Muller N and Moller HJ. Interleukin-6 is not altered in cerebrospinal fluid of first-degree relatives and patients with Alzheimer's disease. *Neurosc Lett* 1997, 228(3): 143-146.
- Han SH, Einstein G, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Sauders AM, Perick-Vance M, Roses AD and Schmechel DE. Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: a light and electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994, 53: 535-544.
- Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW and Pitas RE. Effects of apolipoprotein E,  $\beta$ -very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurones in vitro. *J Lipid Res* 1992, 33: 1677-1688.
- Hardy JA and Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992, 256: 184-185.

- Harigaya Y, Shoji M, Nakamura T, Matsubara E, Hosoda K and Hirai S. Alpha 1-antichymotrypsin level in cerebrospinal fluid is closely associated with late onset Alzheimer's disease. *Intern Med* 1995, 34(6): 481-484
- Harman D. Free radical theory of aging: Alzheimer's disease pathogenesis. *Age* 1995, 18: 97-119.
- Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT and Mendez AJ. Brain expression of Apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1996, 66: 2429-2435.
- Hartikainen P, Reinikainen KJ, Soininen H, Sirvio J, Soikkeli R and Riekkinen PJ. Neurochemical markers in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis and normal controls. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1992, 4(1): 53-68.
- Hartmann H, Eckert A and Muller WE. Apolipoprotein E and cholesterol affect neuronal calcium signalling: The possible relationship to  $\beta$ -amyloid neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Comm* 1994, 200: 1185-1192.
- Hawkins PN, Rossor MN, Gallimore R, Miller B, Moore EG and Pepys MB. Concentration of serum amyloid P component in the CSF as a possible marker of cerebral amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Comm* 1994, 201(2): 722-726.
- Helisalmi S, Mannermaa A, Lehtovirta M, Ryyanen M, Riekkinen PSr and Soininen H. No association between alpha1-antichymotrypsin polymorphism, apolipoprotein E and patients with late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997, 231(1): 56-58.
- Henriksson T, Barbour RM, Braa S, Ward P, Fritz LC, Johnson-Wood K, Chung HD, Burke W, Reinikainen KJ and Riekkinen P. Analysis and characterization of the beta-amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer patients with a monoclonal antibody-based immunoassay. *J Neurochem* 1991, 56(3): 1037-1042.
- Herbert J, Wilcox JN, Pham KTC, Fremeau RTJr, Zeviani M, Dwork A, Soprano DR, Makover A, Goodman DS, Zimmerman EA, Roberts JL and Schon EA. Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology* 1986, 36: 900-911.
- Hixson JE and Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990, 31(3):545-548.
- Hochstrasser DF, Patchornik A and Merril CR. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal. Biochem.*, 1988, 173: 412-423.

- Hock C, Golombowski S, Naser W and Muller-Spahn F. Increased levels of tau protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease; correlation with degree of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1995, 37: 414-415.
- Holmquist L. Microheterogeneity of apolipoprotein D as revealed by electroblotting following isoelectric focusing in Immobiline Dry Plates. *Electrophoresis*, 1992: 13, 262-264.
- Ikeda T, Sugiuchi H, Senba U, Shibuya Y, Uji Y, Okabe H, Araki S. Preliminary findings on the variation of serum apolipoprotein levels in neural degenerative disorders. *J Clin Lab Anal* 1993, 7(1): 1-4.
- Innerarity TL, Friedlander EJ, Rall SCJr, Weisgraber KH and Mahley RW. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments. *J Biol Chem* 1983, 258: 12341-12347.
- Jabbour W, Pouplard-Barthelaix A, Houlgatte R and Emile J. Abnormal expression of actin in lymphocytes of Alzheimer's disease and Down's syndrome patients. *J Neuroimmunol* 1992, 38(3): 199-208.
- Jensen M, Basun H and Lannfelt L. Increased cerebrospinal fluid tau in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1995, 186(2-3): 189-191.
- Jolkkonen J, Helkala EL, Kutvonen R, Lehtinen M and Riekkinen PJ. Vasopressin levels in CSF of Alzheimer patients : correlation with monoamine metabolites and neuropsychological test performance. *Psychoneuroendocrinology* 1989, 14(1-2): 89-95.
- Juvenics H and Morell P. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into the brain. *J Neurochem* 1995, 64: 895-901.
- Kalman J, Juhasz A, Laird G, Dickens P, Jardanhazy T, Rimanoczy A, Boncz I, Parry-Jones WL and Janka Z. Serum interleukin-6 levels correlate with the severity of dementia in Down syndrome and in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 1997, 96(4): 236-240.
- Kalmijn S, Feskens EJM, Launer LJ and Kromhout D. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am J Epidemiol* 1997, 145: 33-41.
- Kamboh MI, Albers JJ, Majumder PP, and Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. IX. Apolipoprotein D polymorphism and its relation to serum lipoprotein lipid levels. *Am J Hum Genet* 1989, 45:147-154.
- Kamboh MI, Sanghera DK, Aston CE, Bunker CH, Hamman RF, Ferrell RE, DeKosky ST. Gender-specific nonrandom association between the alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E polymorphisms in the general population and its implication for the risk of Alzheimer's disease. *Genet Epidemiol* 1997, 14(2): 169-180.

- Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Thomas RG, Thal LJ and Katzman R. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1997, 49(1): 56-61.
- Karathanasis SK, Yunis I and Zannis VI. Structure, evolution, and tissue-specific synthesis of human apolipoprotein AIV. *Biochemistry* 1986, 25(13):3962-3970.
- Kawakatsu S, Morinobu S, Shinohara M, Totsuka S and Kobashi K. Acetylcholinesterase activities and monoamine metabolite levels in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 1990, 28(5): 387-400.
- Kawano M, Kawakami M, Otsuka M, Yashima H, Yaginuma T and Ueki A. Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 1995, 239: 209-211.
- Keir G, Tasdemir N and Thompson EJ. Cerebrospinal fluid ferritin in brain necrosis: evidence for local synthesis. *Clin Chim Acta* 1993, 216: 153-166.
- Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama H, Maeda T and Akaike A. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann Neurol* 1997 Aug;42(2):159-163
- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S and Yamamoto T. Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* 1996, 271(14): 8373-8380.
- Kim DH, Magoori K, Inoue TR, Mao CC, Kim HJ, Suzuki H, Fujita T, Endo Y, Saeki S and Yamamoto TT. Exon/intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J Biol Chem* 1997, 272(13):8498-8504
- Kittur SD, Adler WH, Martin GR, Schapiro MB, Rapoport SI and Gunzler V. Laminin concentrations in serum and cerebrospinal fluid in aging and Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci* 1993, 11(1): 95-99.
- Konings CH, Kuiper MA, Scheltens P, Grijpma AM, van Pelt W and Wolters EC. Re-evaluation of cerebrospinal fluid angiotensin-converting enzyme activity in patients with 'probable' Alzheimer's disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993, 31(8): 495-497.

- Koudinov A, Matsubara E, Frangione B and Ghiso J. The soluble form of Alzheimer's amyloid beta protein is complexed to high density lipoprotein 3 and very high density lipoprotein in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 205(2): 1164-1171.
- Kudo T, Iqbal K, Ravid R, Swaab DF and Grundke-Iqbal I. Alzheimer disease: correlation of cerebro-spinal fluid and brain ubiquitin levels. *Brain Res* 1994, 639: 1-7.
- Kuiper MA, Mulder C, Van Kamp GJ, Scheltens P and Wolters EC. Cerebrospinal fluid ferritin levels of patients with Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 1994a, 7: 109-114.
- Kuiper MA, Visser JJ, Bergmans PL, Scheltens P and Wolters EC. Decreased cerebrospinal fluid nitrate levels in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple system atrophy patients. *J Neurol Sci* 1994b ; 121(1) : 46-49.
- Kumar V, Giaconini E and Markwell S. Cerebrospinal fluid choline and acetylcholinesterase in early vs late onset Alzheimer's disease patients. *Acta Neurol Scand* 1989, 80(5): 461-466.
- Kuriyama M, Takahashi K, Yamano T, Hokezu Y, Togo S, Osame M and Igakura T. Low levels of serum apolipoprotein A I and A II in senile dementia. *Jpn J Psychiatry Neurol* 1994, 48(3): 589-593.
- Kuusisto J, Koivisto K, Kervinen K, Mykkanen L, Helkala EL, Vanhanen M, Hanninen T, Pyorala K, Kesaniemi YA, Riekkinen P, et al. Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. *BMJ* 1994, 309(6955): 636-638.
- Lagrost L, Gambert P, Meumer S, Morgado P, Desgres J, d'Athis P and Lallemand C. Correlation between apolipoprotein AIV and triglycerides concentrations in human sera. *J Lip Res* 1989, 30: 701-710.
- Lambert JC, Perez-Tur J, Dupire MJ, Galasko D, Mann D, Amouyel P, Hardy J, Delacourte A and Chartier-Harlin MC. Distortion of allelic expression of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1997, 6(12): 2151-2154
- Lazorthes G. Le système nerveux central. Description. Systématisation. Exploration. In *Masson and Cie* (Ed). Paris, France. 1973, pp 458-508.
- Lea OA, Kvinnsland S, and Thorsen T. Progesterone-binding cyst protein in human breast tumor cytosol. *Cancer Res* 1987, 47: 6189-6192.
- Lee PN. Smoking and Alzheimer's disease: a review of the epidemiological evidence. *Neuroepidemiology* 1994, 43: 13-20.

- Lefranc D, Vermersch P, Dallongeville J, Daems-Monpeurt C, Petit H and Delacourte A. Relevance of the quantification of apolipoprotein E in the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1996, 212(2):91-94.
- Lehman DJ, Johnston C and Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1997, 6(11): 1933-1936.
- Lehtimäki T, Pirttilä T, Mehta PD, Wisniewski HM, Frey H and Nikkari T. Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum. Genet* 1995, 95: 39-42.
- Lendon CL, Talbot CJ, Craddock NJ, Han SW, Wragg M, Morris JC and Goate AM. Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neurosci Lett* 1997, 222(3): 187-190.
- Levy-Lahad E and Bird TD. Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Ann Neurol* 1996, 40(6): 829-840.
- Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S and Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships and evolution. *J Lipid Res* 1988, 29: 245-273.
- Licastro F, Parnetti L, Morini MC, Davis LJ, Cucinotta D, Gaiti A and Senin U. Acute phase reactant alpha 1-antichymotrypsin is increased in cerebrospinal fluid and serum of patients with probable Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1995, 9(2): 112-118.
- Lindh M, Blomberg M, Jensen M, Basun H, Lannfelt L, Engvall B, Scharnagel H, Marz W, Wahlund LO and Cowburn RF. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E (apoE) levels in Alzheimer's disease patients are increased at follow up and show a correlation with levels of tau protein. *Neurosci Lett* 1997, 229(2): 85-88.
- Loo DT, Copani A, Christain JP, Whitemore ER, Walencewicz AJ and Cotman CW. Apoptosis is induced by  $\beta$ -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990: 7951-7955.
- Lovestone S and Anderston B. Cytoskeletal abnormalities in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992, 5 : 883-888.
- Lucotte G, Davis F, Visvikis S, Leininger-Muller B, Siest G, Babron MC, Couderc R. Apolipoprotein E-4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993, 342: 1309.
- Luoma PV. Gene activation, apolipoprotein A-I/high density lipoprotein, atherosclerosis prevention and longevity. *Pharmacol Toxicol*, 1997, 81: 57-64.

- Ma J, Yee A, Brewer HB, Das S and Potter H. The amyloid associated proteins  $\alpha$ 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote the assembly of the Alzheimer's  $\beta$ -protein into filaments. *Nature* 1994, 372: 92-94.
- Machesky LM and Hall A. Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 1996, 6: 304-310.
- Mahley RW, Innerarity TL and Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res* 1984, 25: 1277-1294.
- Mahley RW, Innerarity TL, Pitas RE, Weisgraber KH, Brown JH and Gross E. Inhibition of lipoprotein binding to cell surface receptors of fibroblasts following selective modification of arginyl residues in arginine-rich and B apoproteins. *J Biol Chem* 1977, 252: 7279-7287.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988, 240: 622-630.
- Manaka H, Kato T, Katagiri T, Shikama Y, Kujirai K, Kawanami T, Suzuki Y, Nihei K, Sasaki H. Marked increase in cerebrospinal fluid ubiquitin in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1992, 139(1): 47-49.
- Martel CL, Ghiso J, Frangione B and Zlokovic BV. Transport of apolipoproteins E and J at the blood-brain barrier. Relevance to Alzheimer's disease. *STP Pharma Sci* 1997, (1): 28-36.
- Martignoni E, Blandini F, Petraglia F, Paccetti C, Bono G and Nappi G. Cerebrospinal fluid norepinephrine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and neuropeptide Y levels in Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia of the Alzheimer type. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1992, 4(3): 191-205.
- Martinez M, Frank A, and Hernanz A. Relationship of interleukin-1 beta and beta 2-microglobulin with neuropeptides in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neuroimmunol* 1993, 48(2): 235-240.
- Marques MA, Tolar M and Crutcher KA. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific neurotoxicity. *Alz Res* 1997, 3 : 1-6.
- Marques MA, Tolar M, Harmony JA and Crutcher KA. A thrombin cleavage fragment of apolipoprotein E exhibits isoform-specific neurotoxicity. *Neuroreport* 1996, 7(15-17): 2529-2532
- Matsubara E, Amari M, Shoji M et al. Serum concentration of alpha 1-antichymotrypsin is elevated in patients with senile dementia of the Alzheimer type. *In : Alzheimer's disease*

- and related disorders, Iqbal K; Mc Lachlan DRC; Winblad; Wisniewski H. (Eds). New York, Alan R Liss, Inc. 1989, pp: 707-714.
- Matsubara E, Hirai S, Amari M, Shoji M, Yamaguchi H, Okamoto K, Ishiguro K, Harigaya Y and Wakabayashi K. Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol* 1990, 28(4): 561-567.
- Mattila KM and Frey H. Two-dimensional analysis of qualitative and quantitative changes in blood cell proteins in Alzheimer's disease: search for extraneuronal markers. *Appl Theor Electrophor* 1995, 4(4): 189-196.
- May C, Kaye JA, Attack JR, Schapiro MB, Friedland RP, Rapoport SI. Cerebrospinal fluid production is reduced in healthy aging. *Neurol* 1990, 40: 500-503.
- Mazur-Koleka B, Frackowiak J and Wisniewski HM. Apolipoprotein E3 and E4 induce, and transthyretin prevents accumulation of the Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide in cultured vascular smooth muscle cells. *Brain Res* 1995, 698: 217-222.
- McKeen AC, Kosik KZ and Kowall NW. Neuritic pathology dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1991, 30 : 156-165.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D and Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984, 34(7): 939-944.
- Mendel C.M, Weisiger RA, Jones AL and Cavalieri RR. Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. *Endocrinology* 1987, 120 : 1742-1749.
- Menzel HJ, Boerwinkle E, Schrangl-Will S and Utermann G. Human apolipoprotein AIV polymorphism: frequency and effect on lipid and lipoprotein levels. *Hum Genet* 1988, 79(4): 368-372.
- Merched A, Blain H, Visvikis S, Herbeth B, Jeandel C, Siest G. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1996, 5146.
- Meresse S, Delbart C, Fruchart JC, and Cecchelli R. Low density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem* 1989, 53: 340-345.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988, 16(3):1215.



- Morais Cabral JH, Atkins GL, Sanchez LM, Lopez-Boado YS, Lopez-Otin C, and Sawyer L. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implication to the protein's function. *FEBS Lett* 1995, 366(1): 53-56.
- Morgan K, Morgan L, Carpenter K, Lowe J, Lam L, Cave S, Xuereb J, Wischik C, Harrington C and Kalsheker NA. Microsatellite polymorphism of the alpha 1-antichymotrypsin gene locus associated with sporadic Alzheimer's disease. *Hum Genet* 1997, 99(1):27-31.
- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al. Reduction of  $\beta$ -amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995, 38: 643-648.
- Mui S, Briggs M, Chung H, Wallace RB, Gomez-Isla T, Rebeck GW and Hyman BT. A newly identified polymorphism in the apolipoprotein E enhancer gene region is associated with Alzheimer's disease and strongly with the epsilon 4 allele. *Neurology* 1996, 47(1):196-201
- Muller U, Bodeker RH, Gerundt I and Kurz A. Lack of association between alpha 1-antichymotrypsin polymorphism, Alzheimer's disease, and allele epsilon 4 of apolipoprotein E. *Neurology* 1996, 47(6): 1575-1577.
- Munroe WA, Southwick PC, Chang L, Scharre DW, Echols CL, Fu PC, Whaley JM and Wolfert RL. Tau protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann clin Lab sci* 1995, 25(3): 207-217.
- Murphy GM Jr, Sullivan EV, Gallagher-Thompson D, Thompson LW, van Duijn CM, Forno LS, Ellis WG, Jagust WJ, Yesavage J and Tinklenberg JR. No association between the alpha 1-antichymotrypsin A allele and Alzheimer's disease. *Neurology* 1997, 48(5): 1313-1316.
- Nakamura T, Shoji M and Harigaya T. Amyloid  $\beta$  protein levels in cerebrospinal fluid are elevated in early-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994, 36: 903-911.
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E and Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 1991, 541:163-166.
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW and Pitas RE. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 1994, 264: 850-852.
- North WG, Harbaugh R and Reeder T. An evaluation of human neurophysin production in Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurobiol Aging* 1992, 13(2): 261-265.

- Novak S, Hiesberger T, Schneider WJ and Nimpf J. A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J Biol Chem* 1996, 271(20): 11732-11736.
- O'Connor DT, Kailasam MT and Thal LJ. Cerebrospinal fluid chromogranin A is unchanged in Alzheimer dementia. *Neurobiol Aging* 1993, 14(3): 267-269.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975 250(10): 4007-4021
- Ohta T, Fidge NH and Nestel PJ. Studies on the in vivo and in vitro distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma and lymph. *J Clin Invest* 1985, 76(3): 1252-1260.
- Okuizumi K, Onodera O, Namba Y, Ikeda K, Yamamoto T, Seki K, Ueki A, Nanko S, Tanake H, Takahashi H, Oyanagi, Mizusawa H, Kanazawa I, Tsuji S. Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet* 1995, 11: 207-209.
- Okuizumi K, Onodera O, Seki K, Tanaka H, Namba Y, Ikeda K, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Tsuji S. Lack of association of very low density lipoprotein receptor gene polymorphism with Caucasian Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996, 40(2): 251-254.
- Okumura T, Fukagawa KH, Tso P and Taylor IL. Intracisternal injection of apolipoprotein A-IV inhibits gastric secretion in pylorus-ligated conscious rats. *Gastroenterology* 1994, 107: 1861-1864.
- Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, Renaud S and Breteler MB. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol* 1997, 153(3): 185-192
- Paraskevas GP, Kapaki E, Libitaki G, Zournas C, Segditsa I and Papageorgiou C. Ascorbate in healthy subjects, amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 1997, 96 : 88-90.
- Park BK, Kitteringham NR and Pirmohamed M. Relevance of induction of human drug metabolizing enzymes : pharmacological and toxicological implications. In : *European conference on specificity and variability in drug metabolism*. European Commission, Directorate General XIII, Luxemburg 1995, pp 169-187.
- Parnetti L, Gaiti A, Reboldi GP, Santucci C, Mecocci P, Brunetti M, Cadini D and Senin U. CSF monoamine metabolites in old age dementias. *Mol chem Neuropathol* 1992, 16(1-2): 143-157.

- Patel SC, Astra K, Patel YC, McConathy WJ, Patel RC, and Suresh S. Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *NeuroReport* 1995, 6(4): 653-657.
- Pauwels PJ, Van Assouw HP, De Ryck M, Leysen JE, Dom R and van Gool D. Towards an improved survival of rat brain neurons in culture by cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer's type. *Brain Res* 1993, 610(1): 8-15.
- Payami H, Kaye J, Becker W, Norman D and Wetzsteon P. HLA-A2, or a closely linked gene, confers susceptibility to early-onset sporadic Alzheimer's disease in men. *Neurology* 1991, 41(10): 1544-1548.
- Payami H, Schellenberg GD, Zarepari S, Kaye J, Sexton GJ, Head MA, Matsuyama SS, Jarvik LF, Miller B, McManus DQ, Bird TD, Katzman R, Heston L, Norman D and Small GW. Evidence for association of HLA-A2 allele with onset age of Alzheimer's disease. *Neurology* 1997, 49(2): 512-518.
- Pearman WH, Gueriguian JL, and Sawyer ME. A specific progesterone-binding component of human cyst fluid. *J Biol Chem* 1973, 248 : 5736-5741.
- Peitsch MC and Boguski MS. Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol* 1990, 2(2): 197-206.
- Perikak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsch KA, Earl NL, Heyman A, Clark CM, Roses AD. Linkage Studies in familial Alzheimer disease : Evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 1991, 48: 1034-1050.
- Pfeifer M. Cell adhesion and signal transduction: the Armadillo connection. *Trends Cell Biol* 1995, 5: 224-229.
- Pirttilä T, Kim KS, Mehta PD, Wisniewski HM, Frey H. Immunoreactivity against amyloid beta peptide (A $\beta$ ) is decreased in the cerebrospinal fluid (CSF) from patients with Alzheimer's disease (AD). *Neurology* 1994a, 44(suppl2): A206.
- Pirttilä T, Mehta PD, Frey H and Wisniewski HM.  $\alpha$ 1-antichymotrypsin and Il-1 $\beta$  are not increased in CSF or serum in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1994b, 15(3): 313-317.
- Pirttilä T, Mehta PD, Lehtimäki T, Kim KS, Sersen EA, Frey H, Nikkari T, Wisniewski HM. Relationship between apolipoprotein E4 allele and CSF amyloid  $\beta$  protein in Alzheimer's disease and controls. *Neurosci Res Comm* 1994c, 15(3): 201-207.

- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D and Mahkey RW. Astrocytes synthetize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 1987, 917: 148-161.
- Poirier J, Baccichet A, Dea D and Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience*, 1993, 55(1): 81-90.
- Poirier J, Hess M, May PC and Finch CE. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Mol Brain Res* 1991, 11: 97-106.
- Pradrigé WM. Transport of nutrients and hormone through the blood-brain-barrier. *Fed Proc* 1984, 43: 201-204.
- Prior R, Monning U, Schreiter-Gadner U, Weidemann A, Blennow K and Gottfries CG. Quantitative changes in the amyloid Beta A4 precursor protein in Alzheimer cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 1991, 124(1): 69-73.
- Pritchard ML, Saunders AM, Gaskell PC, Small GW, Conneally PM, Rosi B, Yamaoka LH, Roses AD, Haines JL and Pericak-Vance MA. No association between very low density lipoprotein receptor (VLDL-R) and Alzheimer disease in American Caucasians. *Neurosci Lett* 1996, 209(2): 105-108.
- Provost PR, Villeneuve L, Weech PK, Milne RW, Marcel YL, and Rassart E. Localisation of the major site of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J lipid Res* 1991, 32: 1959-1970
- Provost PR, Weech PK, Tremblay NM, Marcel YL, and Rassart E. Molecular characterization and differential mRNA distribution of rabbit apolipoprotein D. *J Lipid Res* 1990, 31: 2057-2065.
- Rabilloud T. A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis* 1992, 13(7): 429-439.
- Rall SC, Weisgraber KH and Mahley RW. Apolipoprotein E: the complete amino acid sequence. *J Lipid. Res* 1992, 33: 447-454.
- Ramakrishna N, Smedman M, Ramakrishna V and Gillam B. Upregulation of actin gene expression in cells expressing exogenous  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys Res Comm* 1997, 231 : 615-618.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK and Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993, 11: 575-580.

- Rebeeck GW. Potential biological mechanisms of ApoE in Alzheimer's disease. In *Molecular mechanism of dementia*, Wasco W and Tanzi RE (Ed), Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA, 1997, pp: 21-37.
- Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)- a concept common to normal blood barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994, 122: 189-203.
- Ridley AJ and Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992, 70: 389-399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnson CL, Diekmann D and Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992, 70: 401-410.
- Riemenschneider M, Buch K, Schmolke M, Kurz A and Guder WG. Diagnosis of Alzheimer's disease with cerebrospinal fluid tau protein and aspartate aminotransferase. *Lancet* 1997, 350(9080) : 784.
- Rifai N, Christenson RH, Gelman BB and Silverman LM. Changes in cerebrospinal fluid IgG and Apolipoprotein E indices in patients with multiple sclerosis during demyelination and remyelination. *Clin Chem* 1987, 33: 1155-1157.
- Riisøen H. Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 1988, 78: 455-459.
- Roberts LM, Ray MJ, Shih TW, Hayden E, Reader MM and Brouillette CG. Structural analysis of apolipoprotein A-I: limited proteolysis of methionine-reduced and -oxidized lipid-free and lipid-bound human apo A-I. *Biochemistry* 1997, 36(24): 7615-7624
- Roses AD, Einstein G, Gilbert J, Goedert M, Han SH, Huang D, Hulette C, Masliah E, Pericak-Vance MA, Saunders AM, Schmechel DE, Strittmatter WJ, Weisgraber KH and Xi PT. Morphological, biochemical, and genetic support for an apolipoprotein E effect on microtubular metabolism. *Ann NY Acad Sci USA* 1996, 777: 147-157.
- Rösler N, Wichart I, Bancher C and Jellinger KA. Tau protein and apolipoprotein E in CSF diagnostics of Alzheimer's disease: impact on non Alzheimer's dementia. *J Neural Transm* 1996, [suppl]47: 259-266.
- Roydes JA, Davies-Jones GAB, Lewtas NA, Timperley WR and Taylor CB. Enolase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with diseases of the nervous system. *J Neurol* 1983, 46: 1031-1036.
- Salomon A, Marcinowski KJ, Friedland RP and Zagorski MG. Nicotine inhibits amyloid formation by the  $\beta$ -peptide. *Biochemistry* 1996, 35: 13568-13578.

- Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS and Thal LJ. A controlled trial of slegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 1997, 336(17): 1216-1222.
- Saraiva MJM. Transthyretin mutations in health and disease. *Hum. Mutation* 1995, 5: 191-196.
- Savory J, Exley C, Forbes WF, Huang Y, Joshi JG, Kruck T, McLachlan DR and Wakayama I. Can the controversy of the role of aluminum in Alzheimer's disease be resolved? What are the suggested approaches to this controversy and methodological issues to be considered? *J Toxicol Environ Health* 1996, 48(6): 615-635
- Schaller MD and Parsons JT. Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 1993, 3: 258-262.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992, 258(5082): 668-671.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D and Roses AD Increased amyloid  $\beta$  amyloid-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 9649-9653.
- Schwagerl AL, Mohan PS and Cataldo AM. Elevated levels of the endosomal-lysosomal proteinase cathepsin D in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1995, 64 : 443-446.
- Schwarzman AL, L Gregori MP, Vitek S, Lyubski WJ, Strittmatter JJ, Enghilde R, Bhasin J, Silverman KH, Weisgraber PK, Coyle MG, Zagorski J, Talafous M, Eisenberg AM, Sauders AD, Roses A and Goladgaber D. Tranthyretin sequesters amyloid  $\beta$  protein and prevents amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, 91: 8368-8372.
- Séguin D, Desfoeges M, and Rassart E. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Mol Brain Res* 1995, 30: 242-250.
- Serot JM, Bene MC and Faure GC. Comparative immunohistochemical characteristics of human choroid plexus in vascular and Alzheimer's dementia. *Hum Pathol* 1994, 25(11): 1185-1190.
- Serot JM, Bene MC, Foliguet B and Faure GC. Altered choroid plexus basement membrane and epithelium in late-onset Alzheimer's disease: an ultrastructural study. *Ann N Y Acad Sci* 1997a, 826: 507-509.

- Serot JM, Christmann D, Dubost T and Couturier M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997b 63(4): 506-508.
- Shachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, Rouger H, Frougel P and Cohen D. Genetic associations with human longevity at the ApoE and ACE loci. *Nat Genet* 1994, 6: 29-32.
- Shinohara Y, Yamamoto M, Ohsuga H et al. Alpha 1-antichymotrypsin and antithrypsin in CSF of patients with Alzheimer-type dementia. In : Iqbal K; Mc Lachlan DRC; Winblad; Wisxiewsky H. Eds. Alzheimer's disease : Basic mechanisms, Diagnosis and Therapeutic Strategies. New york, John Wiley and Sons Limited : 1991, pp. 541-545.
- Shimohama S, Akaike A and Kimura J. Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation. *Ann N Y Acad Sci* 1996, 777: 356-361.
- Siegrist-Kraiser CA, Juge-Aubray C, Tranter MP, Ekenbarger DM and Leonard JL. Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes: a novel, extranuclear action of thyroid hormone. *J Biol Chem* 1990, 265: 5296-5302.
- Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leninger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM and Visvikis S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995, 41(8) : 1068-1086.
- Small GW and Matsuyama SS. HLA-A2 as a possible marker for early-onset Alzheimer disease in men. *Neurobiol Aging* 1986, 7(3): 211-214.
- Small GW, Ebeling SC, Matsuyama SS, Heyman A, Reisner EG, Renvoize EB and Sulkava R. Variable association of HLA-A2 in men with early-onset Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 1991, 12(4): 375-377.
- Smith J, Lawn R.M, and Wilcox J.N. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J Lipid Res* 1990, 31 : 995-1004.
- Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ and Freeman JA. Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 1130-1134.
- Song H, Saito K, Seishima M, Noma A, Urakami K and Nakashima K. Cerebrospinal fluid apo E and apo A-I concentrations in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997, 231(3): 175-178.

- Southwick PC, Yamagata SK, Echols CL, Higson GJ, Neynaber SA, Parson RE and Munroe WA. Assessment of amyloid  $\beta$  protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1996, 66: 259-265.
- Sparks DL, Scheff W, Hunsaker JC, Hiuachen LIU, Landers T and Gross DR. Induction of Alzheimer-like  $\beta$ -amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp. Neurol* 1994, 126: 88-94.
- Spreyer P, Schaal, H, Kuh G, Rothe T, Unterbeck A, Olek K and Muller HW. Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO* 1990, 9: 2479-2484.
- St Clair RW and Beisiegel U. What do all the apolipoprotein E receptors do? *Curr Opin Lipidol* 1997, 8(5): 243-245
- Steinmetz A and Utermann G. Activation of lecithin cholesterol acyl transferase by human apolipoprotein A IV. *J Biol Chem* 1985, 260: 2258-2264.
- Steinmetz A, Barbaras R, Ghalim N, Clavey V, Fruchart JC and Ailhaud G. Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. *J Biol Chem* 1990, 265(14): 7859-7863.
- Steyer E and Kostner GM. Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: Comparison of proteo-liposomes containing apolipoprotein D, A-I, or C-I. *Biochem Biophys Acta* 1987, 958: 484-491.
- Strittmatter M, Cramer H, Reuner C, Strubel D, Hamann G and Schimrigk K. Molecular forms of somatostatin-like immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type. *Biol Psychiatry* 1997, 41(11): 1124-1130.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D and Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994a, 91(23): 11183-11186.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Perikak-Vance MA and Roses AD. Apolipoprotein E : high avidity binding to  $\beta$  amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 1977-1981.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goebert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, Dong LM, Jakes R, Alberts MJ, Gilbert JR, Schmechel DE, Perikak-Vance MA and Roses AD.



- Microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol* 1994b, 125: 163-171.
- Subhash MN, Padmashree TS, Srinivas KN, Subbakrishna DK and Shankar SK. Calcium and phosphorus levels in serum and CSF in dementia. *Neurobiol Aging* 1991, 12(4): 267-269.
- Sulkava R, Vinikka L, Erkinjuntti T and Roine R. Cerebrospinal fluid neuron specific enolase is decreased in multi-infarct dementia, but unchanged in Alzheimer's disease. *Psychiatry* 1988, 41: 549-551.
- Sviridov D, Pyle L and Fidge N. Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the efflux of intracellular cholesterol to human serum and apolipoprotein A-I containing particles. *Biochemistry* 1996, 35: 189-196.
- Tabaton M, Nunzi MG, Xue R, Usiak M, Autilio-Gambetti L and Gambetti P. Soluble amyloid  $\beta$ -protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Comm* 1994, 200(3): 1598-1603.
- Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T and Yamamoto T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1992, 89: 9252-9256.
- Takahashi S, Oida K, Ookubo M, Suzuki J, Kohno M, Murase T, Yamamoto T and Nakai T. Very low density lipoprotein receptor binds apolipoprotein E2/2 as well as apolipoprotein E3/3. *FEBS Lett* 1996, 386: 197-200.
- Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T. Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1995, 270(26): 15747-15754
- Tam SP. Effects of gemfibrozil and ketoconazole on human apolipoprotein AI, B and E levels in two hepatoma cell lines, HepG2 and Hep3B. *Atherosclerosis* 1991, 91(1-2): 51-61.
- Tape C and Kisilevsky R. Apolipoprotein A-I and apolipoprotein SAA half-lives during acute inflammation and amyloidogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1043(3):295-300
- Tham A, Nordberg A, Grissom FE, Carlsson-Skwirut C, Viitanen and, Sara VR. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the alzheimer type. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1993, 5(3): 165-176.
- Thompson CM, Markesbery WR, Ehmann WD, Mao YX and Vance DE. Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *NeuroToxicol* 1988, 9: 1-8.

- Tintner R, Mehta P, Mc Intire D, Weiner M and Hom J. CSF  $\alpha$ 1-antichymotrypsin (ACT) in Alzheimer's disease (AD). *Neurology* 1992, 42(Suppl. 3): 140.
- Tohgi H, Abe T, Takahashi S, Kimura M, Takahashi J and Kikuchi T. Concentrations of serotonin and its related substances in the cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer type dementia. *Neurosci lett* 1992, 141(1): 9-12.
- Tolar M, Marques MA, Harmony JAK and Crutcher KA. Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein E and related synthetic peptides is receptor-mediated. *J Neurosci* 1997, 17(15): 5678-5686.
- Tooyama I, Kawamata T, Akiyama H, Moestrup SK, Gliemann J and McGeer PL. Immunohistochemical study of alpha 2 macroglobulin receptor in Alzheimer and control postmortem human brain. *Mol Chem Neuropathol* 1993, 18(1-2): 153-160.
- Tozuka M, Hidaka H, Miyachi M, Furihata K, Katsuyama T and Kanai M. Identification and characterization of apolipoprotein (AII-E2-AII) complex in human plasma lipoprotein. *Biochem Biophys Acta* 1992, 1165: 61-67.
- Tso P, Chen Q, Fugimoto K, Fukagawa KH and Sakata T. Apolipoprotein A-IV a circulating satiety signal produced by the intestinal small intestine. *Obes Res* (Suppl) 1995, 5: 689-695.
- Ueda K, Kawano H, Hasuo Y and Fujishima M. Prevalence and etiology of dementia in a Japanese community. *Stroke* 1992, 23: 798-803.
- Urakami K, Sato K, Okada A, Mura T, Shimomura T, Takenaka T, Wakutani Y, Oshima T, Adachi Y, Takahashi K, et al. Cu, Zn superoxide dismutase in patients with dementia of the Alzheimer type. *Acta Neurol Scand* 1995 ; 91(3) : 165-168.
- Urakami K, Takahashi K, Saito H, Okkada A, Nakumura S, Tanaka S, Kitaguchi N, Tokushima Y and Yamamoto S. Amyloid beta protein precursors with Kunitz-type inhibitor domains and acetylcholinesterase in cerebrospinal fluid from patients with dementia of the Alzheimer type. *Acta Neurol Scand* 1992, 85(5): 343-346.
- Vale RD, Banker G and Hall ZW. Le cytosquelette neuronal. *In* Introduction à la neurobiologie moléculaire. 1994. Hall ZW Eds. Flammarion, Paris France. pp 247-280.
- VanderPutten DM, Cameron BM and Merrill CR. Increased apolipoprotein-E concentrations in individuals suffering chronic low back syndrome identified by two-dimensional gel electrophoresis. *Appl Theor Electrophor* 1993, 3(5): 247-252

- Van Dujin CM and Hofman A. Risk factor for Alzheimer's disease: the EURODEM collaborative re-analysis of case-control studies. *Neuropeptidemiology* 1992, Suppl. 1: 106-113.
- Van Gool D, De Strooper B, Van Leuven F, Triau E and Dom R.  $\alpha$ 2-Macroglobulin expression in neuritic-type plaques in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1993, 14: 233-237.
- Van Gool WA, Kuiper MA, Walstra GJM, Wolters EC and Bolhuis PA. Concentrations of amyloid  $\beta$  protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995, 37: 277-279.
- Van Jaarsveld PP, Edelhoop H, Goodman DS and Robbins J. The interaction of human plasma retinol-binding protein with prealbumin. *J Biol Chem* 1973, 248: 4698-4703.
- Van Nostrand WE, Wagner SL, Shankle WR, Farrow JS, Dick M, Rozemuller JM, Kuiper MA, Wolters EC, Zimmerman J, Cotman C and Cunningham DD. Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor in cerebrospinal fluid of live Alzheimer disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89(7): 2551-2555.
- Vaughan PJ, Su J, Cotman CW and Cunningham DD. Protease nexin-1, a potent thrombin inhibitor, is reduced around cerebral blood vessels in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1994 668(1-2): 160-170
- Vigo-Pelfrey C, Seubert P, Barbour R, Blomquist C, Lee M, Lee D, Coria F, Chang L, Miller B, Lieberburg I, Schenk D. Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1995, 45: 788-793.
- Visvikis S, Steinmeitz J, Cuvelier I., Galteau, MM and Siest G. *In Recent Progresses in Two - Dimensional Electrophoresis* (Galteau M.M., and Siest G., eds) Presses Universitaires, Nancy, France, 1986, pp. 159-165.
- Von Eckardstein A, Huang Y, Wu S, Sarmadi AS, Schwarz S, Steinmetz A, Assman G. Lipoproteins containing apolipoprotein AIV but not apolipoprotein AI take up and esterify cell-derived cholesterol in plasma. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 1995, 15(10): 1755-1763.
- Wagner SL, Geddes JW, Cotman CW, Lau AL, Gurwitz D, Isackson PJ and Cunningham DD. Protease nexin-1, an antithrombin with neurite outgrowth activity, is reduced in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86(21): 8284-8288
- Warden CH, Diep A, Taylor BA and Lusk AJ. Localization of the gene for apolipoprotein D on mouse chromosome 16. *Genomics*, 1992, 12 : 851-852.

- Watson MA and Scott MG. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1995, 41(3): 343-360.
- Wavrant-DeVrieze F, Perez-Tur J, Lambert JC, Frigard B, Pasquier F, Delacourte A, Amouyel P, Hardy J and Chartier-Harlin MC. Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997, 227(1): 68-70.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL and Beyreuther K. Identification, biogenesis, and localisation of precursors of Alzheimer's disease  $\beta$ A amyloid protein. *Cell* 1989, 57: 115-126.
- Weinberg RB and Patton CS. Binding of human apolipoprotein AIV to hepatocellular plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1044: 255-261.
- Weinberg RB, Jordan MK, and Steimetz A. Distinctive structure and function of human apolipoprotein variant ApoA-IV-2. *J Biol Chem* 1990, 265: 18373-18378.
- Weisgraber KH and Mahley RW. Apoprotein (E-AII) complex of human plasma lipoproteins. I. Characterization of this mixed disulfide and its identification in a high density lipoprotein subfraction. *J Biol Chem* 1978, 253: 6281-6288.
- Weisgraber KH and Mahley RW. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J* 1996, 10(13):1485-1494
- Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 1994, 45: 248-302.
- Weisgraber KH. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res* 1990, 31: 1503-1511.
- Wenstrup D, Ehmann WD and Markesbery WR. Trace element imbalances in isolated subcellular fractions of Alzheimer's disease brains. *Brain Res* 1990, 533: 125-131.
- Wetterau JR, Aggerbeck LP, Rall SC Jr and Weisgraber KH. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *J Biol Chem* 1988, 263: 6240-6248.
- Whalen RG, Butler-Browne GS and Gros F. Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976 73(6):2018-2022.
- White LR. Towards a program of cross-cultural research on the epidemiology of Alzheimer's disease. *Current Sci* 1992, 63: 456-469.

- Whitson JS, Mims MP, Strittmatter WJ, Yamaki T, Morisett JD and Appel SH. Attenuation of the neurotoxic effect of A $\beta$  amyloid peptide by Apolipoprotein E. *Bioch Biophys Research Comm* 1994, 199: 163-170.
- Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW and Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 1991, 252: 1817-1822.
- Wisniewski T, Castano EM, Golabek A, Vogel T and Frangione B. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 1994 145(5): 1030-1035
- Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E : a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett* 1992, 135: 235-238.
- Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE and Frangione B. Conformational mimicry in Alzheimer's disease. Role of apolipoproteins in amyloidogenesis. *Am J Pathol* 1995, 147: 238-244.
- Yamada T, Kondo A, Takamatsu JI, Tateishi J and Goto I. Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1995, 129: 56-61.
- Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ and Saito Y. Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem* 1996, 271(40): 24761-24768.
- Yang CY, Gu ZW, Blanco-Vaca F, Gaskell SJ, Yang M, Massey JB, Gotto AM, and Pownall HJ. Structure of human apolipoprotein D: Locations of the intermolecular and intramolecular disulfides links. *Biochemistry* 1994, 33: 12451-12455.
- Yoshiiwa A, Kamino K, Yamamoto H, Kobayashi T, Imagawa M, Nonomura Y, Yoneda H, Sakai T, Nishiwaki Y, Sato N, Rakugi H, Miki T and Ogihara T. alpha 1-Antichymotrypsin as a risk modifier for late-onset Alzheimer's disease in Japanese apolipoprotein E epsilon 4 allele carriers. *Ann Neurol* 1997, 42(1): 115-117.
- Yoshizawa T, Iwamoto H, Mizuzawa H, Suzuki N, Matsumoto H and Kanazawa I. Cerebrospinal fluid endothelin-1 in Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer type. *Neuropeptides* 1992, 22(2): 85-88.
- Yoshizawa T, Yamakawa-Kobayashi K, Komatsuzaki Y, Arinami T, Oguni E, Mizusawa H, Shoji S and Hamaguchi H. Dose-dependent association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset, sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994, 36(4):656-659.

- Zaiou M, Visvikis S, Gueguen R, Parra HJ, Fruchart JC and Siest G. DNA polymorphism of human apolipoprotein AIV gene: frequency and effects on lipid, lipoprotein levels in a French population. *Clin Genet* 1994, 46: 248-254.
- Zaiou M, Visvikis S, Visvikis A and Siest G. A rapid and reliable method for direct genotyping of codon 360 in the human apolipoprotein AIV gene. *J Lipid Res* 1992, 33: 1061-1066.
- Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G and McCluskey RT. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem* 1994, 42: 531-542.
- Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, Frangione B and Ghiso J. Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93(9): 4229-4234.
- Zlokovic BV. Cerebrovascular permeability to peptides: manipulations of transport systems at the blood-brain barrier. *Pharm Res* 1995, 12(10): 1395-1406.

*PUBLICATIONS*

Publication N°1

*Journal of the Neurological Sciences* (1997) 145: 33-39

**Cerebrospinal fluid Apolipoprotein E is increased in  
late onset Alzheimer's disease.**

Merched A., Blain H., Visvikis S., Herbeth B., Jeandel C. and Siest G.



## Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late-onset Alzheimer's disease

A. Merched<sup>a,1</sup>, H. Blain<sup>a,b,2</sup>, S. Visvikis<sup>a</sup>, B. Herbeth<sup>a</sup>, C. Jeandel<sup>b</sup>, G. Siest<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre de Médecine Préventive, URA CNRS 597, 2, rue du Doyen Jacques Parisot, F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy France

<sup>b</sup> Centre Hospitalier Universitaire de Nancy-Brabois Service de Médecine B, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy France

Received 29 February 1996; revised 2 July 1996; accepted 10 July 1996

### Abstract

Worldwide evidence has recently shown that the allele  $\epsilon 4$  of apolipoprotein E (ApoE) is a genetic risk factor for Alzheimer's disease (AD) underlining the possible role of apoE in the physiopathology of AD. To evaluate the usefulness of apoE concentration in pathogenesis of AD, we measured the cerebrospinal fluid (CSF) levels of apoE. CSF apoE level was significantly higher in 38 patients with late-onset AD than in 31 control patients and 47 patients suffering from other neurological and related diseases. Higher levels of CSF apoE were also present in a subset of patients with meningoencephalitis, motor neuron disease, and low back pain. The increase of CSF-apoE in AD is in agreement with results from studies that find an increase of mRNA apoE in the brains of AD patients. Compared to other works, these results underline the importance and the difficulties of the selection of the controls. The CSF apoE level seems to be a reflection of neuronal damage and/or an inflammatory reaction that may be common to AD and other neurological and related diseases. © 1997 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Neurological diseases; Alzheimer's disease (AD); Apolipoprotein E (apoE); Cerebrospinal fluid (CSF)

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent cause of dementia worldwide and affects 5–10% of the population aged greater than 65 years. As yet, the diagnosis of the pathology is defined only after autopsy or brain biopsy by observation of 3 types of histological manifestations found predominantly in the hippocampus amygdalus, and the cerebral cortex: neurofibrillar degeneration, intraneuronal fibrillary tangles, of which the principal constituent is hyperphosphorylated tau protein, extracellular senile plaques and vascular deposits of amyloid, composed mainly of a potentially neurotoxic peptide,  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ).

Worldwide evidence recently implicated the  $\epsilon 4$  allele, one of the three alleles of apolipoprotein E (apoE) polymorphism ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ), as risk marker for Alzheimer's disease (Strittmatter et al., 1993; Lucotte et al., 1993,

1994; Siest et al., 1995). The mechanism of the association is not clear. A specific functional role of the apoE isoforms apoE4, apoE3 and apoE2 in the pathology of Alzheimer disease is suggested.

ApoE plays a key role in the transport and redistribution of lipids among various tissues by interaction with specific receptors. ApoE has a number of others functions such as nerve regeneration and neuronal plasticity (Handelman et al., 1992; Poirier et al., 1993; Nathan et al., 1994).

ApoE is the principal apolipoprotein in the CSF and has a distinct sialylation pattern (Pitas et al., 1987). It seems to have limited access across the blood–brain barrier (Zlokovic et al., 1994). ApoE in CSF is essentially derived from the brain (Carlsson et al., 1991; Linton et al., 1991; Gaillard et al., 1996) and therefore can reflect cerebral apoE production. Carlsson et al. (1991) had investigated the CSF apoE level and reported increased levels of apoE in CSF of patients with neurological diseases compared to controls. However other studies on CSF-apoE levels with AD (Blennow et al., 1994; Pirtilä et al., 1994; Lehtimäki et al., 1995) found decreased levels in AD patients compared to controls. But very recently, Yamada et al. (1995) showed greater levels of apoE mRNA in AD brains

\* Corresponding author. Tel: +33 83 44 87 20. Fax: +33 83 44 87 21.

<sup>1</sup> Authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Authors contributed equally to this work.

The current study was designed to evaluate CSF apoE level in diagnosis of AD. The original aim of this study was to investigate the clinical usefulness of this measurement compared to other neurological and related diseases. Therefore, in our study, we added a neurological control group which was composed of subjects with a range of acute neurological syndromes other than AD (cerebrovascular disease, meningoencephalitis, motor neuron disease, and low back pain). The genotype effect of apoE on its CSF levels was also investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patient population

Thirty-eight patients with probable Alzheimer's disease (AD) ( $75.4 \pm 9.9$  years), 31 subjects without the presence of any confirmed neuropsychiatric disease (control group) ( $67.4 \pm 11.0$  years), and 47 patients with other neurological and related diseases ( $64.3 \pm 13.0$  years) — 7 patients with cerebrovascular disease (CVD) ( $70.4 \pm 13.2$  years), 10 patients with motor neuron disease (MND) ( $58.4 \pm 13.6$  years), 10 patients with meningoencephalitis (ME) ( $65.6 \pm 12.0$ ), and 20 patients with low back pain (LBP) ( $64.3 \pm 12.9$  years) — were studied.

The clinical diagnosis of probable AD was established by National Institutes of Neurological and Communicative Disorders and Stroke — Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS ADRDA) criteria (McKhann et al., 1984). All patients with AD had a Mini-Mental State (MMS) score (Folstein et al., 1975) of less than 25.

Patients without AD and control subjects had a Mini-Mental State score of Folstein higher than 28. The control group was composed of subjects at which lumbar puncture has been released for diagnosis of fever or staging of lymphoma. These subjects had normal CSF cytology and chemistry. This study had CHU Nancy Hospital ethical committee approval and informed consent was obtained from each subject.

### 2.2. CSF collection, apolipoprotein $\epsilon$ polymorphism and level analysis

CSF was taken by routine lumbar puncture once informed consent was obtained from each patient or their family members. The samples were analyzed for protein, glucose and cell content and stored in 0.2 ml aliquots at  $-196^\circ\text{C}$ .

DNA was isolated from nucleated blood cells by the technique of Miller (Miller et al., 1988). ApoE genotyping was performed by HhaI digestion of PCR amplified fragments spanning the apoE polymorphic sites (Hixson and Vernier, 1990). When DNA was not available, apoE phenotyping was made using two-dimensional electrophoresis as described elsewhere (Lepage et al., 1986).

ApoE measurements in CSF were performed by a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) using affinity purified goat polyclonal anti-human apoE (G $\alpha$ E/E, from LM Havekes, Leiden, The Netherlands) as capture antibody and the same antibody labeled with horseradish peroxidase (G $\alpha$ E/EPO) as second antibody. All CSF apoE measurements were performed in duplicate. In summary, the wells of plastic plates (Nunc Immuno-plate, Polyabo) were coated with goat-anti-apoE (100  $\mu\text{l}$  of 1/1000 diluted antibody in PBS) at  $4^\circ\text{C}$  overnight. The wells were washed three times with 0.05% Tween 20 (v/v) in PBS (250–300  $\mu\text{l}$ /wash) and blocked with 0.1% casein in PBS (150  $\mu\text{l}$ /well) at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h. After three washes, 100  $\mu\text{l}$  of diluted CSF samples and standard (16 mg/l of apoE in pooled serum, calibrated using purified apoE obtained from Dr. M. Rosseneu (Gent University, Belgium) 0–2.5  $\mu\text{g}$  apoE/dl range) were incubated at  $4^\circ\text{C}$  overnight. After five washes, the 2<sup>nd</sup> antibody (1/800 dilution in 0.05% tween 20 and 1% Normal Goat Serum (Sigma) in blocking buffer) was incubated (100  $\mu\text{l}$ /well) for two hours at  $37^\circ\text{C}$ . After five washes, 100  $\mu\text{l}$  of tetramethybenzen (TMB) solution, prepared according to manufacture's instructions (Organon Teknika); containing per 10 ml of deionised water, 1ml of peroxidase-substrate buffer (1 ml of solution containing 1 tablet of Urea Peroxidase/10 ml of deionised water, diluted in 10 ml of Sub-

Table 1  
Main characteristics of patients and measured variables <sup>a</sup> (mean  $\pm$  SD)

	Alzheimer's disease	Controls	Neurological and related diseases
<i>n</i>	38	31	47
Age (years)	$75.4 \pm 9.9$ <sup>b</sup>	$67.4 \pm 11.$	$64.3 \pm 13.0$
Sex (M%/F%)	39 / 61	39 / 61	53 / 47
CSF-ApoE (mg/l)	$2.07 \pm 0.80$ <sup>c</sup>	$0.80 \pm 0.34$	$1.57 \pm 0.67$ <sup>d</sup>
CSF-ApoE/CSF total protein (mg/g)	$5.26 \pm 2.28$ <sup>e</sup>	$3.12 \pm 2.91$	$4.18 \pm 3.51$
MMS (Folstein et al., 1975)	$10.71 \pm 7.30$	> 28	> 28

<sup>a</sup> CSF ApoE to protein ratio were determined on 30 AD patients, 29 controls, and 44 patients with neurological and related diseases.

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  compared to control group,  $p < 0.01$  compared to neurological and related diseases group.

<sup>c</sup>  $p < 0.0001$  compared to control group,  $p < 0.01$  compared to neurological and related diseases group.

<sup>d</sup>  $p < 0.0001$  compared to control group.

<sup>e</sup>  $p < 0.05$  compared to control group.

strate buffer) and 200 ml TMB, were added to the wells and incubated for 20 min at room temperature.

The reaction was stopped with 2.5 M sulfuric acid and plates were read at 405 nm with the Titertek multiscan plate reader (Flow Laboratories). The between-run CV was 10.8%.

ApoE levels in some CSF samples were determined in blind study by turbidimetry using reagents from Daiichi Pure Chemicals (Tokyo, Japan) on Cobas Mira (Roche Diagnostics, Neuilly-sur-Seine, France).

Calibration was made automatically using 1:10 diluted Daiichi standard (105:10 mg/l) to prepare a calibration curve ranged from 0.178 to 10.50 mg/l. 50  $\mu$ l of CSF samples were incubated at 37°C with 50 ml of goat anti-human apoE antisera (Daiichi) and 200 ml of phosphate buffer. Absorbance was read at 340 nm 6 min after starting the reaction. Reagent blank was done with purified water. Concentration values were calculated with the cobas program using the LOGIT/LOG5 calibration mode. The between-run CV was 5.6%.

### 2.3. Statistical analysis

Allelic frequencies comparison of apoE were performed using  $\chi^2$  test. The comparison of CSF apoE mean levels in different groups was determined using *t*-test on ground and adjusted values for age and sex or Welch test when variances were not assumed to be equal. Nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare CSF apoE levels between pathological sub-groups and either AD and control groups. A *p*-value of 0.05 was considered significant. All data reported were analyzed with the BMDP<sup>®</sup> statistical software (Los Angeles, CA).

## 3. Results

Table 1 shows the main characteristics of patients and controls included in the study. The AD patients were older than either control and neurological patients ( $p < 0.05$  and 0.01 respectively) and, compared to the latter patients, had a higher proportion of females.

CSF apoE levels were elevated in AD patients in comparison to subjects with neurological and related diseases other than AD ( $2.07 \pm 0.80$  vs  $1.57 \pm 0.67$  mg/l)  $p < 0.01$ , who themselves had higher levels compared to the control group ( $0.85 \pm 0.4$  mg/l)  $p < 0.0001$  (Table 1 and Fig. 1A). Since there was a difference in sex and/or age between groups, we make the same analysis with adjusted values for age and sex. The results showed the same levels of difference between groups. The adjusted means were, 2.03, 1.57 and 0.80 mg/l in AD patients, controls and neurological and related diseases patients, respectively. By using the ratio of apoE to total CSF protein, we noted only a significant difference ( $p < 0.01$ ) with AD patients compared to controls (Table 1).

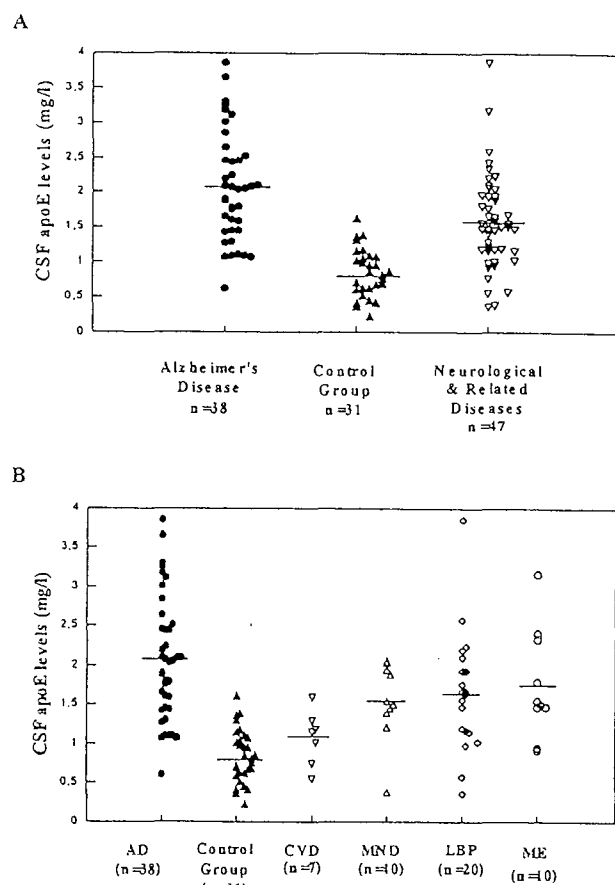


Fig. 1. Cerebrospinal fluid levels of apoE. A significant difference exists between the Alzheimer's disease (AD) group and either control and neurological and related disease groups ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.01$  respectively) and between the latter two ( $p < 0.0001$ ) (A). The neurological and related disease group is subdivided into 4 groups, CVD = cerebrovascular disease, ME = meningoencephalitis, MND = motor neuron disease, and LBP = low back pain (B). A significant difference exists between the Alzheimer's disease group and either control group and CVD group (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0.05$ ) and between control group and each of the 3 groups MMD, LBP, and ME group (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0.05$ ). Bars represent the mean in each group.

When we divided the neurological group into different sub-groups according to the type of pathology, we found different distribution of apoE levels (Fig. 1B). The CSF apoE levels were  $1.08 \pm 0.34$  mg/l in CVD patients,  $1.55 \pm 0.51$  mg/l in MND patients,  $1.66 \pm 0.76$  mg/l in LBP patients and  $1.76 \pm 0.70$  mg/l in ME patients. Com-

Table 2  
Allelic frequencies of apoE in Alzheimer's disease group and control group

	Alzheimer's disease group *	Control group *
n	37	25
ApoE4	35%	9.4%
ApoE3	59%	75%
ApoE2	6%	15.6%

\*  $p < 0.01$  ( $\chi^2 = 11.884$ ), difference between AD and control groups

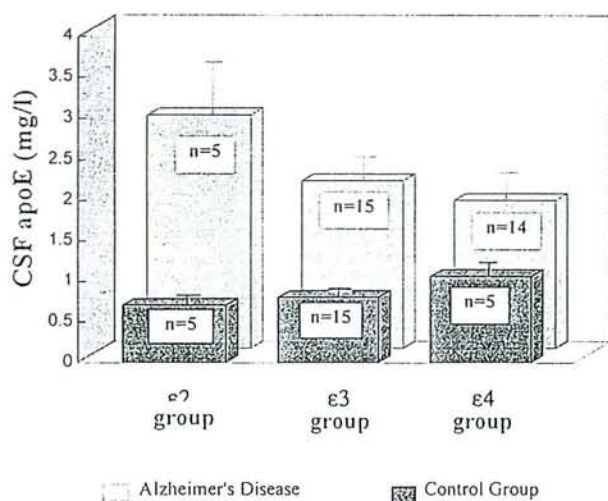


Fig. 2. Comparison of CSF apoE level means between apoE phenotypes in AD patients and control group. Results show decreased levels but not significant in AD group ( $P = 0.068$ ) according to the allele group  $\epsilon 2 > \epsilon 3 > \epsilon 4$ . No significant difference between allelic groups in the control group ( $p = 0.19$ ). However, in each allelic group the levels of CSF-apoE are significantly higher in the AD group compared to control group (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0.05$ ). The  $\epsilon 2$  group was composed of patients genotyped as  $\epsilon 2\epsilon 2$  or  $\epsilon 2\epsilon 3$ , the  $\epsilon 3$  group with those genotyped as  $\epsilon 3\epsilon 3$  and the  $\epsilon 4$  group of those genotyped as  $\epsilon 3\epsilon 4$  or  $\epsilon 4\epsilon 4$ . Individuals with  $\epsilon 2\epsilon 4$  genotype were excluded. Bars represent SEM.

parison of AD and control groups with each disease subgroup showed no significant differences firstly between AD and each of the 3 disease subgroups, MND, LBP and ME, and secondly between control and CVD groups. However, MND, LBP and ME had significantly higher levels of CSF apoE compared to control group ( $p < 0.05$ ).

As expected, apoE4 allele was over-represented in the AD group (Table 2). We confirmed the high association of  $\epsilon 4$  with late-onset sporadic AD (0.35 AD versus 0.094 controls for  $\epsilon 4$  allele frequencies ( $p < 0.01$ ). The allelic frequencies of controls were similar to those that we previously reported in healthy individuals from Nancy and Paris-France (Lucotte et al., 1994).

Because of the small number of subjects in each geno-

type group, we formed 3 genotype groups, ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$ ). The  $\epsilon 2$  group was composed of patients genotyped as  $\epsilon 2\epsilon 2$  or  $\epsilon 2\epsilon 3$ , the  $\epsilon 3$  group of those genotyped as  $\epsilon 3\epsilon 3$  and the  $\epsilon 4$  group of those genotyped as  $\epsilon 3\epsilon 4$  or  $\epsilon 4\epsilon 4$  (individuals with  $\epsilon 2\epsilon 4$  genotype were excluded). ApoE polymorphism did not appear to affect CSF-apoE levels in the control group. In the AD group, CSF-apoE levels, even not significantly different ( $p = 0.068$ ), seems to decrease according to the allelic group  $\epsilon 4 < \epsilon 3 < \epsilon 2$  (Fig. 2). The ApoE level in CSF of AD patients for each allelic group was higher compared with that of control group. CSF-apoE levels also did not differ significantly among any of the subject categories when we compared individuals with 0, 1, or 2 apoE  $\epsilon 4$  alleles (data not shown).

#### 4. Discussion

The frequency of apoE- $\epsilon 4$  allele in late-onset Alzheimer's patients was shown to be comparable to most recent studies (Poirier et al., 1993; Kuusisto et al., 1994; Yoshizawa et al., 1994; for review see Siest et al., 1995).

The increased levels of CSF-apoE in AD patients, are indirectly supported by the already reported results showing that apoE mRNA is significantly increased in brains of patients with AD compared with those of controls (Diedrich et al., 1991; Yamada et al., 1995). Moreover, the high levels of CSF apoE in neurological patients compared to controls are consistent with the study of Carlsson et al. (1991) who reported increased levels of apoE in the CSF of neurological patients, notably those with acute or chronic inflammatory central nervous system disease (Table 3). Our results corroborate findings that apoE is increased following neuronal damage (Mahley, 1988; Poirier et al., 1993).

However, previous studies measuring apoE concentrations in cerebrospinal fluid of AD patients reported variable results. Some of them (Blennow et al., 1994; Pirttilä et al., 1994; Lehtimäki et al., 1995) reported that CSF-apoE levels were lower in these patients compared to controls.

Table 3  
Summary of results in the mains works studying apoE in cerebrospinal fluid

	Method	Alzheimer	Controls	Other pathologies
Rifai et al. (1987)	Immunoturbidimetry	ND	$1.4 \pm 0.5$ ( $n = 26$ )	$1.63 \pm 0.6^a$ ( $n = 33$ )
Carlsson et al. (1991)	ELISA	ND	$5.9 \pm 1.6$ ( $n = 64$ )	$7.4 \pm 3.1^{**}$ ( $n = 483$ )
Pirttilä et al. (1994)	ELISA	$4.93 \pm 2.2^*$ ( $n = 69$ )	$5.58 \pm 1.7$ ( $n = 71$ )	
Blennow et al. (1994)	ELISA	$1.5 \pm 1.2^{***}$ ( $n = 11$ )	$5.0 \pm 2.7$ ( $n = 10$ )	$3.1 \pm 1.5^{b*}$ ( $n = 10$ )
Gaillard et al. (1996)	TR-IFMA <sup>c</sup>	ND	$5.5 \pm 1.1$ ( $n = 10$ )	$3.4 \pm 2.3^{a**}$ ( $n = 29$ )
Rösler et al. (1996)	ELISA	$1.49 \pm 0.07$ ( $n = 16$ )	$1.68 \pm 0.14$ ( $n = 10$ )	$1.60 \pm 0.11$ ( $n = 20$ )
Our results	ELISA	$2.07 \pm 0.80^{***}$ ( $n = 38$ )	$0.80 \pm 0.34$ ( $n = 31$ )	$1.57 \pm 0.67^{***}$ ( $n = 47$ )

<sup>a</sup> Multiple sclerosis patients.

<sup>b</sup> Frontal lobe dementia.

<sup>c</sup> Time-resolved immunofluorometric assay

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared to controls.

ND, not determined.

One recent study (Rösler et al., 1996) showed no difference between groups (see Table 3). Differences in overall CSF-apoE concentrations between studies may be due to methodological differences (Table 3). Antibodies and calibration are the main critical points. But the reported differences between controls and AD patients may be explained by other factors. Among the explanations for these discrepancies may be a difference in selection criteria of controls and/or also an heterogeneity in the AD group.

The methodological hypothesis seems unlikely, as we used an immunoturbidimetric method using a second antibody to human apoE with some CSF samples (9 AD, 6 controls and 10 non-AD patients) and obtained respectively  $5.76 \pm 1.31$ ,  $3.29 \pm 1.18$  and  $4.05 \pm 2.76$  mg/l. The mean value was 2.5 times more elevated than that found with ELISA. With this method, the same differences were maintained except for the neurological group which showed no differences compared to other groups.

The difference in the selection criteria of controls may be a reasonable explanation. In the study of Lehtimäki et al. (1995) apoE concentrations were measured in serum and CSF corresponding to controls suffering from pathologies (tension headache, cervical syndrome, migraine, psychosomatic disorders, polyneuropathy, Parkinson's disease, brain tumors and cerebral infarction) and no specific analysis of CSF-apoE relationship with these different diseases was realized.

Heterogeneity in the AD groups is also linked to apoE polymorphism. Our AD group comported lower  $\epsilon 4$  frequencies compared to those of Lehtimäki (0.35 vs 0.55). Since we showed decreased tendency of CSF-apoE of AD patients with  $\epsilon 4$  isoform, the higher frequencies of  $\epsilon 4$  in Lehtimäki's AD patients may be the origin of decreasing CSF-apoE mean in this group compared to controls.

In our study, CSF-apoE levels were, independently of age and sex, significantly higher in AD patients than in very well-selected control subjects or those from other neurological and related diseases. However, in these latter patients, CSF-apoE levels were dependent on the specific pathology. CSF-apoE levels in CVD patients were similar to control subjects. Patients with NMD, ME, and LBP had increased levels of CSF-apoE similar to AD patients.

The inclusion of a disease control group is very important to verify the already reported results and to show that the increase in CSF-apoE levels in the AD patients probably reflected an inflammation reaction and/or neuron damage that may be common to AD and other diseases such as meningoencephalitis, motor neuron disease, and low back pain. It is important to note that apoE concentrations were also found to be increased in the plasma of individuals suffering chronic low back syndrome and motor neuron disease (VanderPutten et al., 1993; Ikeda et al., 1993; Cameron et al., 1995), and seemed to result from chronic inflammatory insults associated with damage nerve regeneration. Here we reported increased levels of apoE in the CSF of patients suffering from the same pathologies.

Our results support the hypothesis that apoE is involved in the pathogenesis of neurodegenerative disorders and can be a marker of neuronal damage or inflammatory process. ApoE might be secreted by astrocytes as a non specific reaction to neuronal damage, perhaps to allow local distribution of lipid arising from breakdown of neurons.

By extending the observation of apoE effect on nerve regeneration (Handelman et al., 1992; Poirier et al., 1993), we support the hypothesis that apoE may protect against the progression of neuronal damages that occur with some central nervous system pathogenesis. This ability is mediated by interaction with some specific receptors such as low density lipoprotein receptor (LDLR), very low density lipoprotein receptor (VLDLR) and low density lipoprotein receptor related protein (LRP). The latter two seem to be associated with AD (Rebeck et al., 1993; Tooyama et al., 1993; Okinuzumi et al., 1995). On the other hand, we showed, by *in vitro* assay, that in addition to the apoE genotype, the apoE content of VLDL is an important determinant of the receptor binding properties of VLDL (Bohnet et al., 1996). Our results showing CSF apoE 'total' levels elevated in some pathologies such as AD, the importance of the apoE content in lipoproteins should be investigated and verified in future studies. Such an elevation in brain may be implicated in apoE deposition alone or with other components (Wisniewski et al., 1995).

The ability of apoE in repair or remodeling seems to be dependent on its polymorphic variability. The linkage of  $\epsilon 4$  with AD may be explained by its lower effect on neuron regeneration or stabilization. On the other hand, apoE4 appeared to have a negative chaperoning role on A $\beta$  deposition in the AD brain and correlated to density of senile plaques in brain (Rebeck et al., 1993; Schmechel et al., 1993). An alteration of both the lipid transport system during neuronal remodeling and clearance of A $\beta$  via apoE-A $\beta$  complexes could be central to the AD process.

The tendency of CSF-apoE concentration to decrease with  $\epsilon 4$  allele compared to  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 3$  may be linked to the higher accumulation of this isoform in amyloid plaques. This phenomena may be favored by its preferential binding to A $\beta$  protein or LRP. But this tendency should be confirmed with a larger number of patients.

In conclusion, we have found that CSF apoE levels increase significantly with AD compared to controls and to other neurological and related diseases and so is with some pathologies like motor neuron disease, meningoencephalitis and low back pain compared to controls. This may indicate a common mechanism between these diseases linked to an inflammatory process.

Our results underline the importance of selection criteria of controls which must be subject to rigorous recruitment and besides suggested to go thoroughly into CSF apoE comparison between groups according to genotype notably but also age and sex. Finally, in the context of its role in neuronal damage reparation, apoE may be used to follow up efficiency of the future therapeutics.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Philippe Bertrand for helpful discussion of this work. We also wish to thank Dr Kiesmann at the Centre Hospitalier Universitaire Tzenberger, Strasbourg, France for his contribution in the collection of CSF samples. We thank Dominique Aguillon, Karine Bohnet and Diane Derex for their technical support. Supported partially by a grant Contrat d'Incitation à la Recherche Clinique (CHU Brabois, Nancy, France) and the Region de Lorraine.

## References

- Blennow, K., Hesse, C. and Freaman, P. (1994) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is reduced in Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 5: 2534–2536.
- Bohnet, K., Pillot, T., Visvikis, S., Sabolovic, N., and Siest, G. (1996) Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors. *J. Lipid Res.*, 37: 1316–1324.
- Cameron, B.M., Vanderputten, D.M. and Merrill, C.R. (1995) Preliminary study of an increase of a plasma apolipoprotein E variant associated with peripheral nerve damage. *Spine*, 20: 581–589.
- Carlsson, J., Armstrong, V.W., Reiber, H., Felgenhauer, K. and Seidel D. (1991) Clinical relevance of the quantification of apolipoprotein E in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta*, 196: 167–176.
- Diedrich, J.F., Minnigan, H., Carp, R.I., Whitaker, J.N., Race, R., Frey II, W. and Haase, A.T. (1991) Neuropathological changes in scarpie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J. Virol.*, 65: 4759–4768.
- Folstein, M.R., Folstein, S.C., and McHugh G. (1975) 'Mini-mental state': a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.*, 12: 189–198.
- Gaillard, O., Gervais, A., Meillet, D., Delattre, J., Lyon-Caen, O. and Schuller, E. (1996) The apolipoprotein E intrathecal synthesis is decreased in multiple sclerosis. *Ann. Clin. Biochem.*, in press.
- Handelman, G.E., Boyles, J.K., Weisgraber, K.H., Mahley, R.Y. and Pitas, R.E. (1992) Effects of apolipoprotein E  $\beta$ -very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J. Lipid Res.*, 33: 1677–1688.
- Hixson, J.E., and Vernier, D.T. (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *J. Lipid Res.*, 31: 545–548.
- Ikeda, T., Suguichi, H., Senba, U., Shibuya, Y., Uji, Y., Okabe, H., and Araki, S. (1993) Preliminary finding on the variation of serum apolipoprotein levels in neuronal degeneration disorders. *J. Clin. Lab. Anal.*, 7: 1–4.
- Kuusisto, J., Koivisto, K., Mykkänen, L., Helkala, E.L., Vanhanen, M., et al. (1994) Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population-based study. *Br. Med. J.*, 309: 636–638.
- Lehtimäki, T., Pirttilä, T., Mehta, P.D., Wisniewski, H.M., Frey, H. and Nikkar, T. (1995) Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on apoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum. Genet.*, 95: 39–42.
- Lepage, L., Aguillon, D., Cuvelier, I., Schielle, F., Galteau, M.M. and Siest, G. (1986) Etude familiale de quelques modifications génétiques par électrophorèse bidimensionnelle. In *Recent Progress in Two-dimensional Electrophoresis* (M.M. Galteau, and G. Siest, Eds). Presses Universitaires, Nancy, 141–148.
- Linton, M.F., Gish, R., Hubl, S.T., Butler, E., Esquivel, C., Bry, W.I., Boyles, J.K., Wardell, M.R. and Young, S.G. (1991) Phenotypes of apolipoprotein A and apolipoprotein E after liver transplantation. *J. Clin. Invest.*, 88: 270–281.
- Lucotte, G., David, F., Visvikis, S., Leninger-Muller, B., Siest, G. and Barbron, M.C. (1993) Apolipoprotein-E- $\epsilon$ 4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet*, 3342: 1309.
- Lucotte, G., Visvikis, S., Leninger-Muller, B., David, F., Bevrache, S. and Reveilleau, S. (1994) Association of apolipoprotein-E allele  $\epsilon$ 4 with late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Am J. Med. Genet.*, 54: 286–288.
- Mahley, R.W. (1988) Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240: 622–630.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS/ADRDA. Working Group under the auspices of the Department of Health and Human Services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, 34: 939–944.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, S. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.*, 16: 12–15.
- Nathan, B.P., Bellestra S., Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. and Pitas, R.E. (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 et E4 on neuronal Growth in vitro. *Science*, 264: 850–852.
- Okinzumi, K., Onodera, O., Namba, Y., Ikeda, K., Yamamoto, T., Seki, K., Ueki, A., Nanko, S., Tanaka, H., Takahashi, H., Oyanagi, K., Mizusawa, H., Kanazawa, I. and Tsuji S. (1995) Genetic association of the the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic AD. *Nature Genet.*, 11: 207–209.
- Pirttilä, T., Mehta, P.D., Lehtimäki, T., Kim, K.S., Sersen, E.A., Frey, H., Nikkari, T. and Wisniewski, H.M. (1994) Relationship between apolipoprotein E4 allele and CSF amyloid  $\beta$ -protein in Alzheimer's disease and controls. *Neurosci. Res. Commun.*, 15: 201–207.
- Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D. and Weisgraber, K.H. (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.*, 262: 14352–14360.
- Poirier, J., Baccichet, A., Dea, D. and Gauthier, S. (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience*, 55: 81–90.
- Rebeck, G.W., Reither, J., Strickland, D.K. and Hyman, B.T. (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, 11: 575–580.
- Rifai, N., Christenson, R.H., Gelman, B.B., Silverman, L.M., (1987) Changes in cerebrospinal fluid IgG and apolipoprotein E indices in patients with multiple sclerosis during demyelination and remyelination. *Clin. Chem.*, 33: 115–117.
- Rösler, N., Wichart, I., and Jellinger, K.A. (1996) Intra vitam lumbar cerebrospinal fluid and serum and postmortem ventricular immunoreactive apolipoprotein E in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosurg. Psychiatry*, 60: 452–454.
- Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D. and Roses A.D. (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Sci.*, 90: 9649–9653.
- Siest, G., Pillot, T., Régis-Bailly, A., Leninger-Muller, B., Steinmetz, J., Galteau, M.M. and Visvikis, S. (1995) Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin. Chem.*, 41: 1068–1086.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pecicak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993) ApolipoproteinE: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type  $\epsilon$ 4 allele in late onset familial Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 9: 1977–1981.
- Tooyama, T., Kawamata, T., Akiyama, H., Moestrup, S.K., Gliemann, J. and McGeer, P.L. (1993) Immunohistochemical study of  $\alpha$ 2-macro-

- globulin receptor in Alzheimer and control postmortem human brain. *Molec. Chem. Neuropath.*, 18: 153–160.
- VanderPutten, D.M., Cameron, B.M. and Merrill, C.R. (1993) Increased apolipoprotein-E concentrations in individuals suffering chronic low back syndrome identified by two-dimensional gel electrophoresis. *Appl. Theor. Electroph.*, 3:247–252.
- Wisniewski, T., Lalowski, M., Golabek, A., Vogel, T. and Frangione, B. (1995) Alzheimer's disease: an apoE amyloidosis? *Lancet*, 345: 956–958.
- Yamada, T., Kondo, A., Takamatsu, J-I., Tateishi, J., Goto, I. (1995) Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neuro. Sci.*, 129: 56–61.
- Yoshizawa, T., Yamakawa-Kobayashi, K., Komatsuzaki, Y., Arimani, T., Oguni, E., Mizusawa, H., et al. (1994) Dose-dependent association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 with late onset, sporadic Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 36: 656–659.
- Zlokovic, B.V., Martel C.L., Mackic J.B., Matsubara E., Wisniewski T., McComb G., Frangione B. and Ghiso J. (1994) Brain uptake of circulating apolipoprotein J and E complexed to Alzheimer's amyloid  $\beta$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 1431–1437.

Publication N°2

Journal of American Geriatric Society (1997) 45(12): 1536.

**Apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid  
increases with ageing.**

Blain H., Jeandel C., Merched A., Visvikis S. and Siest G.



## LETTERS TO THE EDITOR

### APOLIPOPROTEIN E LEVEL IN CEREBROSPINAL FLUID INCREASES WITH AGING

*To the Editor:* Apolipoprotein E (ApoE) is thought to play a pivotal role in the mobilization and redistribution of cholesterol and phospholipids after neuronal damage. The loss of synapses, such as occurs in Alzheimer's disease (AD), seems to induce a reactive synaptogenesis from undamaged neurons that coincides with increased expression of ApoE in astrocytes and ApoE LDL receptors binding activity in deafferented layers.<sup>1,2</sup>

ApoE, the principal apolipoprotein in the cerebrospinal fluid (CSF), is essentially derived from the brain and, therefore, can reflect cerebral ApoE production.<sup>3</sup> The ApoE CSF level is shown to be increased in some neurodegenerative diseases, such as AD, and in inflammatory conditions.<sup>4</sup> We hypothesized that ApoE also plays a neurotrophic role in physiological neuronal aging.

To determine if ApoE varies in the CSF according to age, we measured CSF ApoE concentration in 40 patients (18 men, 22 women, mean age  $60.52 \pm 16.56$  years, range 26–89 years) without any symptoms or signs of central or peripheral nervous system disease and without CSF cytology or chemistry disorder. Lumbar punctures were performed for diagnosis of fever or staging of lymphoma. ApoE measurements were performed by ELISA method as described elsewhere.<sup>4</sup>

The analysis of results by linear regression showed a positive correlation of ApoE with age ( $r = .51$ ;  $P < .001$ ) (Figure 1). When we used the ratio of ApoE to total CSF protein, we found the same tendency ( $r = .38$ ;  $P < .001$ ). This evolution was linked neither to the sex nor to the variant allelic of ApoE (e.g., the three isoforms ApoE2, ApoE3, and ApoE4) (results not shown).

To our knowledge, this is the first study reporting an increase in ApoE concentration in CSF with aging. Because ApoE has limited access across the blood-brain barrier,<sup>5</sup> we can admit that the increased CSF APOE level with normal aging is the result of an increase in local synthesis, perhaps linked to the physiological neuron cell loss.

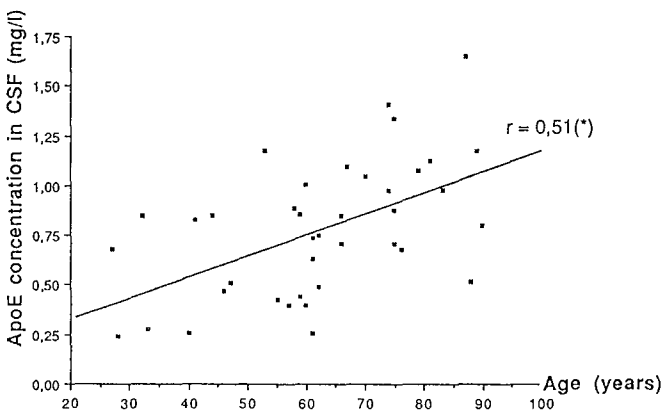


Figure 1. Relationship between apolipoprotein E in CSF and aging. (\*)  $P < .001$ .

These results suggest that in the same way as in central nervous system pathologies, ApoE may play a role in the dendritic remodeling and compensatory synaptogenesis that occur with normal aging; they also underline that age must be taken into account in case control studies as a factor affecting ApoE levels in cerebrospinal fluid.

Hubert Blain, MD  
Claude Jeandel, MD  
Nancy-Brabois University Hospital

Aksam Merched, MSc  
Sophie Visvikis, PhD  
Gerard Siest, PhD  
URA CNRS 597  
Vandoeuvre les Nancy, France

### REFERENCES

1. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *TINS* 1994;17:525–530.
2. Yamada T, Kondo A, Takamatsu JI et al. Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients' Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1995;129:56–61.
3. Linton MF, Gish R, Hubl ST et al. Phenotypes of apolipoprotein A and apolipoprotein E after liver transplantation. *J Clin Invest* 1991;88:270–281.
4. Merched A, Blain H, Visvikis S et al. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late-onset Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 1997;145:33–39.
5. Zlokovic BV, Martel CL, Mackic JB et al. Brain uptake of circulating apolipoprotein J and E complexed to Alzheimer's amyloid  $\beta$ . *Biophys Res Commun* 1994;205:1431–1437.

### INCREASED OXIDATIVE DAMAGE IN LYMPHOCYTES OF ALZHEIMER'S DISEASE PATIENTS

*To the Editor:* Oxidative stress has been involved in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases. Free radicals can damage cellular structures reacting with lipids, proteins, and nucleic acids. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is a reliable marker of oxidative DNA modification. High levels of 8-OHdG were found in lymphocytes or mononuclear cells of subjects suffering from different autoimmune diseases<sup>1</sup> or diabetes.<sup>2</sup> In a previous study,<sup>3</sup> we found a marked increase of nuclear and mitochondrial 8-OHdG in brains of Alzheimer disease (AD) patients compared with normal aged subjects. In order to further evaluate the presence of oxidative damage in AD, we measured 8-OHdG in lymphocytes obtained from 12 AD patients (mean age  $\pm$  SD  $73.3 \pm 6.0$ ) and 12 normal controls (mean age  $\pm$  SD  $75.8 \pm 6.4$ ). Ten milliliters of heparinized blood was layered on Lymphoprep (Nycomed) and centrifuged at 800 g. Nuclear DNA was extracted from pelleted lymphocytes after osmotic lysis of red blood cells and washing with saline. 8-OHdG was measured by means of HPLC with electrochemical detection as previously reported.<sup>3</sup> A significantly higher content of 8-OHdG, expressed as fmol/ $\mu$ g DNA, was found in lymphocytes of AD patients ( $40.4 \pm 12.2$ ; range 24.9–59.8) compared with controls ( $23.7 \pm 7.2$ ; range 14.0–35.2) ( $P < .001$ ) (Figure 1). This finding might reflect an

Publication N°3

Neurosciences Letters (1998). 241: 1-3.

**Apolipoprotein A-IV codon 360 mutation increases  
with aging and is not associated with  
Alzheimer's disease**

Merched A., Xia Y., Papadopoulou A., Siest G. and Visvikis S.

## Apolipoprotein AIV codon 360 mutation increases with human aging and is not associated with Alzheimer's disease

Aksam Merched, Yongjing Xia, Anna Papadopoulou, Gérard Siest, Sophie Visvikis\*

Centre de Médecine Préventive UPRES, 2, rue du Doyen Jacques Parisot, F-54501 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Received 8 December 1997; received in revised form 29 December 1997; accepted 29 December 1997

### Abstract

In order to evaluate genetic apolipoprotein polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease (AD), we studied apolipoprotein (apo) AIV after apoE, an apolipoprotein also present in the brain. The allelic distribution of apoAIV codon 360 polymorphism was no different in AD group ( $n = 120$ ) compared with elderly healthy individuals ( $n = 119$ ). Surprisingly, this polymorphism was over-represented (11.40%, vs. 5.7%  $P < 0.005$ ) in all these aged subjects ( $74.29 \pm 8.46$  years) and independently of the clinical and mental status compared with the younger population ( $39.00 \pm 9.69$  years) of the same regional recruitment. These results suggest that the apoAIV (360:His) allele could be a marker of aging and longevity. © 1998 Elsevier Science Ireland Ltd.

**Keywords:** Longevity; Genetic marker; Alzheimer's disease; Apolipoprotein E; Apolipoprotein AIV (360:Gln:His); DNA polymorphism

Apolipoprotein (apo) AIV is a component of chylomicrons and high-density lipoproteins which shows a genetic polymorphism in Caucasian populations with two common alleles, ApoAIV-1 and ApoAIV-2. Previously, we identified these alleles to be a result of glutamine (CAG) to histidine (CAT) substitution at codon 360 [1]. Postulated functions of this apolipoprotein include: acting as an activator of the enzyme lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) [20], promoting removal of cellular cholesterol from extrahepatic tissue [21] and modulating the activation of lipoprotein lipase by apoC-II [9]. Genetic-association studies have demonstrated a relationship between apoAIV polymorphism and interindividual variability in plasma cholesterol, triglyceride and glucose levels in supposedly healthy populations, but the results have been somewhat controversial [15–17,25]. Little is known about the function of this apolipoprotein at the level of the central nervous system (CNS). Some studies have attributed roles to apoAIV during degenerative and regenerative processes in the peripheral and central nervous systems, as well as during development

in cell culture and animal models [3,10]. Others suggest that apoAIV may act in the CNS as a factor to control appetite during food intake [8].

It was reported that apoAIV was first supposed to cross the blood-brain-barrier [6,14]. However, the recent localization of apoAIV within the brain [12] and in the CSF [2] increases the potential role of this protein in the CNS. Unchanged apoAIV expression in Alzheimer's disease (AD) brains compared with controls suggests that qualitative rather than quantitative change may be linked to this pathology. Collectively, these data led us to investigate the common apoAIV polymorphism implication in AD. We report our findings as a response to very recent results reporting an association of the apoAIV codon 360 mutation with AD [4].

The population studied included 120 patients (88 females, 32 males) with probable AD established according to the criteria of the NINCDS-ADRDA work group. All patients with AD had a mini-mental state (MMS) score of less than 25. Moreover, we included a population of 119 presumed-healthy elderly subjects (62 females, 57 males) participating in systematic health screening at the Center for Preventive Medicine in Nancy, France. These subjects were

\* Corresponding author. Fax: +33 383 448721;  
e-mail: gerard.siest@cmp.u-nancy.fr

Table 1  
ApoE and AIV allelic distributions in AD and control groups

	AD patients	Elderly control group	All elderly	General population <sup>a</sup>
n (M/F%)	120 (27.5/72.5)	119 (51.8/48.2)	239 (60.4/39.6)	264 (50.4/49.6)
Age (years ± SD)	77.87 ± 8.47	70.68 ± 6.52	74.29 ± 8.46	39.00 ± 9.69
AIV allelic frequency (AIV-2)	9.5%	13.27%	11.38% <sup>b</sup>	5.68%
ApoE allelic frequency				
ε4 <sup>c</sup>	27.70%	12.27%	-	-
ε3	66.84%	79.55%	-	-
ε2	5.46%	8.18%	-	-

<sup>a</sup> from our previous results [23].  
<sup>b</sup> P < 0.005 compared with general population.  
<sup>c</sup> P < 0.0005 for comparison between AD and elderly control groups.

supposed to be free of AD symptoms after clinical examinations performed by general clinicians. The results of this study were compared with those previously described from the general population of the same region [23].

Genotyping was performed with DNA isolated from nucleated blood cells [18]. The ApoE genotype was determined as described elsewhere [13]. ApoAIV codon 360 genotyping was performed with a technique using a bispecific-allele primer amplification established in our laboratory [26]. In this technique a simple electrophoresis of PCR products is used for typing the variation at codon 360. When DNA was not available, apoE and apoAIV phenotyping was performed using two-dimensional electrophoresis as described elsewhere [22,23].

The frequency of apoAIV alleles was not significantly different between AD and the elderly control group (Table 1). However, in both groups, apoAIV (360:His) allele frequency was higher than in the general population with a mean age of 39.00 ± 9.69 years, compared with 70.68 ± 6.52 years for elderly and 77.87 ± 8.47 years for AD patients (P < 0.05 and P < 0.001, respectively). These results suggest that this mutation is over-represented at an advanced age and is not linked to AD risk.

Next the results were analyzed with respect to apoE polymorphism and the presence or absence of the ε4-allele: the major genetic risk factor of AD (Table 2). Irrespective of the presence or the absence this allele, individuals have the same apoAIV allelic distribution and there is no significant additional risk for AD for the apoAIV (360:Gln:His) allele carriers. In the AD group, the mini-mental score [7] was not influenced by apoAIV 360 polymorphism (not shown).

The comparison of the frequency of apoAIV alleles

described here and previously reported revealed similarities in AD patients but also very significant differences in elderly control groups (13.27% here vs. 3.5% in the study of Csazar et al. [4]) despite the same mean age for both groups. The reason for this discrepancy is unclear. Nevertheless, it is interesting to note that the control populations in both studies were also different in ApoE genetics. ApoE4 frequency in our group was 12.27% and it was 7% in the study of Csazar et al. [4]. This is relatively low compared with the frequency of this allele in the general population of many European countries (see [19] for review). It is also low compared with what is already reported in larger populations by the same authors [20] who reported a ε4-allele frequency of 12.9% in a sample of 202 subjects.

Of primary interest in the current study is the fact that the frequency of the apoAIV 360 mutation was relatively elevated in the elderly population, independently of the clinical state (e.g. in either an AD population or the control group compared with younger individuals). This mutation was also frequent in 26 patients with vascular dementia (9.26%, not shown). These findings suggest that this mutation may be linked more to healthy aging or 'longevity' than to a specific aging-disease. It is clear that apoAIV (360:Gln:His) allele frequencies are different between European countries with a gradient increasing from north (4.9%) to south (10.5%) [5]. However, these data were collected from younger populations and did not address elderly populations. The relevance of the potential implication of the apoAIV (360:Gln:His) allele in aging is beyond the scope of this study. This question can be addressed better in a population which includes older subjects.

It is noteworthy that the 360 mutation of apoAIV confers

Table 2  
ApoAIV 360 allelic distribution according to ε4-allele presence between AD and elderly control group

Subjects	With 1 or 2 ε4-allele		Without ε4-allele	
	AD patients	controls	AD patients	controls
Without AIV-2-allele	48	20	48	63
With 1 or 2 AIV-2-allele	10	6	12	21
Odds ratio (confidence interval)	0.69 (0.22-2.15)		0.75 (0.50-1.13)	

a structural change [24] that may lead it to be more hydrophobic, more efficient in LCAT activation and better linked to lipoproteins. All these functions, with others to be determined, may protect from cardio and cerebrovascular diseases. Our results suggest that apoAIV(360:His) could modulate aging-associated functions and needs to be investigated in longevity studies.

- [1] Boerwinkle, E., Visvikis, S. and Chan, L., Two polymorphisms for amino acid substitutions in the APO A4 gene, *Nucleic Acids Res.*, 18 (1990) 4966.
- [2] Borghini, I., Barga, F., Pometta, D. and James, R.W., Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid, *Biochem. Biophys. Acta*, 1255 (1995) 192-200.
- [3] Boyles, J.K., Natterpek, L.M. and Anderson, L.J., Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 17805-17815.
- [4] Csazar, A., Kalman, J., Szalai, G., Janka, Z. and Romics, L., Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation in patients with Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, 230 (1997) 151-154.
- [5] Ehrholm, C., Tenkanen, H., de Knijff, P., Havekes, L., Rosseneu, M., Menzel, H.J. and Tiret, L., On behalf of the EARS group. Genetic polymorphism of apolipoprotein AIV in five different regions of Europe, *Atherosclerosis*, 113 (1995) 157-166.
- [6] Elshourbagy, N.E., Liao, W.S., Mahley, R.W. and Taylor, J.M., Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenal, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 203-207.
- [7] Folstein, M.F., Folstein, S.C. and McHugh, G., 'Mini-mental state': a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician, *J. Psychiatry Res.*, 12 (1975) 189-198.
- [8] Fujimoto, K., Fukagawa, K., Sakata, T. and Tso, P., Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats, *J. Clin. Invest.*, 91 (1993) 1830-1833.
- [9] Goldberg, I.J., Scheraldi, C.A., Yacoub, L.K., Saxena, U. and Bisgali, C.L., Lipoprotein apo CII activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein AIV, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 4266-4272.
- [10] Goodrum, J.F., Bouldin, T.W., Zhang, H.Z., Maeda, N. and Popko, B., Nerve regeneration and cholesterol reutilization occur in the absence of apolipoproteins E and A-I in mice, *J. Neurochem.*, 64 (1995) 408-416.
- [11] Hallman, D.M., Boerwinkle, E., Saha, N., Sandholzer, C., Menzel, H.J., Csazar, A. and Utermann, G., The apolipoprotein E polymorphism: comparison of allele frequencies and effects in nine populations, *Am. J. Hum. Genet.*, 49 (1991) 338-349.
- [12] Harr, S.D., Uint, L., Hollister, R., Hyman, B.T. and Mendez, A.J., Brain expression of Apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, 66 (1996) 2429-2435.
- [13] Hixson, J.E. and Vernier, D.T., Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI, *J. Lipid. Res.*, 31 (1990) 545-548.
- [14] Karathanasis, S.K., Yunis, I. and Zannis, V.J., Structure, evolution, and tissue-specific synthesis of human apolipoprotein AIV, *Biochemistry*, 25 (1986) 3962-3970.
- [15] Lagrost, L., Gambert, P., Meunier, S., Morgado, P., Desgres, J., d'Athis, P. and Lallemand, C., Correlation between apolipoprotein AIV and triglyceride concentrations in human sera, *J. Lipid Res.*, 30 (1989) 701-710.
- [16] Menzel, H.J., Boerwinkle, E., Schrangl-Will, S. and Utermann, G., Human apolipoprotein AIV polymorphism: frequency and effect on lipid and lipoprotein levels, *Hum. Genet.*, 79 (4) (1988) 368-372.
- [17] Menzel, H.J., Sigurdsson, G., Boerwinkle, E., Schrangl-Will, S., Dieplinger, H. and Utermann, G., Frequency and effect of human apolipoprotein AIV polymorphism on lipid and lipoprotein levels in an Icelandic population, *Hum. Genet.*, 84 (4) (1990) 344-346.
- [18] Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, S., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucl. Acids. Res.*, 16 (1988) 12-15.
- [19] Siest, G., Pillot, T., Régis-Bally, A., Leninger-Muller, B., Steinmetz, J., Galteau, M.M. and Visvikis, S., Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine, *Clin. Chem.*, 41 (8) (1995) 1068-1086.
- [20] Steinmetz, A. and Utermann, G., Activation of lecithin cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A IV, *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 2258-2264.
- [21] Steinmetz, A., Barbaras, R., Ghali, N., Clavey, V., Fruchart, J.C. and Allhaud, G., Human apolipoprotein AIV binds to apolipoprotein AII receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells, *J. Biol. Chem.*, 265 (14) (1990) 7859-7863.
- [22] Visvikis, S., Steinmetz, J., Cuvelier, I., Galteau, M.M. and Siest, G., Study of ApoA1 and ApoE polymorphisms using two dimensional electrophoresis. In M.M. Galteau and G. Siest (Eds.), *Recent Progresses in Two-Dimensional Electrophoresis*, Presses Universitaires Nancy, France, 1986, pp. 159-165.
- [23] Visvikis, S., Steinmetz, J., Boerwinkle, E., Gueguen, R., Galteau, M.M. and Siest, G., Frequency and effects of the apolipoprotein AIV polymorphism, *Clin. Genet.*, 36 (1989) 435-441.
- [24] Weinberg, R.B., Jordan, M.K. and Steinmetz, A., Distinctive structure and function of human apolipoprotein variant ApoA-IV-2, *J. Biol. Chem.*, 265 (30) (1990) 18372-18378.
- [25] Zalou, M., Visvikis, S., Gueguen, R., Parra, H.J., Fruchart, J.C. and Siest, G., DNA polymorphism of human apolipoprotein AIV gene: frequency and effects on lipid, lipoprotein levels in a French population, *Clin. Genet.*, 46 (1994) 248-254.
- [26] Zaiou, M., Visvikis, S., Visvikis, A. and Siest, G., A rapid and reliable method for direct genotyping of codon 360 in the human apolipoprotein AIV gene, *J. Lipid Res.*, 33 (1992) 1061-1066.

Publication N°4

*Journal of Neurochemistry* (en révision)

**Increased levels of ApoD in cerebrospinal fluid and  
hippocampus of Alzheimer's patients.**

Terrisse L., Poirier J., Bertrand Ph., Merched A., Siest G., Milne R., Rassart E.

## INCREASED LEVELS OF APOLIPOPROTEIN D IN CEREBROSPINAL FLUID AND HIPPOCAMPUS OF ALZHEIMER'S PATIENTS

Terrisse L.<sup>a</sup>, Poirier J.<sup>b</sup>, Bertrand P.<sup>b</sup>, Merched A.<sup>c</sup>, Visvikis S.<sup>c</sup>, Siest G.<sup>c</sup>, Milne R.<sup>d</sup>, and  
Rassart, E.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal,  
Montréal, Qué., Canada, H3C-3P8

<sup>b</sup> Douglas Hospital Research Centre, Centre for Studies in Aging, McGill  
University, Montréal, Qué., Canada, H4H 1R3

<sup>c</sup> Centre de Medecine Préventive, URA-CNRS 597, 2 rue du Doyen Jacques  
Parisot, F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

<sup>d</sup> Lipoproteins and Atherosclerosis Group, University of Ottawa Heart Institute,  
1053 Carling Av., Ottawa, Ontario, Canada, K1Y 4E9

Running title : Increased levels of apolipoprotein D in Alzheimers

Corresponding author : Dr. Éric Rassart

Département des sciences biologiques,  
Université du Québec à Montréal, Montréal,  
Qué., Canada, H3C-3P8

Tél.: (514) 987-3000 ext.3953#

Fax: (514) 987-4647

Email : rassart. éric @ uqam.ca

## ABSTRACT

Apolipoprotein (apo) D is a member of the lipocalin family of proteins. Most members of this family are transporters of small hydrophobic ligands, although in the case of apoD, neither its physiological function(s) nor its putative ligand(s) have been unequivocally identified. In humans, apoD is expressed in a number of tissues, including the central nervous system, and its synthesis is greatly increased during regeneration of peripheral nerves. As apoD may have an important function in the nervous system and, particularly, in nerve regeneration, we measured immunoreactive apoD levels in the hippocampus and in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with either Alzheimer's disease (AD) or other neuropathologies. In parallel, we determined the concentrations of apoE, another apolipoprotein also implicated in nerve regeneration and in the etiology of AD. ApoD but not apoE, was increased in the hippocampus of AD patients compared to controls. ApoD concentrations, as determined by radioimmunoassay, were significantly increased in the CSF of AD patients ( $4.23 \pm 1.58$ ) and patients with other pathologies ( $3.29 \pm 1.35$ ) compared to those in the CSF of normal subjects ( $1.15 \pm 0.71$ ). Although the differences were smaller than for apoD, the mean apoE concentrations in the CSF of both groups of patients were also significantly higher than those of controls. In AD patients, apoD, but not apoE, levels increased as a function of inheritance of the  $\epsilon 4$  apoE allele. This study therefore demonstrates that increased apoD levels in the hippocampus and in CSF are a marker of neuropathologies including AD and are independent of apoE concentrations.

Keywords: Alzheimer's disease, ApolipoproteinD, ApolipoproteinE, Neurodisorders, Neurodegeneration, Nerve Regeneration



## INTRODUCTION

Apolipoprotein D (apoD) is a 169 amino acid glycoprotein of apparent Mr 29,000 that was originally identified as a component of high density plasma lipoproteins (HDL) and was subsequently shown to be identical to GCDFP-24, a progesterone-binding protein present in high concentration in mammary gross cystic fluid (1-3). ApoD is one of the lipocalins, a superfamily of proteins (3) that adopt an 8-stranded  $\beta$ -barrel tertiary structure and transport small hydrophobic ligands (4). Several candidate apoD ligands have been proposed. In addition to progesterone, apoD can bind pregnenolone (5,6), bilirubin (4) and arachidonic acid (7) with high affinity. Whether any or all of these molecules represent physiological ligands of apoD remains to be proven. In rhesus monkey (8) and rabbit (9), apoD expression occurs primarily in interstitial and connective tissue fibroblasts of spleen, adrenals, lungs, and testes and, within the central nervous system (CNS), in astrocytes and oligodendrocytes of the white matter (8,10). In mouse and rat, apoD expression is essentially restricted to the CNS with very high levels in the spinal cord, cerebellum and the brain (11). Patel and al. (12) have also shown that apoD is constitutively secreted by rat astrocytes. Cultured human fibroblasts express apoD only when in a growth arrested state (13) and its expression in human breast carcinoma cell lines is up-regulated by androgens (14-16) and retinoic acid (17) and down-regulated by estrogens (14).

ApoD mRNA and immunoreactive apoD protein levels increase approximately 40 and 500 times, respectively, in rat peripheral nervous tissue after experimental injury (18,19). Other apolipoproteins, apoE, apoA-I and apoA-IV also accumulate at the site of regeneration (20) but only the increases in apoD and apoE concentrations result from local synthesis. Although apoE is thought to play a role in lipid redistribution after neuronal injury (21), peripheral nerve regeneration is not impaired in apoE (22) or apoE / apoA-I (23) knockout mice. In the CNS of mice, on the other hand, apoE is important after injury and its absence results in synaptic loss (24). ApoE is a 299 amino acid protein that exists as 3 common isoforms, apoE2, apoE3 and apoE4 encoded by 3 co-dominantly expressed alleles (21). ApoE genetic

polymorphism is associated with susceptibility to Alzheimer's disease (AD). ApoE4 is considered to be a susceptibility gene that both increases the risk of AD and lowers the age of its onset (25-29). In contrast, apoE2 appears to be protective and is associated with a lower risk of AD and an increase in the age of onset (30). In addition to the genetic association between apoE polymorphism and susceptibility to AD, immunoreactive apoE can be observed within the neurofibrillary tangles and  $\beta$ -amyloid proteins in the senile plaques in the brains of AD patients.

In spite of a lack of similarity in structure, apoD and apoE share a number of common properties including their tissue distribution and the increase in their local synthesis following nerve injury. Within the central nervous system, the two proteins may play a coordinated role in both normal and pathological situations, including that of AD. We have, therefore, measured apoD and apoE levels in cerebrospinal fluid (CSF) and hippocampal tissue of AD patients, patients with other neuropathologies and normal subjects. Our results show a large increase in the concentration of apoD in the CSF of patients with AD or with other neuropathologies. We discuss the significance of this increase and possible roles of apoD within the CNS.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient populations, CSF and Hippocampus collection and apoE polymorphism

ApoD and apoE concentrations were determined in the CSF of 41 patients with AD (75.4 +/- 9.9 years), 11 subjects without the presence of any confirmed neuropsychiatric disease (control group, 67.4 +/- 11 years) and 29 patients with other neurological diseases including cerebrovascular disease, motorneuron disease and meningoencephalitis (64.3 +/- 13 years). The CSF samples were obtained (at the Centre de Medecine Préventive, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) , by routine lumbar puncture once informed consent was obtained from each patient. The samples were analysed for protein and stored in 0.2 ml aliquots at -196 °C . The clinical diagnosis of probable AD was established by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke. Patients without AD and control subjects had a

Mini Mental State Score of Folstein higher than 28. Patients with AD had a Mini-Mental State score of Folstein lower than 25. The control group was composed of subjects at which lumbar puncture has been released for diagnosis of fever or staging of lymphoma. These subjects had normal CSF cytology and chemistry. DNA was isolated from nucleated blood cells by the technique of Miller (Miller and al.,1988). ApoE genotyping was performed by Hha1 digestion of PCR amplified fragments spanning the apoE polymorphic sites (Hixson and Vernier,1990). This apoE genotyping was done at The Centre de Medecine Préventive as described by Merched et al.,1996 (56).

Human hippocampal tissue from 72 AD patients and from 35 control subjects were obtained from Dr. Carol Miller (USC school of medecine) of the Alzheimer Disease Research Consortium of LA and Orange Counties. Frozen tissues from autopsy confirmed caucasian cases of sporadic AD : females ( n =9, age=79 +/- 2 years), post-mortem delays (PMD) = 5.2 +/- 1 h.; males (n=13, age = 80 +/- 1 years, PMD = 4.5 +/- 0.7 h.). Controls were : females ( n=5, age = 67 +/- 4 years, PMD =11 +/- 2.7 h.) and males ( n=10, age = 54 +/- 5 years. PMD = 8.5 +/- 1h.) as described in reference 45. Genomic DNA was isolated from frozen frontal cortex and apoE genotype was determined by PCR using allele-specific primers according to Nalbantoglu and al.,1994 (57).

### **Electrophoresis and immunoblotting**

Hippocampal tissue was homogenized in KPO<sub>4</sub> 10mM - KCl buffer (pH 7.4). Samples (15 µg protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ( SDS-PAGE) under reducing and non-reducing conditions using 12% acrylamide gels (31). The migrated proteins were electrophoretically transferred to nylon membranes and, after saturation with 3% bovine serum albumin (BSA), the replicas were exposed to the anti-human apoD monoclonal antibody, 2B9 (32,33) or the anti-human apoE monoclonal antibody, 3H1 (34). Bound monoclonal antibody was detected by an anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate using the ECL detection system (Amersham).

### **Radioimmunometric assay**

ApoD was quantified in CSF by a solid phase immunometric assay using the anti-apoD monoclonal antibody 2B9 as was previously described (33). Immulon II Removawells (Dynatech) were coated overnight at room temperature with 50  $\mu$ l of a 1  $\mu$ g / ml solution of purified human apoD in 5mM glycine, pH 9.2. The wells were washed five times with 0.25% Tween 20 in PBS and then saturated with 300  $\mu$ l of 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 60 minutes at room temperature. This solution was then discarded and the wells were refilled with 100  $\mu$ l of a mixture of antibody and test CSF which was incubated for two hours. The appropriate dilution of 2B9 antibody had been determined in previous titration experiments. To make the mixture of test CSF and antibody, equal volumes of diluted antibody and diluted CSF were mixed. All dilutions were made in 1% BSA. The mixtures were incubated overnight at 4°C before addition to the saturated wells. After the two hours incubation, the contents were discarded and the wells were washed again with Tween-PBS buffer as before. Bound 2B9 antibody was detected by a 2 hour incubation with appropriately diluted <sup>125</sup>I-anti-mouse IgG. The wells were washed as before and radioactivity was counted. The assay was calibrated using pure apoD as the standard.

### **Statistical analysis**

Statistical differences between the CSF and hippocampal levels of the apolipoproteins between the clinical group and the control group were evaluated using an analysis of variance and a multiple comparison test on the least-squares means.

## **RESULTS**

Tissue extracts of hippocampus (Figure 1A) or CSF (Figure 1B) from AD patients, from patients with other neuropathologies or from control subjects were analysed by Western blotting for the presence of immunoreactive apoD and apoE. These were age-matched

subjects and the apoE2, E3, E4 genotypes are indicated above each sample. Both apolipoproteins were detected in all hippocampal extracts and in most CSF samples. ApoD seemed generally more abundant in both hippocampus and CSF of AD patients when compared to the age-matched control, although the concentration of apoE showed considerable variation. The bands representing apoD and apoE in hippocampal extracts of 72 AD patients and 35 controls were quantified by densitometry and the results are shown in figure 2A. ApoD levels in the hippocampal extracts were significantly higher ( $p < 0.005$ ) in AD patients than those of control subjects. Some studies have reported apolipoprotein variations in the CSF of patients with neuropathologies. We were therefore interested to measure ApoD and apoE levels in the CSF of AD patients. This was done by an accurate radioimmunologic assay and the results are shown in figure 2B. The apoD levels in the CSF of AD patients ( $4.23 \pm 1.58$ ) were 3 to 4 fold higher ( $p < 0.0001$ ) than those of normal subjects ( $1.15 \pm 0.71$ ). Also, the apoD levels in the CSF of patients with other neuropathologies ( $3.29 \pm 1.35$ ) were also significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than those of normal subjects ( $1.15 \pm 0.71$ ). This suggest that the increased concentration of apoD in hippocampus and CSF is not restricted to AD pathology since it is also increased in several different neuropathologies. A much smaller variation was observed for apoE in CSF between patients and controls. Nevertheless, apoE concentrations were higher in the CSF of AD patients and of patients with other neuropathologies than in the CSF of normal subjects ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively). Since the inheritance of an E4 allele is a risk factor in AD, we have determined if apoD concentration varied as a function of the apoE genotype within our patients and control groups. The apoD and apoE levels in hippocampal extracts and in CSF of the AD patients and normal controls were further analysed in terms of the apoE genotype of the subjects. Interestingly, the apoD concentrations in hippocampal extracts from AD patients with the E3/E3, E3/E4 and E4/E4 genotypes were significantly ( $p = 0.001$ ) higher than those of control subjects of the corresponding genotype (Figure 3A). More impressive, however, was the correlation between the concentration of apoD in the CSF of AD patients and the apoE genotype shown in Figure 4A. Indeed, the apoD concentration in the CSF of E4/E4 AD patients ( $5.8 \pm 0.73$ ) was significantly higher than that of E3/E4 AD patients ( $4.78 \pm 0.6$ ) which, in turn, was significantly higher than that of

E3/E3 AD patients ( $3.05 \pm 0.19$ ). No differences were seen in the apoD levels in the CSF of control subjects as a function of apoE genotype (Figure 4A). In contrast, apoE levels in hippocampal extracts (Figure 3B) and CSF (Figure 4B) of AD patients and controls appeared to be independent of the apoE genotype.

Since the group of AD patients was significantly older than the control group, it is possible that the higher apoD and apoE levels could reflect age differences between the groups. However, as shown in Figure 5, neither apoD nor apoE concentrations in the CSF of AD patients or control subjects were correlated with age. Moreover, no differences were observed in the apoD or apoE levels in CSF between males and females for any of the subject groups (not shown).

## DISCUSSION

We have demonstrated increased concentrations of apoD in the CSF of patients with AD and a variety of other neuropathologies compared to those in the CSF of normal subjects. ApoD represented up to 1% of total protein in the CSF of AD subjects. In subjects with other neuropathologies apoD accounted for 0.9% of CSF protein and in normal subjects 0.35%. While apoD concentrations in plasma are much higher than those found in CSF, apoD contributes only about 0.15% of total plasma protein (33). Compared to normal subjects, increased immunoreactive apoD levels were also found in the hippocampus of AD patients. While we can not exclude a pathology-associated increase in selective transfer of apoD across the blood-brain barrier in the patients, given the known tissue distribution of apoD gene expression in primates, it is probable that the increased levels of apoD present in the CSF and in the tissue samples from patients are the result of an increase in local synthesis. No differences were observed in plasma apoD levels between AD patients and normal subjects (unpublished results).

The apoE levels were also significantly higher in the CSF of AD patients ( $p < 0.001$ ) and in patients with other neuropathologies ( $p < 0.05$ ) than in the CSF of control subjects although the differences were less than that observed for apoD. In

other studies, apoE concentrations in the CSF of AD subjects have been reported to be higher than (35,36), similar to (39) or lower (37,38) than those of control subjects. Increased CSF apoE levels have been reported in a number of other neuropathologies including Creutzfeld-Jacob disease (40,41), Scrapie disease (42) and Lewis body disease (43). While we observed no correlation between apoD and apoE levels in our study, the apoD concentration in CSF of AD patients appeared to be influenced by the apoE genotype. Inheritance of an apoE4 allele was correlated, in a dose dependent manner, with increased apoD concentrations in CSF of AD patients. As the age of onset of the disease and the density of senile plaques in the cortex of AD patients (44) are negatively and positively correlated, respectively, with the number of inherited apoE4 alleles, the increased apoD levels in the CSF of AD patients with one or more apoE4 alleles may be a reflection of the severity of the disease. One could expect that as the disease progresses, apoD levels should increase with aging. Our results in figure 5 show, however, that apoD concentration in CSF is not correlated with in either the AD patients nor the controls subject. Furthermore, when the AD group was characterized by their Mini Mental State Score and separated into two groups according to the evolution of the pathology, no correlation ( $p < 0.3$ ) was seen between the severity of the AD and apoD concentration in the CSF. A correlation between inheritance of the apoE4 allele and apoD was also seen in the group of patients with other neuropathologies (not shown). Unlike apoD, apoE levels in CSF appeared to be independent of the apoE genotype of the subjects. The concentration and expression of another apolipoprotein, apoJ, has been shown to be influenced by the apoE genotype (45). Like apoD and apoE, apoJ is produced in the brain (46-48) and is overexpressed in response to neural injury (49,50). Bertrand et al. (45) observed increased levels of apoJ in brains of AD subjects in proportion to the number of inherited apoE alleles. ApoJ can bind to  $\beta$ -amyloid in plasma and CSF as well as to aggregated  $\beta$ -amyloid (51). It has been proposed that apoJ complexed with aggregated  $\beta$ -amyloid could be implicated in the etiology of AD.

It is possible that the increased immunoreactive apoD that we have observed in CSF and in the hippocampus of patients with AD and other neuropathologies, also observed following experimental peripheral nerve injury (17,18) may be in response to a common stimulus and that apoD may be playing a similar role in the two situations. ApoE is thought to be involved in lipid redistribution during axon degeneration and regeneration. ApoE can form complexes with lipid and, as it is a ligand for cell surface receptors, it can mediate the cellular uptake of lipoproteins (52). This is unlikely to be the role of apoD. In contrast to apoE, apoD is not predicted to have the structure of a typical apolipoprotein and, while it is found in plasma predominantly associated with high density lipoproteins, it would not be expected to be efficient in mobilizing lipid. Moreover, it is not known if a cell surface receptor for apoD exists. Nevertheless, apoD could be playing an accessory role in lipid redistribution such as stabilizing the enzyme lecithin cholesterol acyl transferase (53). However, as apoD is a member of the lipocalin superfamily, it seems more probable that apoD would transport a small hydrophobic ligand that is essential in high concentration in pathological situations. Both pregnenolone and progesterone, which have been shown to bind to apoD with high affinity, are present in the brain (54). As exogenous progesterone, as well as hydroxycholesterol, stimulate secretion of apoD by rat astrocytes (12), steroids and hormones released during cell injury or death in the brains of patients with AD or other neuropathologies could be a stimulus for apoD expression.

Based on the distribution of cells that express apoD within the CNS, Smith et al. (8) have proposed that apoD may serve to facilitate the transport of cholesterol across the blood-brain barrier. In AD or in other pathologies of the CNS, an increased requirement for such transport could be envisaged. However, apoD has a relatively low affinity for cholesterol (6). It is, nevertheless, conceivable that apoD could be implicated in the transport of a ligand other than cholesterol across the blood-brain barrier. As apoD gene expression in cultured human fibroblasts has been shown to be associated with growth arrest (16), it is possible that the increase in apoD in CSF and hippocampus of patients having pathologies of the CNS could



represent a relatively non-specific response to cell injury or death. In the case of peripheral nerve injury, this does not appear to be uniquely the case (17). After crush injury of rat sciatic nerve, there is a moderate increase in apoD expression that appears to be the result of the experimental lesion. This, however, is followed by an up-regulation of apoD gene expression that is restricted to sites undergoing regeneration. One would presume that apoD is playing some specific role in nerve regeneration. Within the CNS of patients with neuropathology, the increase in immunoreactive apoD could be indicative of both cell injury or death and ongoing nerve repair.

Whatever the role of apoD may be in the CNS, the present study clearly demonstrates that increased concentrations of apoD in the CSF are a marker of neuropathology including that associated with AD.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. Jeandel for the gift of CSF samples, the hospital Douglas brain Bank, Doris Dea and Louise Falstreault for their excellent technical assistance. We gratefully acknowledge support from the Medical Research Council of Canada (Grant MT-9880).

## REFERENCES

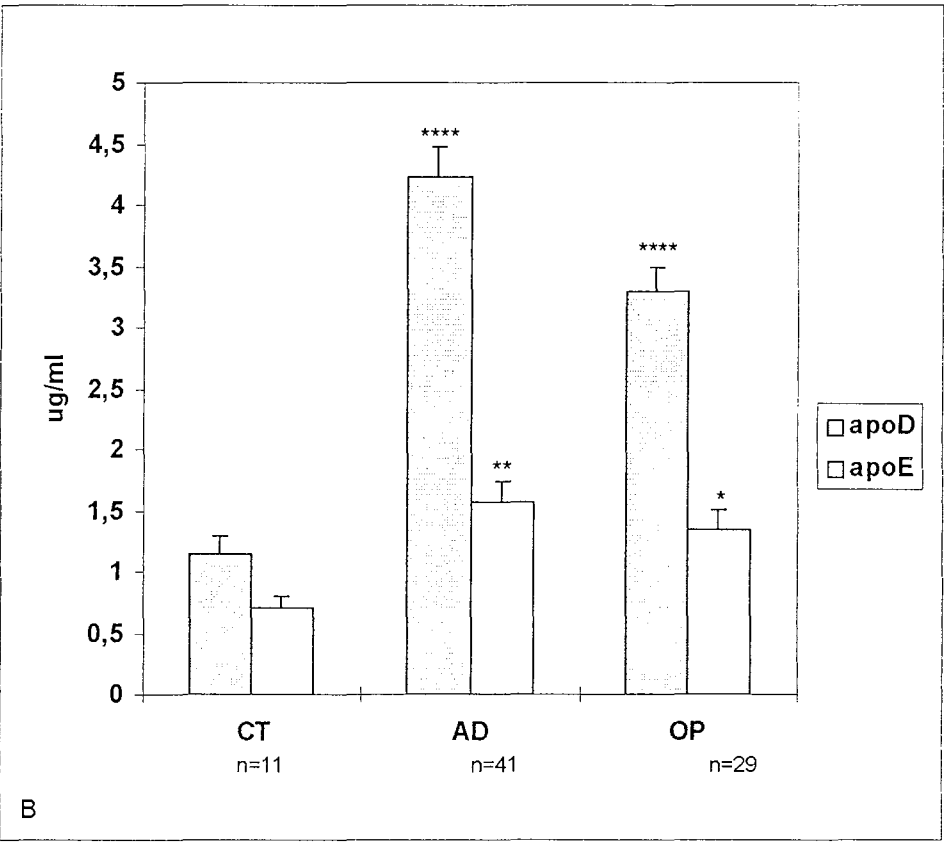
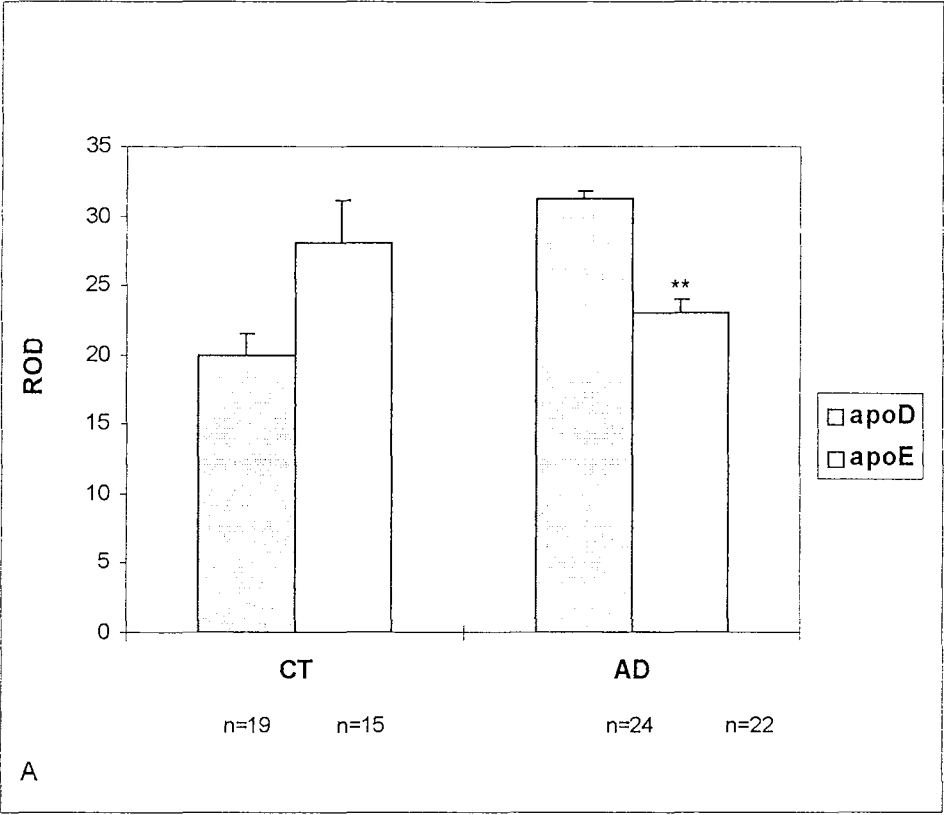
1. McConathy, W. and Alaupovic P. (1973) FEBS Letts., **37**, 178-182.
2. Balbin, M., Freije, J.M., Fueyo, A., Sanchez, L. and Lopez-Otin, C., (1990) Biochem.J. **271**, 803-807.
3. Drayna, D., Fielding, C., McClean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L., Wion, K. and Lawn, R. (1986) J. Biol. Chem. **261**, 16535-16539.
4. Peitsh, M.C. and Boguski, M.S. (1990) New Biologist. **2**, 197-206.
5. Pearlman, W.H., Gueriguian, J.L. and Sawyer, M.E., (1973) J.Biol.Chem. **248**, 5736-5741.
6. Dilley, W., Haagensen, D., Cox, C., and Wells Jr., S.A. (1990) Breast Cancer Res. Treat **16**, pp253-260.
7. Cabral, J.H., Atkins, G., Sanchez, L.M., Lopez-Boado, Y.S., Lopez-Otin, C. and Sawyer, L. (1995) FEBS Letts. **366**, 53-56.
8. Smith, K., Lawn, R. and Wilcox, J. (1990) J. Lipid Research **31**, 995-1004.
9. Provost, P., Weech, P., Tremblay, N., Marcel, Y. and Rassart, E., (1990) J. Lipid Res. **31**, 2057-2065.
10. Provost, P., Villeneuve, L., Weech, P., Milne, R., Marcel, Y. and Rassart, E. (1991) J. Lipid Research **32**, 1959-1970.
11. Séguin, D., Desforges, M. and Rassart, E. (1995) Molec.Brain Res. **30**, 242-250.
12. Patel, S.C., Asotra, K., Patel, Y.C., McConathy, W.J., Patel, R.C. and Suresh, S. (1995) Neuroreport **6**, 653-657.
13. Provost, P.R., Marcel, Y., Milne, R., Weech, P. and Rassart, E., (1991) FEBS Letts **290**, 139-141.
14. Simard, J., Veilleux, R., De Launoit, L.Y., Haagensen, D.E. and Labrie, F. (1991) Cancer Res. **51**, 4336-4341.
15. Simard, J., De Launoit, Y., Haagensen, D.E. and Labrie, F. (1992) Endocrinology **130**, 1115-1121.

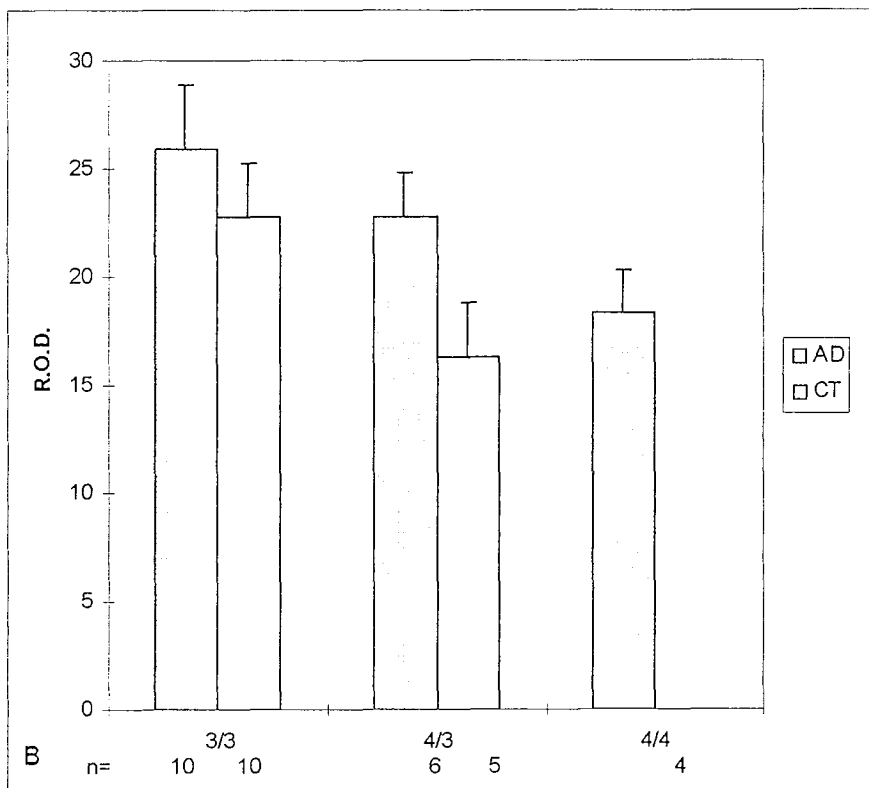
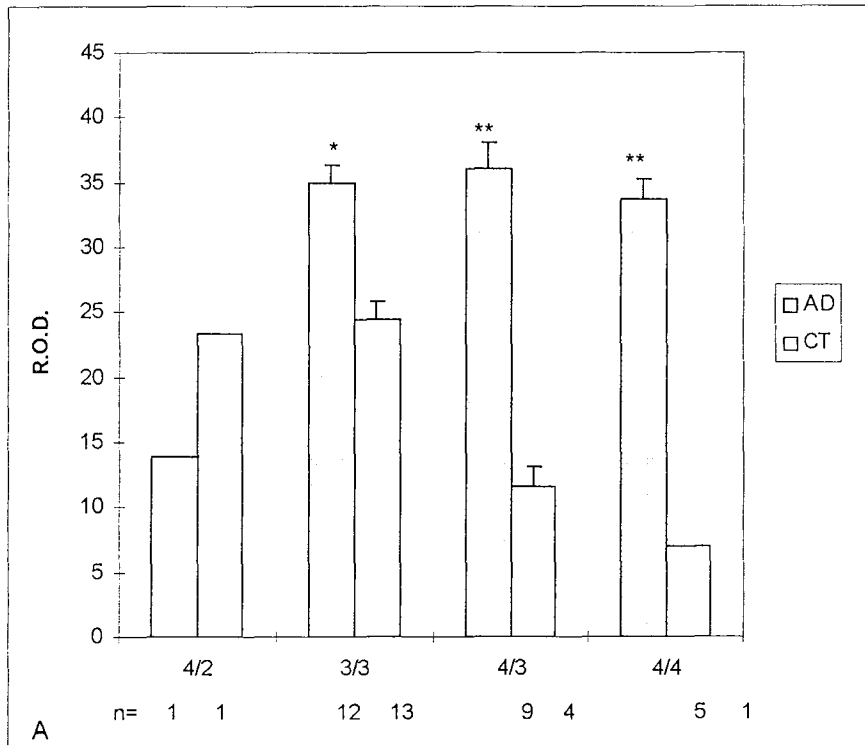
16. Simard, J., Dauvois, S., Haagenzen, D.E., Levesque, C., Merand, Y. and Labrie, F. (1990) *Endocrinology*, **126**, 3223-3231.
17. Lopez-Boado, Y.S., Tolivia, J. and Lopez-Otin, C., *J. Biol.Chem.*, **269** (1994) 26871-26878.
18. Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A. Olek, K., and Muller, H.W. (1990) *EMBO J.*, **9**, 2479-2484.
19. Boyles, J.K., Notterpek, L.M. and Anderson, L.J. (1990) *J.Biol.Chem.* **265**, 17805-17815.
20. Boyles, J.K., Zoellner, C.D., Anderson, L., Kosik, L., Pitas, R., Weisgraber, D., Mahley, R., Gebicke-Haerter, P., Ignatius, M. and Shooter, E. (1983) *J. Clin. Invest.* **83**, 1015-1031.
21. Mahley, R.W. (1988) *Science* **40**, 622-630.
22. Popko, B., Goodrum, J., Bouldin, T., Zhang, S., and Maeda, N. (1993) *J. Neurochem.* **60**, 1155-1158.
23. Goodrum, J., Bouldin, T., Zhang, S., Maeda, N., and Popko, B., (1995) *J. Neurochem.* **64**, 408-416.
24. Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., Ge, N., and Mucke, L., (1995) In *Research Advances in Alzheimer's disease and Related Disorders*, John Wiley and Son, 405-414.
25. Namba, Y., Tomonoga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. and Ikeda, K. (1991) *Brain Res.* **541**, 850-852.
26. Wisniewski, T., Golabeck, A., Matsubara, E., Ghiso, J. and Frangione, B. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 359-365.
27. Strittmatter, W., Saunders, A., Schmechel, D., Pericak-Vance, M. Enghild, J. Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**, 1977-1981.
28. Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., and Gauthier, S. (1993) *Lancet* **342**, 697-699.
29. Saunders, A., Strittmatter, W., Schmechel, D., St. George-Hyslop, P. et al. (1993) *Neurology* **43**, 1467-1472.

30. Roses, A., Saunders, A., Corder, E., Pericak-Vance, S. et al. (1995) *Drug Res.* **45**, 413-417.
31. Neville, D.M., (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 6328-6334.
32. Weech, P., Camato, R., Milne, R., and Marcel, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7041-7945.
33. Camato, R., Marcel, Y., Milne, R., Lussier-Cacan, S., and Weech, P. (1989) *J. Lipid Res.* **30**, 865-875.
34. Weisgraber, K.H., Rall, S.C., Jr., Mahley, R.W., Milne, R. W., Marcel, Y.L., and Sparrow, J.T. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2068-2076.
35. Carlsson, J., Armstrong, V., Reiber, H., Felgenhauer, K., and Seidel, D. (1991) *Clin. Chim. Acta* **196**, 167-176.
36. Ikeda, T., Sugiuchi, H., Senba, U., Shibuya, Y. et al, (1993) *J. Clin. Lab. Anal.*, **7**, 1-4.
37. Lehtimäki, T., Pirttilä, T., Mehta, P., Wisniewski, H. et al. (1995) *Hum. Genet.* **95**, 39-42.
38. Blennow, K., Hesse, C., and Freeman, P. (1994) *Neuroreport* **5**, 2534-2536.
39. Pirttilä, T., Mehta, P., Lehtimäki, T., Kim, K., Sersen, E. et al. (1994) *Neuro. Res. Commun.* **15**, 201-207.
40. Amouyel, P., Vidal, O., Launay, J.M. and Laplanche, J.L. (1994) *Lancet* **344**, 1315-1318.
41. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. and Ikeda, K. (1991) *Brain Res.* **541**, 163-166.
42. Diedrich, J.F., Minnigan, H., Carp, R.I. et al (1991) *J. Virol.* **65**, 4759-4768.
43. St-Clair, D., Norman, R., Yates, C., Wilcock, G. and Brookes, A. (1994) *Neurosc. Lett.* **176**, 45-46.

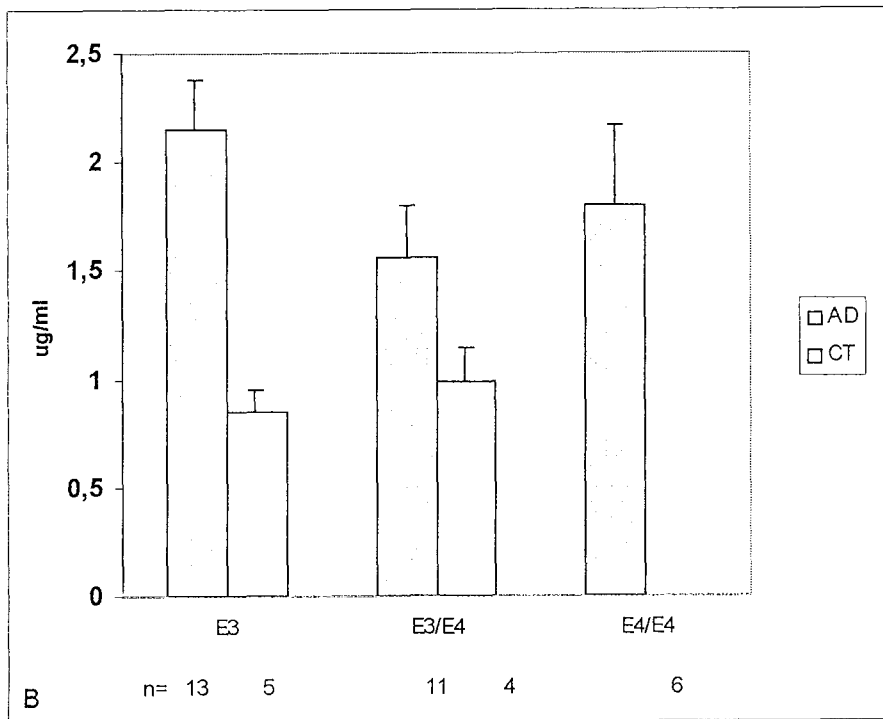
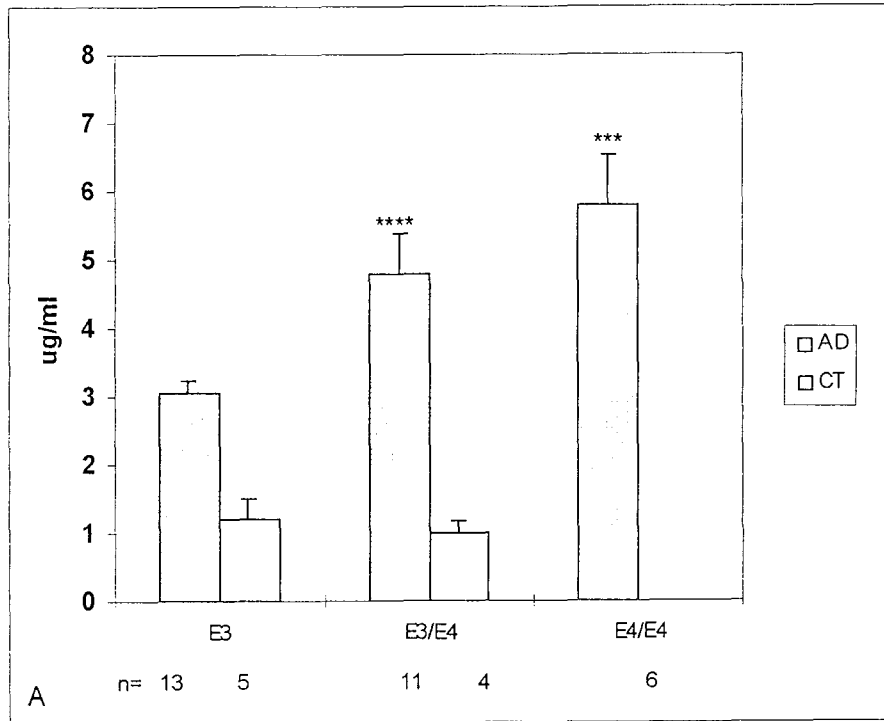
44. Zubenko, G., Stiffler, S., Stabler, S., Kopp, U. and al. (1994) *Amer. J Med. Gen.* **54**, 199-205.
45. Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C. and Pasinetti, G. (1995) *Molec. Brain Res.* **33**, 174-178.
46. Aronow, B., Lund, S., Brown, T., Harmony, J. and Witte, D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 725-729.
47. Jenne, D. and Tschopp, J. (1992) *Trends Biochem.Sci.* **17**, 154-159.
48. Jordan-Starck, T., Witte, D., Aronow, B. and Harmony, J (1992) *Curr. Opin. Lipid.* **3**, 75-85.
49. May, P., Lampert-Etchells, M., Johnson, S., Poirier, J. et al. (1990) *Neuron* **5**, 831-839.
- 50.- May, P., Johnson, S., Poirier, J., Lampert-Etchells, M. et al. (1989) *J. Neurol. Sci.* **16**, 473-476.
51. Matsubara, E., Frangione, B., and Ghiso, J., (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 7563-7567.
52. Weisgraber, K.H., Pitas, R.E., and Mahley, R.W. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 507-515.
53. Steyer, E., and Kostner, G.M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **958**, 484-491.
54. Mathur, C., Prasad, V., Raju, V., Welch, M., and Lieberman, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 85-88.
55. Poirier, J. (1994) *Trends in Neurosciences* **17**, 525-530.
56. Merched, A., Blain, H., Visvikis, S., Herbeth, B., Jeandel, C. et Siest, G. (1996) *J.Neurol.Sc.*, **5146**, pp.33-39.

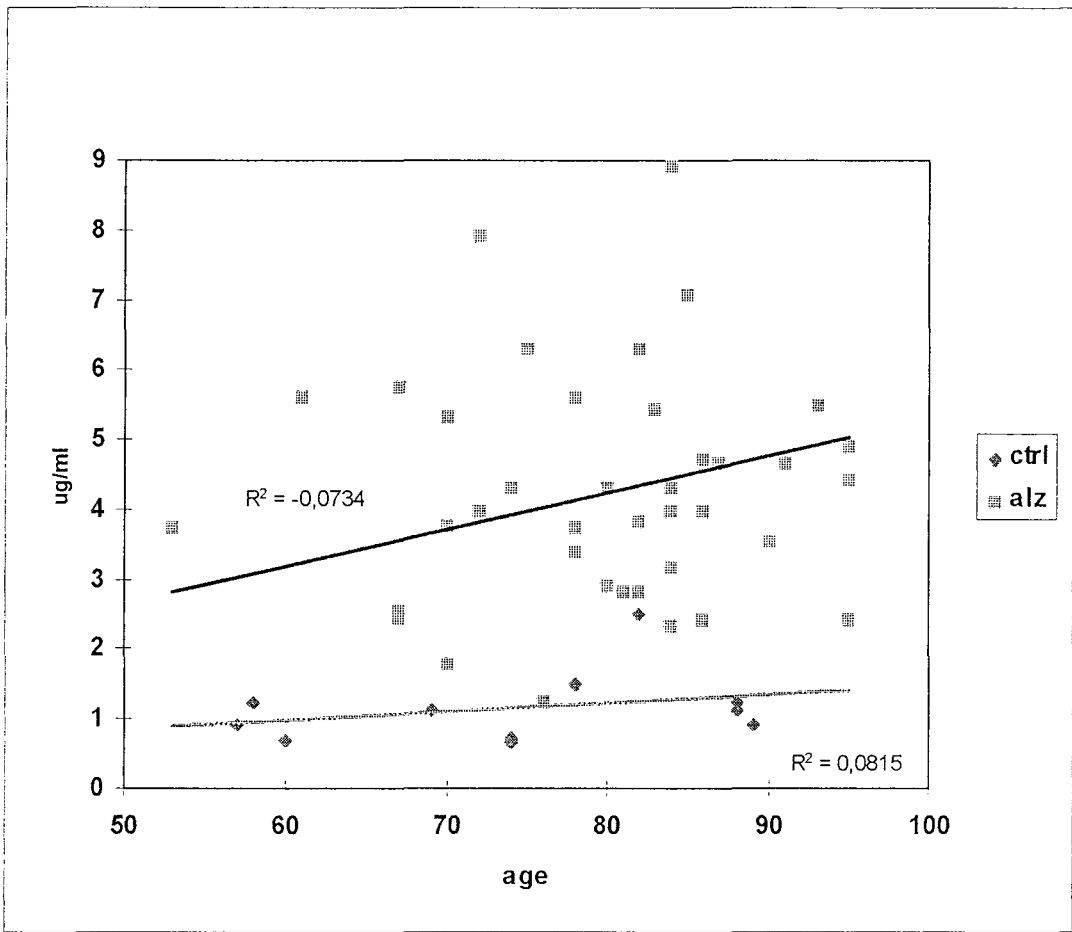
57. Nalbantoglu,j, Gilfix,B.M., Bertrand,P. and al., (1994) Ann.Neurol., **36**, pp.889-895.











## Figure legends

**Figure 1:** Immunodetection of apoD and apoE in hippocampal extracts and CSF of AD patients, patients with other neuropathologies (OP) and normal subjects (CT). Samples were subjected to SDS-PAGE, electrophoretically transferred to nylon membranes and apoD and apoE were sequentially detected with anti-apoD and anti-apoE monoclonal antibodies. The apoE genotype of the subjects is indicated. **A:** Immunoreactive apoD and apoE in hippocampal extracts. For detection of apoD, the membrane was exposed for 30 seconds to peroxidase substrate whereas, for apoE detection, there was a 10 minute exposure. Each control patient is age-matched with the preceding AD patient.

**B:** Immunoreactive apoD and apoE in CSF of patients and controls.

**Figure 2:** ApoD and apoE levels in CSF and hippocampal extracts from AD patients, from patients with other neuropathologies (OP) and from normal subjects (CT). **A:** ApoD and apoE were detected in hippocampal extracts after SDS PAGE as described in the legend to figure 1. The concentrations of the apolipoproteins were estimated by densitometric scanning of the autoradiographs. The values are expressed in relative optical density (R.O.D.) units  $\pm$  SEM and were normalized to immunoreactive tubulin whose concentration is not changed in AD. **B:** ApoD and apoE concentrations were measured in the CSF by radioimmunoassays using purified apoD and apo E, respectively, for calibration. The bars represent mean concentration  $\pm$  SEM. (\*:p=0.05, \*\*:p=0.01, \*\*\*:p=0.005 and \*\*\*\*:p=0.001)

**Figure 3:** The concentrations of apoD (A) and apoE (B) in hippocampal extracts as a function of the apoE genotype of AD patients (dark bars) and normal subjects (light bars). Data are taken from Figure 2 (\*:p=0.05, \*\*:p=0.01, \*\*\*:p=0.005 and \*\*\*\*:p=0.001).

**Figure 4:** The concentrations of apoD (A) and apoE (B) in CSF as a function of the apoE genotype of AD patients (dark bars) and normal subjects (light bars). Data are taken from Figure 2 (\*:p=0.05, \*\*:p=0.01, \*\*\*:p=0.005 and \*\*\*\*:p=0.001).

**Figure 5:** ApoD concentrations in the CSF of AD patients and normal subjects as a function of age. Each point represents the apoD concentration as a function of patient age.

Publication N°5

*FEBS Letters* (sous presse)

**Apolipoprotein E, Transthyretin and Actin in the  
CSF of Alzheimer's Patients: Relation with the  
Senile Plaques and Cytoskeleton Biochemistry**

Merched A., Serot J.-M., Visvikis S., Aguillon D., Faure G. and Siest G.

Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients:  
relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry

Aksam Merched<sup>a</sup>, Jean-Marie Serot<sup>b</sup>, Sophie Visvikis<sup>a</sup>, Dominique Aguilon<sup>a</sup>, Gilbert Faure<sup>c</sup>,  
Gérard Siest<sup>a,\*</sup>

**Abstract** We measured the levels of two  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ )-sequestering proteins, apolipoprotein (Apo) E and transthyretin (TTR), in ventricular human cerebrospinal fluid (CSF) of AD patients and controls in relation to brain histological findings. We also studied actin levels in CSF as a marker of the biochemical role of these two proteins in the cytoskeleton. We show that TTR levels in CSF were significantly decreased in AD patients compared to controls and negatively correlated with the senile plaques (SP) abundance. Moreover, actin levels were positively linked to TTR levels and increased in CSF samples of patients homozygous for the ApoE  $\epsilon$ 4-allele. We propose that TTR and ApoE4 may have competition in the aggregation of  $A\beta$  and its deposition in the SP of AD brain. The relationships between ApoE, TTR and actin could suggest a metabolic implication of ApoE genetics and TTR levels in cytoskeletal biochemistry which may be relevant to the pathogenesis of AD.

*Key words:* Transthyretin; Apolipoprotein E; Actin; Cerebrospinal fluid, Senile plaques, Alzheimer's disease.

*Abbreviations:* 2D-PAGE, two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis;  $A\beta$ ,  $\beta$  amyloid peptide; AD, Alzheimer's disease; Apo, apolipoprotein; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; SP, senile plaques, TTR, transthyretin.

## 1. Introduction

Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) is the major component of senile plaques found in Alzheimer's disease brain.  $A\beta$  also exists in a soluble form in physiological fluids such as cerebrospinal fluid and plasma as well as in the conditioned media of different cultured cell lines [1-3]. The mechanism by which  $A\beta$  forms amyloid fibrils is unknown. But emerging evidence suggests that amyloid fibril formation is a critical step in the pathogenesis of AD. CSF contains several factors that promote the solubility, transport and clearance of  $A\beta$ , mainly two important proteins ApoE and TTR.

ApoE has three common isoforms E2, E3 and E4 coded by alleles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$ .  $\epsilon 4$ -allele is over-represented in late-onset and sporadic AD; and its importance as a risk factor for its development is now well-established [4-6]. TTR is a homotetrameric protein each subunit of which has a molecular weight of 15 kDa. Within the CNS, transthyretin is the only known CSF protein synthesized solely by the choroid plexus [7]. In CSF, TTR is the principal thyroxine-binding protein [8] which suggests its' possible implication in the active transport of thyroid hormone from the blood stream into CSF [7]. Several pieces of evidence point to an active role of ApoE and TTR in fibril formation in the brain. ApoE binds to  $\beta$ -peptide with high affinity in vitro [9], promotes  $A\beta$  fibrillogenesis in vitro and induces accumulation of the  $\beta$ -amyloid peptide in cultured vascular smooth muscle [10,11,12], while TTR inhibits and prevents this fibril formation [12,13]. TTR in lumbar CSF was shown to be correlated negatively with the degree of dementia in patients with dementia of Alzheimer type [14]. Recently, we have shown that ApoE levels increased in lumbar CSF in cases with normal aging and more extensively with AD [15,16] which is now confirmed by others [17,18]. We also reported that TTR levels increased with aging but decreased with AD [19].

The aim of this work was to investigate how two  $A\beta$ -amyloid sequestering proteins ApoE and TTR may contribute to the balance of amyloid formation in Alzheimer's disease (AD). We took into account senile plaque (SP) abundance in the brain of the same patients. We also verified the potential action of these proteins in the cytoskeletal biochemistry by estimating for the first time, actin levels in the CSF, the major component of the microfilament.

We studied these relationships because the intracellular organization of actin filament seemed to be regulated by thyroxine, mainly transported by TTR in the CSF [20]. We hypothesized that ApoE also may be involved in actin regulation via its avidity for this protein [21]. We

investigated the ApoE polymorphism effects on these protein levels in relation to brain histological findings.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and samples

This study was performed with 30 patients. Twenty patients were confirmed by neuropathology examination at autopsy to have AD without other complicating neurological or neuropathological features ( $84.40 \pm 1.79$  years, 5 males and 15 females). Ten sex and age-matched controls ( $83.10 \pm 3.49$  years, 3 males and 7 females) were free of AD or with other known neurological diseases (five with cerebrovascular disease without dementia, 3 multi-infarct dementia, two with degenerative disc disease). The NINCDS-ADRDA work group histological criteria for the diagnosis of "definite Alzheimer's disease" were used. Autopsies were performed within 24 hours in the nursing home of the Hotel Dieu Hospital in Mont Saint-Martin (France). Informed consent for brain autopsy had been obtained from the families of all patients. The CSF samples were obtained following opening of the cranial cavity and withdrawal of the CSF syringe. Brain sections including middle temporal gyrus, middle frontal gyrus, and inferior parietal lobule as well as hippocampus CA1 sections were obtained from all patients. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored until analyzed.

### 2.2. Histological analyses

Semiquantitative grading of senile plaques and neurofibrillary tangles in the tissue section were performed by immunofluorescence using monoclonal antibodies : antihuman  $\beta$ 4 amyloid (DAKO, Glostrup, Denmark) and antihuman Tau1 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) with FITC antimouse Ig (Institut Pasteur Productions, Marnes, France) as a second-step reagent previously described [22].

For AD patients, immunofluorescence revealed many SP with homogeneous frequency in the three neocortical regions. Control patients presented a few SP and threads. SP were classified as follows: (+), some; (++) , moderate; and (+++), abundant.

### 2.3. Protein measurements

The measurement of CSF total protein was made using a dye-binding colorimetric method based on pyrogallol red-molybdate complex (Biotrol, Paris, France) with a Cobas Mira analyzer (Roche Diagnostics, Neuilly-sur-Seine, France). ApoE measurements in CSF were performed by a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) as described elsewhere [16]. TTR was measured automatically using an Array™ protein system (Beckman, Brea, CA, USA) as described by the manufacturer with anti-TTR antibody (Beckman Instruments, Galway, Ireland). The coefficients of analytical variation are 4.9% and 3.7% for inter-assay and intra-assay, respectively. Actin levels were estimated by quantitative study of samples separated using the high-resolution, two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) performed with the ISO-DALT system [23]. The staining of the 2-D gels was performed with a neutral method using silver nitrate [24] with sensitivity in the nanogram range. Alternatively, proteins separated by 2D-PAGE were transferred to sheets of nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Inc., Dassel, Germany). Primary antibodies to human TTR and actin were obtained from Sigma Biochemicals. Alkaline phosphatase conjugated anti-goat and anti-mouse was used as a secondary antibody. The 2-D gels (18x16x0.15 cm) were digitized using an Agfa 800® laser scanner with 1024 gray levels, an optical density range 0 to 3.2 and a spatial resolution of 250 µm. The image data were analyzed on a SUN workstation by the HERMeS program [25]. Calibration and normalization for staining and detection variation was done using the TTR content of samples measured by nephelometry. To avoid variations which may be due mainly to the silver staining of actin between samples, we studied actin and TTR values from the same gel. In this way, the standardization was essentially internal for each gel. Minor variations in load volumes, for instance, would not alter the results. Values for CSF samples in this study were represented by averages of two or more replicates.

### 2.4. ApoE polymorphism study

First, PCR amplified sequences spanning the ApoE polymorphic sites was performed. Then, ApoE genotyping was performed on DNA isolated from nucleated blood cells [26] and digested with *HhaI* as described elsewhere [27]. When blood was not available, polymorphism was studied by phenotyping ApoE in CSF samples using two-dimensional electrophoresis.



## 2.6. Statistical analysis

All data were analyzed with the BMDP<sup>®</sup> statistical software (Los Angeles, CA). The mean values were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test. We used Spearman rank test to evaluate the relationship between ApoE, TTR and actin levels.  $P \leq 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

The analysis showed no significant difference in the levels of ApoE ( $\pm$ SEM) between AD and control groups ( $1.05 \pm 0.26$  mg/l,  $n=20$  vs.  $1.26 \pm 0.31$  mg/l,  $n=10$  respectively,  $P=0.32$ ) (Fig. 1), but the mean CSF levels of TTR in patients with AD was significantly lower than that observed in controls ( $22.21 \pm 1.41$  mg/l vs.  $34.52 \pm 4.12$  mg/l respectively,  $P=0.0094$ ). Neither apoE nor TTR levels were significantly correlated with those of albumin (not shown).

A semiquantitative estimation of senile plaques showed a negative correlation ( $P=0.035$ ) between the SP abundance and the mean levels of TTR in CSF of the same patients (Fig. 2). The TTR levels were significantly higher in CSF of patients with a few SP compared to those of patients with abundant SP ( $P<0.05$ ). The correlation was lacking between ApoE levels and SP abundance ( $P=0.74$ ). We showed a positive correlation between ApoE  $\epsilon 4$ -allele frequency and the SP abundance ( $P<0.05$ , by Khi2 test). Age did not affect the SP abundance ( $P=0.77$ ). We also investigated the effect of age on ApoE and TTR levels in CSF. Neither ApoE nor TTR changed significantly with age (data not shown).

In the CSF, analysis of TTR and actin using 2D-PAGE (Fig. 3) showed 2 spots for actin with molecular mass (MM) of about 43 kDa and different isoelectric points (pI) of 5.24 and 5.28 and 2 or 3 spots for TTR (MM = 14 kDa and pI 5.04-5.55). The spots of actin and TTR were identified either by immunostaining of the 2-D blot or by comparison with published maps. The correlation between actin spot intensities and those of TTR showed a positive relationship for all patients including AD and controls ( $r=0.54$ ,  $P=0.0088$ ,  $n=20$ , Fig. 4). The correlation remained significant without the control patients ( $r=0.60$ ,  $P=0.019$ ,  $n=14$ ). While that with the control group was not significant ( $r=0.46$ ,  $P=0.25$ ,  $n=7$ ), no difference was found in the actin levels between AD and controls group ( $1.41 \pm 0.22$  mg/l ( $n=15$ ) vs  $1.41 \pm 0.28$  mg/l ( $n=7$ ),  $P=0.94$ ).

When we took into account the ApoE alleles effect relative to actin levels variability (Fig. 5), we found an association with the  $\epsilon$ 4-allele dose ( $P < 0.05$ ). The levels were :  $1.01 \pm 0.09$  mg/l ( $\pm$ SEM) for no  $\epsilon$ 4-allele carriers ( $n=6$ );  $1.09 \pm 0.21$  mg/l for one  $\epsilon$ 4-allele carriers ( $n=7$ ) and  $1.92$  mg/l  $\pm 0.32$  for two  $\epsilon$ 4-allele carriers ( $n=9$ ). Actin levels were not statistically correlated with those of albumin ( $r=0.30$ ,  $P=0.20$ ,  $n=19$ ) nor linked to the senile plaque abundance.

#### 4. Discussion

This is the first report investigating transthyretin and actin concentrations in ventricular human cerebrospinal fluid of patients clinically and pathologically confirmed to have had Alzheimer's disease. A few biochemical studies of Alzheimer's patients have involved the analysis of CSF for transthyretin. Previous study showed a negative association of TTR with degree of dementia in lumbar CSF of patients with Alzheimer's disease [14]. Now, we report a negative correlation between TTR and one major hallmark in the AD brain, the senile plaques. We also show that TTR levels in AD CSF were significantly lower compared to those of patients suffering from other neurological diseases and we confirmed our recent findings in lumbar CSF [19]. We note that ventricular TTR values in the present study are higher than the lumbar ones [14,19] and this is due to the fact that in the ventricles, TTR in contrast to most CSF proteins decrease from the ventricles to the lumbar space [7].

Meanwhile, we showed that the CSF levels mean of ApoE in AD patients did not differ significantly from that in the neurological patients. The results of studies regarding lumbar CSF ApoE in AD are apparently controversial [see 15]. However, the levels of ApoE seem to be dependent on the clinical state, genetics and others factors ; but it is likely to be linked to the death and damage caused by disease or injury. Here, no specific association of CSF ApoE levels with the pathology of Alzheimer could be determined, probably because the control group seemed to have had high levels of ApoE [15]. Singly, variation of ApoE levels in CSF had no evident implication in AD.

The precise mechanism by which TTR may be involved in AD is unknown. Our findings provide strong support for a role of TTR in Alzheimer's pathogenesis by sequestering A $\beta$  and preventing fibril formation suggested by several in vitro assays [10,11,27]. The

decreased CSF mean levels of TTR observed in patients with AD may reflect a decreased synthesis of this protein by choroid plexus in the brain. This is probably linked to the alterations in the structure of the latter which we have recently found with aging and more extensively with Alzheimer's pathology [28]. However, we can not exclude an accelerated uptake of TTR from CSF via a specific receptor [29].

Another side of TTR implication poorly investigated in AD may be at the levels of the hormonal regulation and delivery. In CSF where TTR is the principal thyroxine-binding protein, the TTR-thyroxine complex seems to have a distributive function, assuring availability of thyroxine to cells through the CSF circulation [30]. For better estimating this role, we studied the actin levels as potential target of the hormonal distributive action of TTR in the brain cytoskeleton. Thyroxine was shown to regulate the actin polymerization in the microfilament structure in astrocytes [20], e.g. the equilibrium between G-actin (soluble) and F-actin (insoluble) and consequently, the soluble form levels of actin in the extracellular fluid. The positive correlation that we reported here between actin and TTR levels in the CSF and the decrease of TTR levels with AD may have such biological relevance. Further investigations are needed to confirm such as hypothesis.

The high levels of actin in CSF obtained with the  $\epsilon 4$ -allele carrier patients may be due to the extensive damage in the brain cells of these patients in relation to the  $\epsilon 4$ -allele [31]. Interestingly, ApoE seems to have allele-dependant affinity to some cytoskeleton components such as tau, MAP2 and actin [21], probably controlling the stability of the cytoskeleton and the normal neuronal function. The  $\epsilon 4$ -allele is thought to have a negative contribution to this process. The correlation reported here between actin in CSF and  $\epsilon 4$ -allele may reflect one cytoskeletal abnormality characterized by a destabilisation of the actin filaments, a process that might be enhanced by the ApoE4 isoform. Alternatively, TTR and ApoE4 could have different effects on actin regulation, indirectly by interacting with APP which was shown to be associated with the cytoskeleton [32] and seems to be directly implicated in the actin expression [33].

As a whole, TTR levels in CSF appear to be specifically decreased in AD and negatively correlated with the senile plaques abundance. These results reinforce the designation of TTR as a potential factor implicated in fibrillogenesis prevention and point to the utility of TTR determination in CSF of AD. Actin in the CSF may serve as a marker of the brain

cytoskeletal integrity and with a less extent of particular TTR and/or ApoE functions in the brain.

*Acknowledgments:* We wish to thank the patient's families for their generous cooperation and understanding. We thank W. Ruff for improving the language of this paper and M. Starck and M.P. Recouvreur for their technical assistance. This work was partially supported by 'Alzheimer 54' Institution and the *Region de la Lorraine*.

## References

- [1] Smith, C. and Anderton, B.H. (1994) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20, 322-338.
- [2] Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B., Lieberburg, I., Koo, E.H., Shenk, D., Teplow, D.B. and Selkoe, D.J. (1992) *Nature* 359, 322-325.
- [3] Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Shinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I. and Schenk, D. (1992) *Nature* 359, 325-327.
- [4] Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pecicak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. and Roses, A.D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 9, 1977-1981.
- [5] Kuusisto, J., Koivisto, K., Mykkänen, L., Helkala, E. L., Vanhanen, M., Hänninen, T., Pyörälä, K., Kesäniemi, Y.A., Riekkinen, P. and Vanhanen, M. (1994) *Br. Med. J.* 309, 636-638.
- [6] Siest, G., Pillot, T., Régis-Bailly, A., Leninger-Muller, B., Steinmetz, J., Galteau, M.-M. and Visvikis, S. (1995) *Clin. Chem.* 41(8), 1068-1086.
- [7] Herbert, J., Wilcox, J.N., Pham, K.-T.C., Fremeau, R.T.Jr., Zeviani, M., Dwork, A., Soprano, D.R., Makover, A., Goodman, D.S., Zimmerman, E.A., Roberts, J.L. and Schon, E.A. (1986) *Neurology* 36, 900-911.
- [8] Hagen, G.A. and Elliott, W.J. (1973) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37, 415-422.
- [9] Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.-M., Salvesen, G.S., Pecicak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D. and Roses, A.D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 8098- 8102.
- [10] Ma J., Yee, A., Brewer H.B., Das, S. and Potter, H. (1994) *Nature* 372, 92-94.

- [11] Wisniewski, T., Castano, E.M., Golabek, A., Vogel, T. and Frangione, B. (1994) *Am. J. Pathol.* 145, 1030-1035.
- [12] Mazur-Koleka, B., Frackowiak, J. and Wisniewski, H.M. (1995) *Brain Res.* 698, 217-222.
- [13] Schwarzman, A.L., Gregori, L., Vitek, M.P., Lyubski, S., Strittmatter, W.J., Enghilde, J.J., Bhasin, R., Silverman, J., Weisgraber, K.H., Coyle, P.K., Zagorski, M.G., Talafous, J., Eisenberg, M., Sauders, A.M., Roses, A.D. and Goladgaber, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 8368-8372.
- [14] Riisoe, H. (1988) *Acta. Neurol. Scand.* 78, 455-459.
- [15] Merched, A., Blain, H., Visvikis, S., Herbeth, B., Jeandel, C. and Siest, G. (1997) *J. Neurol. Sc.* 145, 33-39.
- [16] Blain, H., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G. and Jeandel C. (1997) *J. Am. Ger. Soc.* 45(12), 1536.
- [17] Lindh, M., Blomberg, M., Jensen, M., Basun, H., Lannfelt, L., Engvall, B., Scharnagel, H., Marz, W., Wahlund, L.O., Cowburn, R.F. (1997) *Neurosci. Lett.* 229(2), 85-88.
- [18] Song, H., Saito, K., Seishima, M., Noma, A., Urakami, K. and Nakashima, K. (1997) *Neurosci. Lett.* 231(3), 175-178.
- [19] Serot, J.M, Chrismann, D., Dubost T. and Couturier M. (1997) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 63, 506-508.
- [20] Siegrist-Kraiser, C.A., Juge-Aubray, C., Tranter, M.P., Ekenbarger, D.M. and Leonard, J.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 5296-5302.
- [21] Fleming, L.H., Weisgraber, K.H., Strittmatter, W.J., Troncosco, J.C. and Johson, G. N.W. (1996) *Exp Neurol.* 138, 252-260.
- [22] Serot, J.M., Béné, M.C. and Faure, G.C. (1994) *Hum. Pathol.* 25, 1185-1190.
- [23] Visvikis, S., Steinmeitz, J., Cuvelier, I., Galteau, M.M. and Siest G. (1986) In *Recent Progresses in Two -Dimentional Electrophoresis* (Galteau M.M., and Siest G., eds), pp. 159-165. Presses Universitaires, Nancy, France.
- [24] Rabillou, T. (1992) *Electrophoresis* 13, 429-439.
- [25] Tarroux, P. and Vincens, P. (1987) *Electrophoresis* 8, 173-199.
- [26] Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, S. (1988) *Nucl. Acids. Res.* 16, 12-15.
- [27] Hixson, J.E. and Vernier, D.T. (1990) *J. Lipid. Res.* 31, 545-548.
- [28] Serot, J.M, Béné, M.C., Foliguet, B. and Faure, G.C. (1997) *Am NY Acad Sci* 826, 507-509.

- [29] Divino, C.M. and Schussler, G.C. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(3), 1425-1429.
- [30] Mendel, C.M., Weisiger, R.A., Jones, A.L. and Cavalieri, R.R. (1987) *Endocrinology* 120, 1742-1749.
- [31] Corder, E.H., Sauders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. and Pericak-Vance, M.A. (1993) *Science* 261, 921-923.
- [32] Refolo, L., Wittenberg, I.S., Freidrich, V.L. and Robakis, N.K. (1991) *J. Neurosci.* 11(12), 3888-3897.
- [33] Ramakrishna, N., Smedman, M., Ramakrishna, V. and Gillam, B. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 231, 615-618.

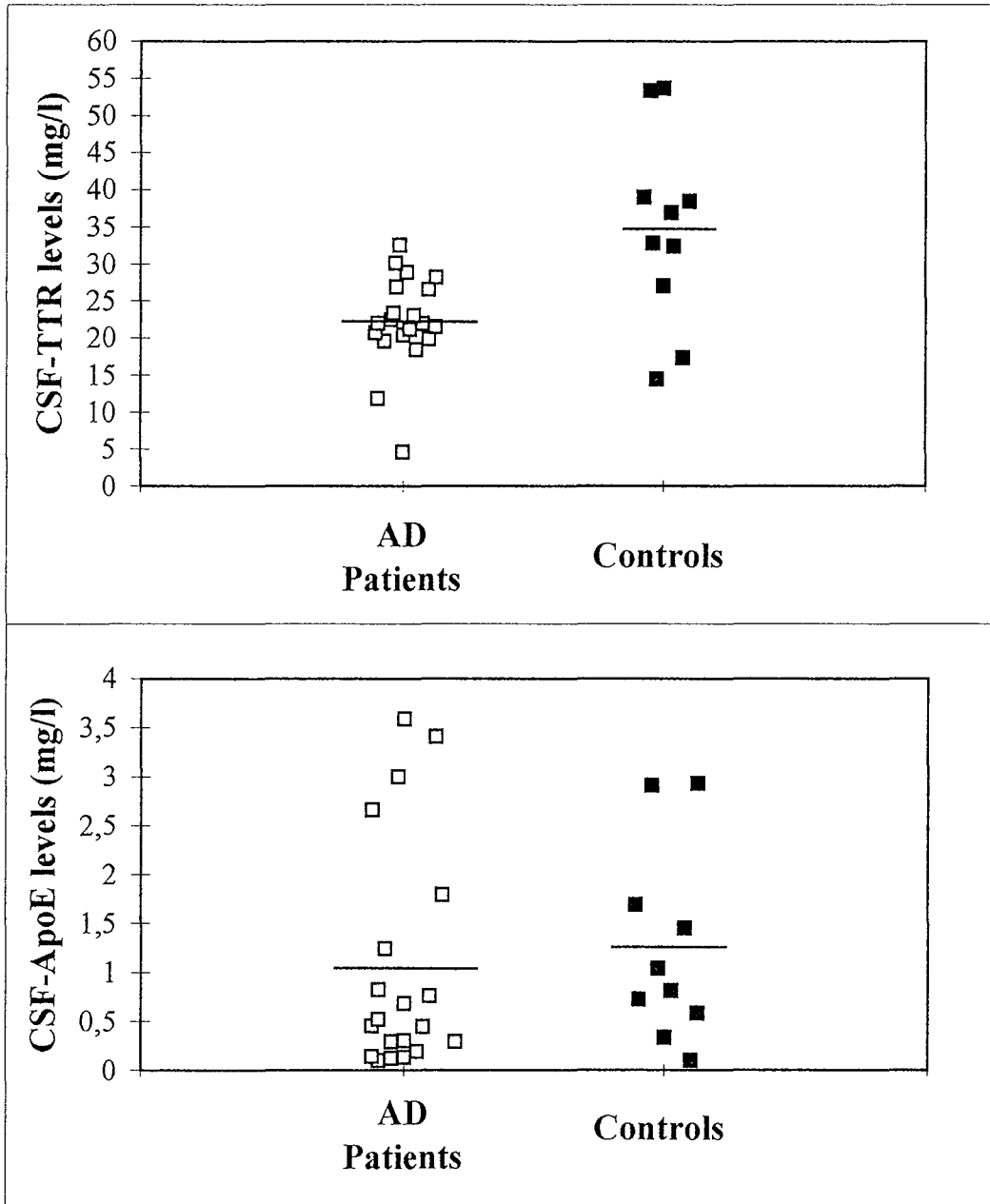
Fig. 1. Comparison of ApoE and TTR levels in CSF of AD patients and control patients. Each value is the mean of triple assays. Bars represent the mean values.

Fig. 2. ApoE and TTR concentrations in CSF of AD patients as function of the SP abundance in the brain of the same patients. SP ranged as follows: (+), some (n=7 patients); (++) , moderate (n=7); (+++) , abundant (n=7). The frequency of  $\epsilon$ 4 in each group is shown. \* $P$ <0.05. Bars are SEM.

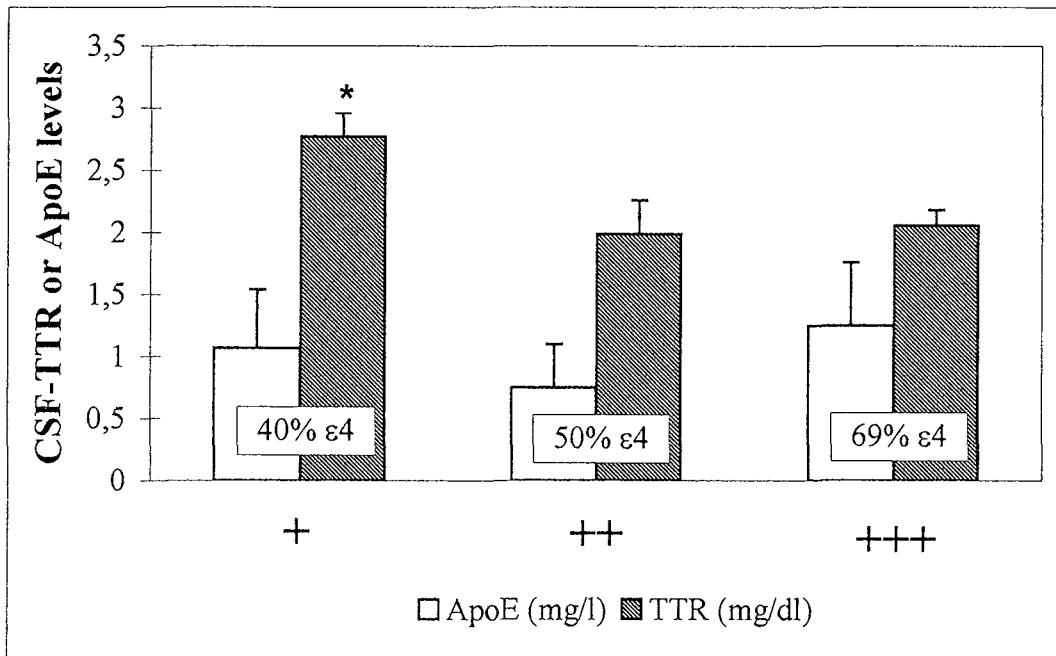
Fig. 3. High resolution 2D-PAGE of silver-stained human CSF proteins. Actin (pI : 5.24 and 5.28 ; MW : 43 kd) and TTR spots (pI : 5.55 and 5.3 ; MW : 14 kd) are indicated by the arrows.

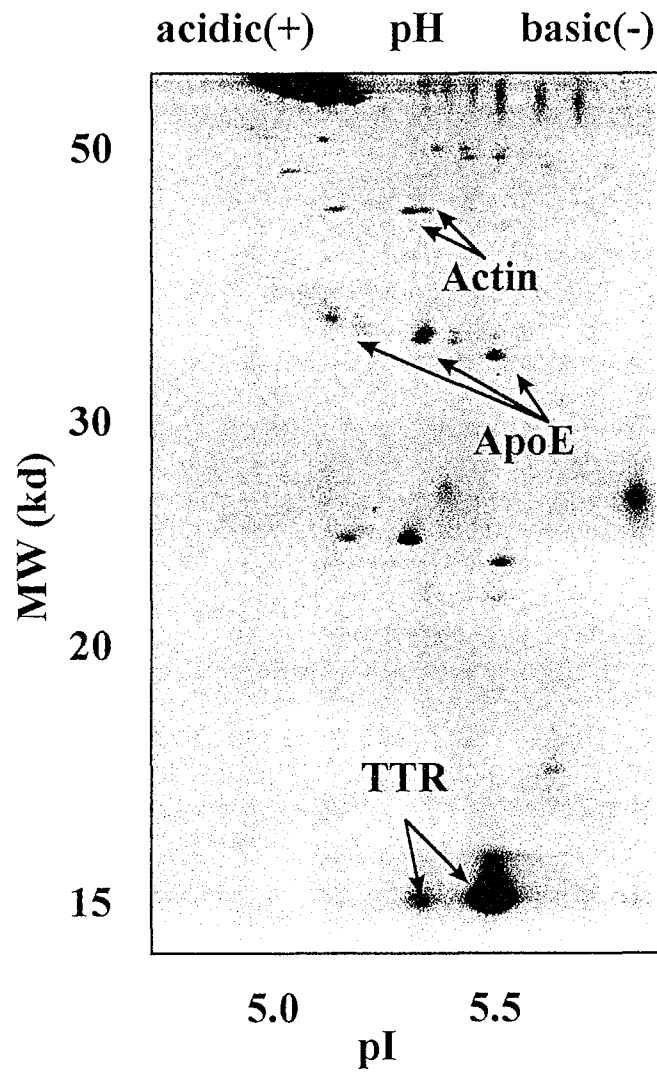
Fig. 4. Relationship between actin and TTR levels in CSF of patients with AD (14) and with other neurological diseases (7). The levels are reflected by the total intensities of actin and TTR proteins separated by 2D-PAGE, digitized using an Agfa 500<sup>®</sup> laser scanner and analyzed by HERMeS image analysis software. Spearman correlation coefficient with all patients was  $r = 0.54$ ,  $P=0.0088$ . The closed circles and the open squares correspond to AD and the neurological diseases groups, with  $r=0.60$  ( $P= 0.019$ ,  $n=14$ ) and  $r= 0.46$  ( $n=7$ ,  $P=0.25$ ), respectively.

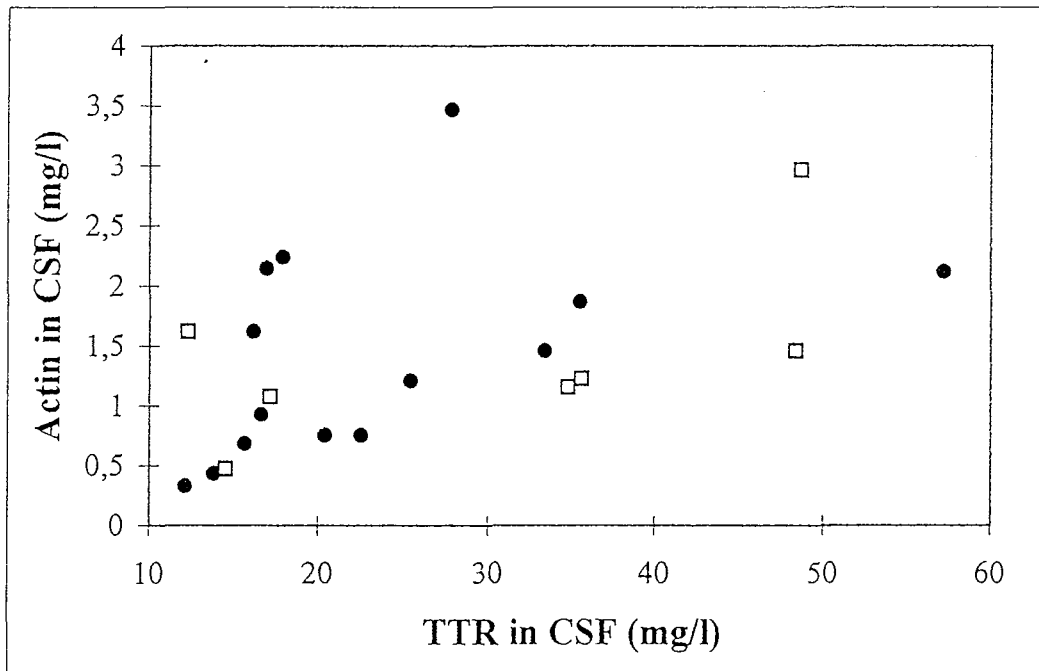
Fig. 5. Analysis of actin levels in CSF of all patients (14 with AD and 7 with other neurological diseases) according to  $\epsilon$ 4-allele dose of ApoE. Statistical differences between allelic groups were calculated using Kruskal-Wallis test, \*  $P$ <0.05. Bars are SEM.

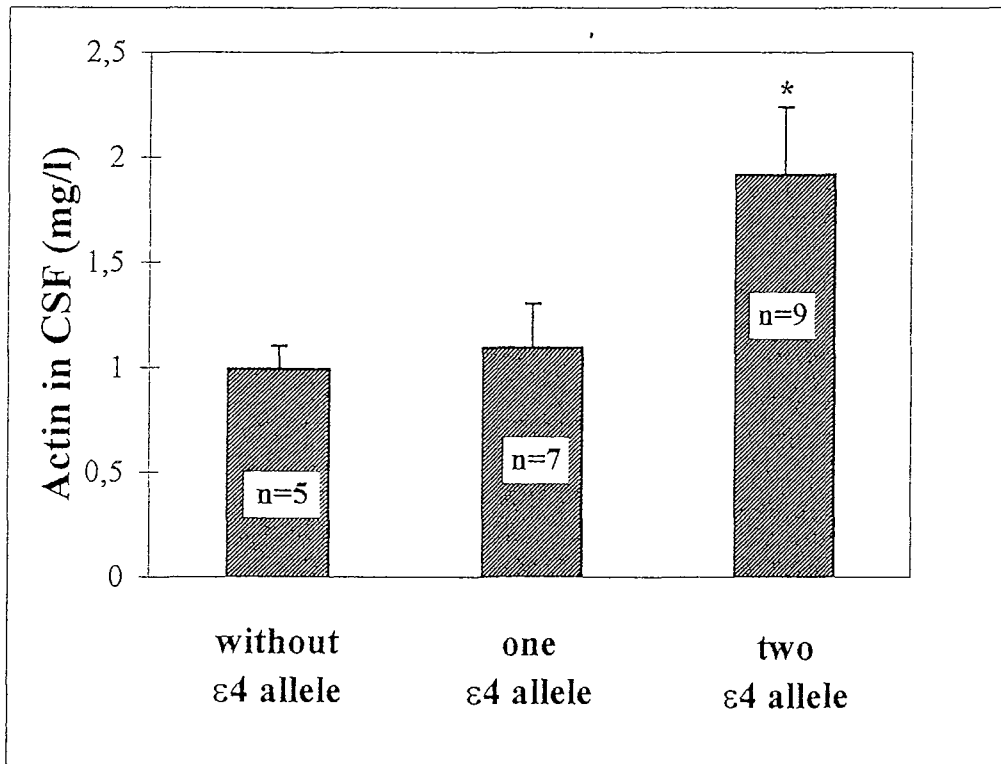












Publication N°6

en préparation

**Serum apolipoprotein AI concentration is highly  
correlated with the severity of Alzheimer's disease**

Merched A., Xia Y., Visvikis S., Serot J.-M. and Siest G.

# **Serum apolipoprotein AI concentration is highly correlated with the severity of Alzheimer's disease**

*Aksam MERCHED, Yongjing XIA, Sophie VISVIKIS, Jean-Marie SEROT and Gérard SIEST*

## **Summary**

We studied the serum apolipoprotein AI (apoAI) concentration in 87 Alzheimer patients and 59 healthy, elderly controls. The apoAI levels were significantly decreased with Alzheimer's disease ( $p < 10^{-8}$ ) as reported by others studies. The sensitivity of 1.50g/l for apoAI was 72% and the specificity was 68%. Interestingly, we found that these levels were highly correlated with mini-mental score (MMS) ( $p < 0.0001$ ). This relationship remained significant after correction for multiple testing. At the same time, we detected apoAI immunoreactivity in senile plaques of Alzheimer's brain. These findings raise the question of the potential implication of apoAI in the etiopathology of Alzheimer's disease and bring into prominence serum apoAI concentration as a biochemical marker with great diagnostic values.

**Key Words:** Apolipoprotein A-I; Alzheimer's' disease; Senile plaques; Biochemical marker; Mini-mental score.

## **Introduction**

Apolipoprotein AI (apoAI) is one of the A $\beta$ -binding proteins, which includes apoE, ApoJ, transthyretin and  $\alpha$ -antichymotrypsin. A $\beta$  is supposed to be under equilibrium between all these factors that are thought to maintain the solubility of this peptide or to promote its' deposit within the brain in some pathological conditions. In blood circulation, apoAI is the major component of the HDL, where it may have several antiatherogenic functions including reverse cholesterol transport, protection against thrombosis and antioxidative (see Rosenson 1996). Also in the cerebrospinal fluid, apoAI is localized in HDL-like particles (Pitas et al,

1987 ; Borghini et al, 1995). Recently, Harr et al (1995) reported an expression of apoAI in the brain but showed no significant difference between Alzheimer's and control subjects. Neither the levels were in the CSF (Song and al, 1997). However, in plasma, two studies reported reduced apoAI concentrations in AD and dementia patients (Kuriyama et al, 1994; Kawano et al, 1995) but these study comported limited number of patients. Here, we re-evaluated apoAI as extraneuronal biochemical marker of AD in larger number of patients with insistence (focusing) on the severity of the disease estimated by the mini-mental score (Folstein, 1975). These studies were paralleled by immunohistological localization of apoAI with other apolipoproteins in AD brain hallmarks.

## **Subject and Methods**

The studied population included 120 patients (87 females, 32 males) with probable AD established according to the criteria of the NINCDS-ADRDA work group and 119 supposed healthy elderly (57 females, 57 males) tacking part in systematic health examination at the Center for Preventive Medicine in Nancy-France.

Blood was collected by venipuncture after an overnight fasting. Total serum cholesterol, triglycerides were measured in fresh serum using standard enzymatic methods (Merck, Darmstadt, Germany), automated on AU5000 (Olympus, Tokyo, Japan). Serum apoAI and apoB were determined by immunonephelometry on Behring Nephelometer Analyzer, with Behring reagents (Rueil-Malmaison, France), HDL-cholesterol was determined using reagents from Boheringer Mannheim, Germany) on COBAS MIRA (Roche Diagnostics-System, Neuilly-sur-Seine, France). DNA extraction was performed according to the method of Miller et al, (1988) and apoE genotype was determined as described by Hixson and Vernier (1992).

Senile plaque and neurofibrillary tangle were detected in the tissue section obtained at autopsy from three AD confirmed patients died in a nursing home. Staining and immunohistochemical studies were performed by immunofluorescence using monoclonal antibodies : antihuman  $\beta$ 4 amyloid (DAKO, Glostrup, Denmark), antihuman Tau1 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), three different monoclonal antibodies to ApoA-I (obtained from Fruchart, Lille, France) with FITC anti-mouse Ig (Institut Pasteur

Productions, Marnes, France) as a second-step reagent previously described (Serot et al, 1994).

## Results

Serum apoAI levels were significantly reduced ( $p < 10^{-8}$ ) in AD patients compared to controls (Table 1). The difference remained significant even when we took into account other parameters like age, sex and albumin as covariant. Albumin concentrations were tacking into account as biochemical marker of health. ApoE polymorphism has no effect into the levels of ApoA-I. Serum levels of triglycerides and apolipoprotein B did not differ significantly between AD patients and controls (Table 1). But, as ApoAI levels those of HDL-C were also significantly reduced in AD patients because of the high association between these two parameters.

To study the utility of apoAI as diagnostic marker, we estimated specificity and sensitivity of this biological parameter. With 1.50 g/l of ApoAI as limit value (Table 2), sensitivity and specificity were 72% and 68%, respectively (Table 2).

ApoAI concentrations were highly correlated ( $p < 0.00001$ , Fig 1) with the mini-mental score of patients (Folstein, 1975), independently of all the other parameters studied (age, sex albumin, apoE genetics).

Immunohistochemical studies revealed staining of cortical A $\beta$  senile plaques with each of the three monoclonal antibodies to ApoA-I (Fig. 2 ). We obtained similar staining in three AD patients confirmed at autopsy. The same region were also verified by antibodies to apoE, ApoB, and ApoAII (results not shown). The sections were strongly immunostained for only apoE. Neither apoAII nor ApoB were detectable (not shown).

## Discussion

Two previous studies reported decreased levels of plasma ApoAI (Kuriyama et al, 1994; Kawano et al, 1995). Here we confirmed these results with larger number of patients. However, we shown for the first time that these levels are highly linked to the severity of the



Alzheimer disease reflected by the MMS. In the same time, we verified the presence of an apoAI-immunoreactivity in the senile plaques as reported by others (Harr et al, 1996 ; Wisniewski T et al, 1995). These findings are in favor of an active role of apoAI in pathogenesis of AD.

There are at least two tracks to explain such roles in AD . Firstly, in the amyloigenesis process since apoAI has been shown to bind A $\beta$  in vivo (Golabek et al, 1995) and to form amyloid-like fibrils (Wisniewski et al, 1995). Secondly, in neuron maintenance because apoAI is one of the exchangeable apolipoproteins which are implied actively in the regeneration process of neuron cells while responding to stress or damage conditions (Boyles et al, 1989 ). Alternatively, apoAI was shown to complex some important proteins like apoJ (Koudinov et al, 1994) and consequently may regulate its structure and function in AD, especially in maintaining the solubility of A $\beta$  or transporting it in fluid or cross the blood-brain barrier .

The reason for serum levels of apoAI variation in AD is not clear. It is noteworthy that apoAI half-life was shown to be shorter in animals with inflammation (Tape and Kisilevsky, 1990). Interestingly, studies in the elderly have shown that high levels of serum apoAI were associated with low total mortality and enhanced longevity (Campbell et al, 1993). We suggest that apoAI could have a much more important role in AD than has previously been suspected.

These results reinforce the designation of ApoAI as a potential factor implicated in amyloigenesis and point to the utility of apoAI determination in the sera of clinically diagnosed AD patients to increase the accuracy of diagnosis.

Because the identification of many compounds and drugs that may activate apoAI gene and raise serum apoAI (see Luoma et al 1997), the relationship between the severity of AD and the levels of serum apoAI may have important pharmacological ramifications.

## References

- Campbell, AJ, Busby WJ and Robertson MC. Over 80 years and no evidence of coronary heart disease: characteristics of a survivor group. *J. Amer. Geriatr. Soc.* 1993, 41: 1333-1338.
- Folstein, M.R., Folstein, S.C., and McHugh G. « Mini-mental state »: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.*, 1975, 12: 189-198.
- Golabek A, Marques MA, Lalowski M, Wisniewski T. Amyloid beta binding proteins in vitro and in normal human cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 1995, 191(1-2): 79-82
- Harr, S.D., Uint, L., Hollister, R., Hyman, B.T., and Mendez, A.J, Brain expression of Apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, 66 (1996) 2429-2435.
- Hixson J. E., and Vernier D. T. (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid. Res.* **31**, 545-548.
- Kawano M, Kawakami M, Otsuka M, Yashima H, Yaginuma T, Ueki A. Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 1995, 239: 209-211.
- Koudinov A, Matsubara E, Frangione B, Ghiso J. The soluble form of Alzheimer's amyloid beta protein is complexed to high density lipoprotein 3 and very high density lipoprotein in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 205(2): 1164-1171
- Kuriyama M, Kakahashi K, Yamano T, Hokezu Y, Togo S, Osame M, and Igakura T. Low levels of serum apolipoprotein AI and AII in senile dementia. *Jpn J Psychiatry Neurol* 1994, 48(3): 589-593.
- Luoma PV. Gene activation, apolipoprotein A-I/high density lipoprotein, atherosclerosis prevention and longevity. *Pharmacol Toxicol*, 1997, 81: 57-64.
- Miller S. A., Dykes D. D., and Polesky S. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids. Res.* 1988, 16: 12-15.
- Rosenson DR. Beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Arch Intern Med* 1996, 156: 1278-1284.

- Serot, J. M, Béné, M. C. and Faure, G. C. (1994) Comparative immunohistochemical characteristics of human choroid plexus in vascular and Alzheimer's dementia. *Hum. Pathol.* 25, 1185-1190.
- Song H, Saito K, Seishima M, Noma A, Urakami K, Nakashima K. Cerebrospinal fluid apo E and apo A-I concentrations in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997, 231(3): 175-178.
- Tape C and Kisilevsky R. Apolipoprotein A-I and apolipoprotein SAA half-lives during acute inflammation and amyloidogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1990, 1043(3): 295-300.
- Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B. Conformational mimicry in Alzheimer's disease. Role of apolipoproteins in amyloidogenesis. *Am J Pathol* 1995, 147(2): 238-244

**Table 1-** Summary of data and measurements between patients and controls

	AD patients	Control subjects	<i>P</i>
n (M/F)	87 (26/61)	59 (28/31)	
Age (years)	77.75 ± 9.03	75.37 ± 5.27	NS
ApoAI (g/l)	1.34 ± 0.31	1.65 ± 0.26	3 10 <sup>-9</sup>
ApoB	1.09 ± 0.32	1.08 ± 0.22	NS
Total cholesterol	5.44 ± 1.32	5.95 ± 0.77	0.02
HDL-C	1.05 ± 0.40	1.28 ± 0.35	3 10 <sup>-7</sup>
Triglycerides	1.22 ± 0.59	1.43 ± 0.58	NS

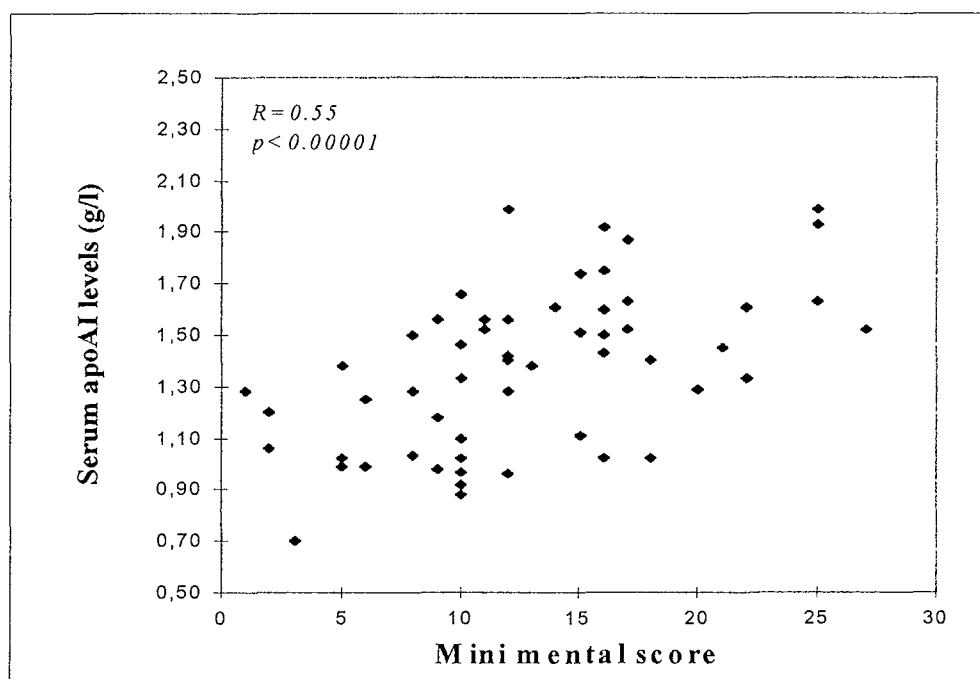
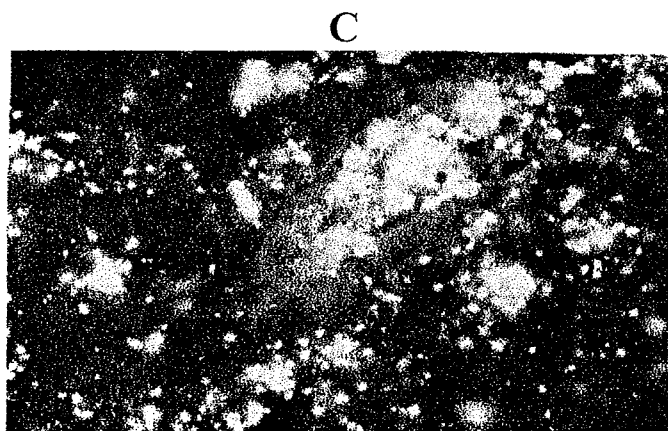
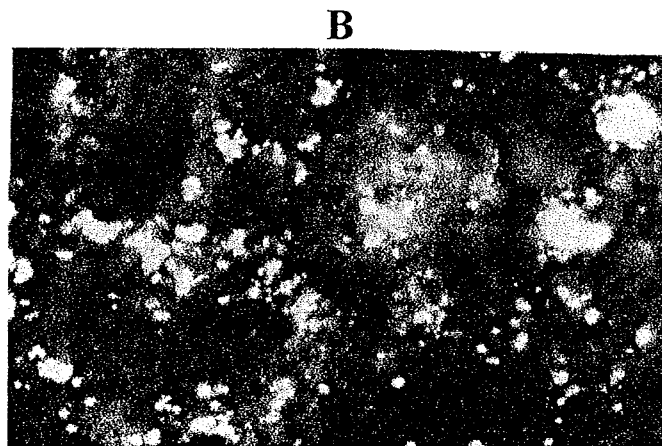


Fig.1 Relationship between serum apoAI levels and the mini mental score (Folstein et al, 1975). The correlation coefficient and the significance level are shown.

**Tableau 2-** Screening results for AD and control subjects for limit apoAI value of 1.50g/l

	AD patients	Controls	Total
Positif diagnostic *	63	19	82
Negative diagnostic	24	40	64
Total	87	59	146

\* for apoAI value < 1.50 g/l



**Fig. 2-** Immunohistological staining of senile plaques with monoclonal antibodies ; an anti-apoE (A) and two different anti-apoAI (B et C). Yellow fluorescence is due to lipofuscin.

Publication N°7

*Presse Médicale* (1996) 25: 763-768

**Maladie d'Alzheimer et hypothèses impliquant les  
apolipoprotéines E**

Blain H., Merched A., Visvikis S., O'kane M., Pillot T., Siest G. and Jeandel C.

# MALADIE D'ALZHEIMER : HYPOTHÈSES IMPLIQUANT LES APOLIPOPROTÉINES E

H. Blain, A. Merched, S. Visvikis, M. O'Kane, T. Pillot, G. Siest, C. Jeandel

## HYPOTHESES ON THE IMPLICATION OF APOLIPOPROTEINS IN ALZHEIMER'S DISEASE

The most promising discovery in the study of Alzheimer's disease (AD) markers is undoubtedly the implication of apolipoprotein E (apoE). The gene of this apolipoprotein is located on chromosome 19 and is characterized by three common alleles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$  giving raise to 6 genotypes and 6 protein phenotypes. ApoE is well known for its role in cholesterol transport. Different studies have been performed, giving major arguments in favor of an important role of apoE in the pathophysiology of AD. These include the discovery of the relationship between the  $\epsilon 4$  allele and AD, the ability of this protein to form complexes with beta amyloid protein (A $\beta$ ) in seniles plates, its presence in neurofibrillary tangles and in vessels of AD patients. Another important finding is the differential interaction between the different isoforms of apoE and tau protein. Some of the hypotheses implicate the role of different apoE isoforms on the growth and extension of neurones, perhaps by a receptor mediated pathway.

It has been suggested that apoE acts as a pathological chaperone protein, or alternatively that it protects neurons by regulation of the cell membrane and modifying calcium homeostasis.

It is clear that apoE genotype determination alone cannot be used for diagnosis of AD. The presence of  $\epsilon 4$  allele is only one of several risk factors for the development of the disease. Other factors may also be implicated and are the subject of ongoing research.

*Presse Med* 1996 ; 25:763-8

### GLOSSAIRE

A $\beta$	peptide $\beta$ amyloïde
AMPc	acide adénosine monophosphorique cyclique
apoE	apolipoprotéine E
APP	amyloid protein precursor
ARNm	acide ribonucléique messenger
DNF	dégénérescence neurofibrillaire
DSTA	démence sénile de type Alzheimer
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
HDL	lipoprotéine de haute densité
IL	interleukine
LCR	liquide céphalo-rachidien
LDL	lipoprotéine de basse densité
Pi	point isoélectrique
TGF $\beta$	facteur de croissance tumoral bêta
VLDL	lipoprotéine de très basse densité

La mise en évidence du lien étroit qui unit le polymorphisme de l'apolipoprotéine E (apoE) et la démence sénile de type Alzheimer (DSTA) constitue sans nul doute le fait marquant des 2 dernières années, en ce qui concerne la recherche fondamentale relative à cette affection.

L'apoE est une protéine polymorphe bien connue pour ses propriétés de transporteur du cholestérol de cellule à cellule et d'organe à organe. Elle pourrait, de plus, jouer un rôle important dans la stabilisation du système neurofibrillaire du cytosquelette neuronal et interférer avec la formation de la substance amyloïde potentiellement toxique pour le neurone. A ce titre, elle pourrait réguler la dégénérescence neuronale. Nous présentons ici les principales hypothèses impliquant les apoE dans la maladie d'Alzheimer.

## LA MALADIE D'ALZHEIMER

On estime, en France métropolitaine, à environ 360 000 le nombre de patients déments dont 270 000 atteints de DSTA, 40 000 de démence vasculaire et 50 000 d'autres types de démences. La DSTA affecte 5 à 10 p. 100 de la population de plus de 65 ans et 150 000 nouveaux cas de démence sont dénombrés par an dans cette tranche d'âge. Environ 70 p. 100 des cas de DSTA sont sporadiques et à début tardif alors que 30 p. 100 sont à début précoce, soit familiaux, soit sporadiques.

La DSTA est une maladie neurodégénérative responsable de l'affaiblissement progressif de l'ensemble des fonctions intellectuelles (mémoire, attention, jugement, capacité de raisonnement) et des perturbations des conduites qui en résultent. Elle se caractérise par trois

Service de Médecine B (HB, CJ), CHU Nancy-Brabois, Vandœuvre. Laboratoire du Centre de Médecine préventive (HB, AM, SV, MOK, TP, GS). URA CNRS 597, Vandœuvre-lès-Nancy.  
Correspondance : C. Jeandel, Service de Médecine B, CHU Nancy-Brabois, F 54511 Vandœuvre Cedex.  
Reçu le 4 juillet 1995 ; accepté le 9 janvier 1996.



types d'anomalies anatomopathologiques prédominant dans l'amygdale, l'hippocampe et la majorité du cortex cérébral :  
 — les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), qui sont des enchevêtrements neurofibrillaires intraneuronaux constitués de filaments en double hélice (« paired helical filaments » ou PHF), dont le principal constituant est la protéine tau sous forme anormalement phosphorylée ;  
 — les plaques séniles neuritiques extracellulaires (diffuses ou fibrillaires) ;  
 — l'angiopathie amyloïde : dépôts vasculaires majoritairement composés du peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ) défini par sa conformation repliée en feuillets  $\beta$ . Ce peptide de 39 à 43 acides aminés est le produit du catabolisme d'un précurseur protéique dénommé APP (amyloid protein precursor).

L'APP, dont le gène est situé sur le chromosome 21, est transcrit en six ARNm (acide ribonucléique messenger) par épissage alternatif. Les APP de 365 et 563 acides aminés ne contiennent pas la séquence de l'A $\beta$  et ne sont donc probablement pas en cause dans la pathogénie de la DSTA. L'APP de 714 acides aminés n'est produit qu'à l'état de trace. L'A $\beta$  est intégralement présente dans les trois autres isoformes de l'APP (composés de 695, 751 et 770 acides aminés). Il se situe dans leur partie transmembranaire à 99 acides aminés de leur extrémité C-terminale.

L'APP est dégradé selon deux procédés :

— il peut être protéolysé par une  $\alpha$ -sécrétase au sein même de la séquence codant pour l'A $\beta$ . Ce processus est considéré comme non amyloïdogénique puisqu'aucun des deux fragments ne contient l'A $\beta$ . Le fragment d'APP soluble est sécrété et la partie transmembranaire est dégradée.

— il peut être protéolysé dans sa portion transmembranaire sous l'effet d'une  $\beta$ -sécrétase et d'une  $\gamma$ -sécrétase. Cette voie métabolique, principalement endolysosomiale, est considérée comme amyloïdogénique puisqu'elle libère l'A $\beta$  intacte.

Toutes les cellules semblent synthétiser l'APP mais le neurone constitue sa principale source de production. Il peut être produit en grande quantité par les astrocytes en cas de lésion neuronale.

## LES APOLIPOPROTÉINES E

L'apoE est synthétisée par de nombreux tissus, principalement le foie (90 p. 100), le cerveau (astrocytes et oligodendrocytes), le système nerveux périphérique (cellules de Schwann) et les macrophages. L'apoE est une protéine de 299 acides aminés, d'un poids moléculaire de 34 200 Da [1]. Sa partie NH<sub>2</sub> terminale (séquence 1 à 191), de structure globulaire hydrosoluble, contient le site de liaison au récepteur cellulaire apo B/E qui correspond au récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDL). Ce site de liaison caractérisé par un enchaînement d'acides aminés basiques (lysine, arginine) se localise entre les acides aminés 130 et 150. Sa partie COOH terminale (séquence 201 à 299), supposée riche en hélices  $\alpha$  amphipathiques par computer modélisation, contient le site de liaison avec les lipides des lipoprotéines. Entre ces deux régions fonctionnelles, se situe une région de structure

non ordonnée sensible au clivage protéasique, contenant le site d'attachement potentiel d'une chaîne glycanique en position 194.

L'apoE est polymorphe. Le locus de l'apoE sur le chromosome 19 (en position 19q12) possède trois allèles majeurs  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4 qui définissent six génotypes : trois homozygotes  $\epsilon$ 2 $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4 $\epsilon$ 4 et trois hétérozygotes  $\epsilon$ 2 $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 2 $\epsilon$ 4,  $\epsilon$ 3 $\epsilon$ 4, correspondant à six phénotypes protéiques  $\epsilon$ 2 $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4 $\epsilon$ 4,  $\epsilon$ 2 $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 2 $\epsilon$ 4,  $\epsilon$ 3 $\epsilon$ 4 [2].

L'isoforme E3, la plus répandue, présente une cystéine en position 112 et une arginine en position 158 ; l'isoforme E4 se différencie de E3 par la substitution de la cystéine en position 112 par une arginine ; l'isoforme E2 se distingue de E3 par la substitution de l'arginine en position 158 par une cystéine. Les trois isoformes diffèrent par leurs points isoélectriques (PI) en isoélectrofocalisation : apoE4 (PI=5.3), apoE3 (PI=5.4) et apoE2 (PI=5.55) (fig. 1). Les isoprotéines humaines intracellulaires diffèrent des isoprotéines sériques par leur sialylation, ajoutant une complexité supplémentaire au polymorphisme de l'apoE.

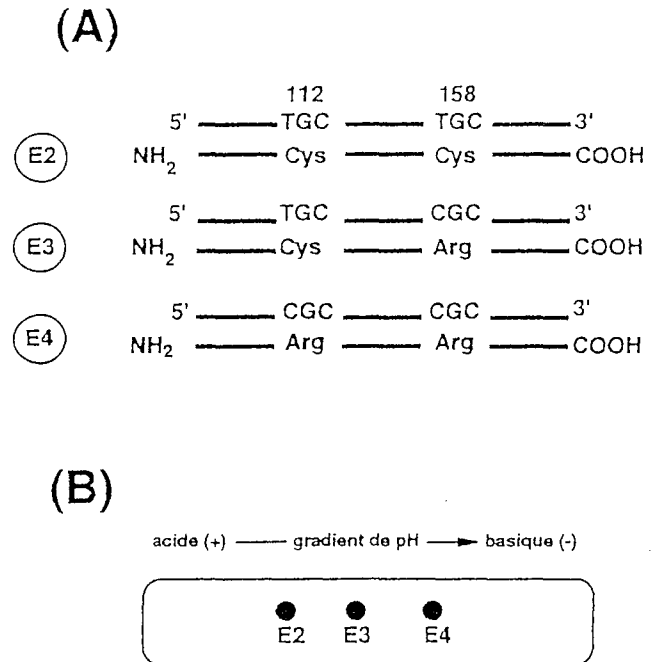


FIG. 1. (A) Le polymorphisme triallélique de l'apoE. La variation moléculaire concerne les acides aminés 112 et 158 de la protéine. Les codons correspondants sont représentés. (B) Le complément théorique des trois isoformes dans un gradient de pH (technique d'isoélectrofocalisation).

FIG. 1. (A) Three-allele polymorphism of apoE. The molecular variability concerns amino acids 112 and 158. The corresponding codons are represented. (B) The theoretical complement of the three isoforms in a pH gradient (isoelectrofocalization).

## LES APOE DANS LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE

Les lipides sont transportés dans le plasma sous forme de lipoprotéines, complexes macromoléculaires constitués

d'un noyau central lipidique entouré d'apolipoprotéines qui participent à la formation, à la sécrétion, au transport vers les tissus périphériques et au métabolisme hépatique de ces lipides. L'apoE est l'un des composants des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons, lipoprotéines de très faible densité (VLDL)) et des lipoprotéines de haute densité (HDL).

L'apoE est le ligand de ces lipoprotéines aux récepteurs cellulaires dont le récepteur des LDL localisé dans le foie, le neuropile et sur les astrocytes (récepteur apoB/E), le récepteur LRP (protéine proche des récepteurs LDL) localisé sur le neurone et en petite quantité sur les astrocytes, et le récepteur des VLDL et des chylomicrons. L'isoforme E2, principalement associée à la fraction HDL des lipoprotéines plasmatiques, a une affinité réduite pour les récepteurs apoB/E. Cette isoforme est associée à une cholestérolémie plus basse que l'isoforme E3. L'isoforme E4, quant à elle, a une plus grande affinité pour les VLDL et pour les récepteurs apo B/E et s'associe à une augmentation de la cholestérolémie. Elle expose au risque de coronaropathie alors que l'isoforme E2 s'avère protectrice, excepté dans les cas d'hyperlipidémie de type III.

Nous avons montré que dans la population lorraine, 17 p. 100 de la variabilité du cholestérol est imputable aux variations alléliques de l'apoE [3] et que les sujets porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  ont des taux de triglycérides plus élevés que les sujets porteurs de l'allèle  $\epsilon 2$  lorsque leur poids augmente [4].

## L'APOLIPOPROTÉINE E DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

De nombreuses études épidémiologiques et génétiques ont établi un lien étroit entre le polymorphisme de l'apoE et la DSTA et font jouer un rôle central à cette apolipoprotéine dans la physiopathologie de la maladie.

L'équipe de Namba [5] en 1991 est la première à montrer, par méthode immunohistochimique, la présence de l'apoE aux côtés de la protéine amyloïde dans les plaques séniles extracellulaires, les vaisseaux sanguins cérébraux et les DNF des patients atteints de DSTA. Des complexes apoE-A $\beta$  sont observés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et une interaction forte entre l'apoE et l'A $\beta$  a été constatée [6]. L'équipe de Rebeck [7] a confirmé la présence d'apoE et du récepteur LRP dans les plaques séniles des malades. Enfin, les niveaux de transcription de l'ARNm de l'apoE dans le cerveau et en particulier dans les astrocytes sont augmentés chez les malades [8, 9].

D'autres études indiquent que le rôle de l'apoE dans la DSTA est lié à son polymorphisme. Les patients porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  ont davantage de plaques amyloïdes et une densité plus grande de dépôts d'A $\beta$  dans leurs plaques séniles et leurs vaisseaux cérébraux [7, 10, 11]. Selon certains auteurs, les complexes entre apoE4 et A $\beta$  se forment plus rapidement et avec une affinité plus importante que les complexes apoE3-A $\beta$  [6].

L'équipe de Strittmatter montre le lien entre le polymorphisme de l'apoE et la protéine tau, composant principal des DNF, qui est anormalement phosphorylée

dans la DSTA : la protéine tau non phosphorylée se lie davantage à l'apoE3 qu'à l'apoE4, alors que ni l'apoE4, ni l'apoE3 ne se lient à la protéine tau anormalement phosphorylée [12].

Les études épidémiologiques confortent le rôle joué par le polymorphisme de l'apoE dans la physiopathologie de la DSTA. Roses *et al.* [6] sont les premiers à montrer une association statistiquement significative entre la DSTA familiale et la présence de l'allèle  $\epsilon 4$ . Nous avons, peu de temps après, obtenu des résultats superposables chez les malades atteints de DSTA sporadique à début tardif (0,46 vs 0,12) [13, 14]. De nombreuses autres équipes dont celle d'Amouyel *et al.* ont depuis confirmé cette association [15].

La fréquence des différents allèles varie suivant les études (variations géographiques et ethniques) et l'expression de la maladie (familiale ou sporadique). La fréquence moyenne de l'allèle  $\epsilon 4$  est de 0,37 (0,24-0,52) dans la DSTA sporadique à début tardif contre 0,16 (0,12-0,2) chez les témoins.

Le risque pour les porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  de développer la DSTA est entre 3 et 15 fois plus élevé que celui des non-porteurs selon les études. Dans notre population, nous obtenons un odds ratio calculé de 11,82 [4]. Le risque de survenue de la DSTA augmente de 20 à 90 p. 100 suivant que l'on a 0, 1 ou 2 allèles  $\epsilon 4$ . Soixante-cinq p. 100 des DSTA seraient attribuables à la présence de  $\epsilon 4$ . L'âge de début de DSTA des formes tardives décroît proportionnellement au nombre d'allèles  $\epsilon 4$ . *A contrario*, l'allèle  $\epsilon 2$  diminuerait le risque de DSTA et retarderait l'âge d'apparition de la maladie [16, 17]. L'effet protecteur de  $\epsilon 2$  vis-à-vis de la DSTA pourrait expliquer en partie la fréquence élevée de cet allèle chez les centenaires [18].

Bien avant ces données biologiques et épidémiologiques, les études génétiques avaient établi le lien entre la région chromosomique 19q13.2 [19] et la DSTA. Ce n'est que plus récemment, après les travaux de Strittmatter, que l'étude des marqueurs génétiques polymorphes de la région q13.2 du chromosome 19 regroupant les gènes de l'apoE, le gène D19s47, les gènes des apoCI, apoCII, apoCI' et apoCIII a indiqué que la localisation du variant fonctionnel se limitait au locus de l'apoE [20].

## HYPOTHÈSES IMPLIQUANT LES APOLIPOPROTÉINES E

Trois hypothèses principales impliquent actuellement les apolipoprotéines E dans la physiopathologie de la DSTA.

### Apolipoprotéine E et croissance neuronale

L'apoE a un rôle défini dans la réparation nerveuse périphérique. En cas d'altération nerveuse périphérique, le recrutement de macrophages produit de grandes quantités d'apoE qui participent à la maintenance des membranes de myéline en redistribuant les lipides de dégradation vers les axones en régénérescence et vers les cellules de Schwann responsables de la remyélinisation par l'intermédiaire des LDL-récepteurs [21].

L'apoE a probablement un effet similaire sur la croissance et la réparation du neurone. En raison d'affinités différentes avec les lipoprotéines et les récepteurs et donc de qualités de transport des lipides dans le système nerveux central différentes, l'apoE3 provoquerait une croissance neuritique (élongation et ramification) tandis que l'apoE4 l'inhiberait [22]. Par leur liaison aux protéoglycanes à héparine sulfate ou en déplaçant les facteurs de croissance, les isoformes pourraient aussi interagir différemment avec la matrice extracellulaire.

L'apoE est l'une des principales lipoprotéines du liquide céphalorachidien [23] assurant une grande partie du transport du cholestérol et des phospholipides. Son niveau est augmenté dans de nombreuses maladies du système nerveux central, dont la sclérose en plaques [23, 24].

### ApoE et cascade de l'amyloïde

La deuxième hypothèse, appelée « cascade de l'amyloïde », a été proposée en 1992 par Hardy et Higgins [25]. La DSTA résulterait d'une hyperproduction de peptide A $\beta$  responsable de la formation de substance amyloïde, toxique pour le neurone. Cette hyperproduction d'A $\beta$  pourrait être secondaire à un excès de production d'APP; le modèle type est la trisomie 21, dans laquelle les patients possèdent 3 copies du gène codant pour l'APP. Dans cette maladie, il y a hyperproduction d'APP par effet gène-dose et apparition d'une DSTA à début précoce.

La DSTA pourrait aussi être secondaire à un défaut de maturation de l'APP. La DSTA à début précoce et familiale est liée au chromosome 14q24.3, probablement impliqué dans le processing de l'APP, les gènes candidats sont des inhibiteurs de protéases, la cathepsine D(14q11), c-Fos ou une protéine du choc thermique (HSPA2) fonctionnant comme un chaperon positif. Il a été décrit des familles suédoise et hollandaise dont les membres ont une DSTA précoce par mutation ponctuelle du gène de l'APP. Les cellules de neuroblastome transfectées par une forme d'APP qui présente la mutation « suédoise » expriment 6 à 8 fois plus de protéine A $\beta$  que les cellules transfectées par l'APP de type sauvage.

La DSTA pourrait enfin résulter d'une potentialisation de l'effet neurotoxique de l'A $\beta$  sécrétée en quantité physiologique : l'apoE interviendrait à ce niveau. En effet, la microglie activée (comprenant les astrocytes) sous l'effet des lésions neuronales physiologiques accompagnant l'avancée en âge, produirait davantage d'apoE par activation de protéines kinases C. Les cellules microgliales, riches en LDL-récepteurs, peuvent lier l'apoE4, qui est capable à son tour de se lier avec une grande affinité au peptide A $\beta$  [6] directement ou par l'intermédiaire de glycosaminoglycanes. La production et la fixation à la microglie d'apoE4 pourraient faciliter la concentration et le dépôt de A $\beta$  sur et autour de la microglie, formant ainsi le noyau des plaques amyloïdes (transformation des plaques séniles diffuses en plaques séniles fibrillaires et insolubles), transformant les monomères de A $\beta$  en agrégats insolubles. En effet, la formation de substance amyloïde semble dépendante d'un phénomène de nucléation. La liaison apoE4-A $\beta$  serait le grain (seed)

qui activerait la « cristallisation » de la protéine A $\beta$ . Les apoE2 et E3 pourraient inhiber cette polymérisation et apoE4 la favoriser. L'apoE pourrait ainsi être une molécule chaperone pathologique [26].

La neurotoxicité de A $\beta$  pourrait être secondaire à une activation de mécanismes apoptotiques [27] ou à un effet amplificateur de l'entrée cellulaire de calcium par effet déstabilisant de membrane. Ces phénomènes entraîneraient une hyperphosphorylation de la protéine tau avec formation de PHF, conduisant à une dépolymérisation des microtubules, une altération du transport axonal, une déconnection des synapses, une repousse anarchique avec dégénérescence du neurone et une gliose active qui entretiendrait le cercle vicieux par augmentation de sécrétion d'apoE par les astrocytes [28]. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'indométacine (anti-inflammatoire non stéroïdien inhibiteur des prostaglandines et de l'interleukine 1, qui supprimerait l'activation de la microglie) semble prévenir ou retarder le début de la DSTA [29]. D'autres antagonistes de l'interleukine 1 $\beta$  pourraient avoir la même action inhibitrice de la prolifération gliale.

L'hypothèse de Hardy et Higgins [25] est controversée. L'apoE pourrait être impliquée dans la clairance de la substance amyloïde physiologiquement produite. L'équipe de Whitson [30] montre que l'apoE tend à abaisser la neurotoxicité de A $\beta$ , dans les cultures de neurones hippocampiques, suggérant qu'à concentration normale dans le LCR, l'apoE aurait un rôle neuroprotecteur. Cette neuroprotection pourrait être due à une augmentation de disponibilité des lipides recyclés à partir des membranes des neurones endommagés. D'autre part, A $\beta$  pourrait être éliminée du neuropile par les neurones et les astrocytes par l'intermédiaire de la liaison apoE-LRP. L'apoE4 pourrait être moins neuroprotectrice que l'apoE2 en raison d'une durée de vie plus courte. La plus grande affinité de l'apoE4 pour A $\beta$  pourrait la soustraire de ses mécanismes de régulation, induirait sa plus grande production et favoriserait l'amyloïdogénèse. Cet effet neuroprotecteur de l'apoE est corroboré par l'observation d'une augmentation de l'ARNm de l'apoE dans l'hippocampe, après lésion du cortex entorhinal, avec un délai superposable à l'augmentation de tubuline 1 impliquée dans les mécanismes de repousse neuronale [31] : les lésions du cortex entorhinal, qui entraînent une dégénérescence de la voie perforante allant du cortex entorhinal à l'hippocampe par destruction des cellules pyramidales CA1, entraîneraient, par activation des astrocytes, une hyperproduction d'apoE favorisant la repousse des cellules pyramidales hippocampiques glutamatergiques et des cellules cholinergiques du septum. Il semble, enfin, que l'apoE puisse aussi moduler la neurotoxicité de A $\beta$  par les taux de cholestérol cellulaires, membranaires en particulier, qui, comme les facteurs de croissance, semblent agir sur la fonction neuronale en modulant l'homéostasie calcique. Le cholestérol pourrait antagoniser les effets neurotoxiques de A $\beta$  expliquant la diminution d'effet amplificateur sur le calcium de A $\beta$  de lymphocytes de patients atteints de DSTA, les modifications de structure des membranes neuronales dans

la DSTA et l'augmentation de neurotoxicité de A $\beta$  dans les zones pauvres en cholestérol telles que la substance grise corticale [30]. Cette hypothèse est démentie par Sparks *et al.* [31] qui observent, chez des animaux nourris avec une grande quantité de cholestérol (2 p. 100), une accumulation de A $\beta$  dans les cellules cérébrales, sans induire pour autant d'altération du cytosquelette, indiquant que le cholestérol, pourrait avoir une action directe sur le métabolisme de l'APP.

## ApoE et protéine tau

La troisième hypothèse met en jeu l'interaction entre l'apoE et la protéine tau. Dans la DSTA, le cytosquelette neuronal est progressivement détruit et remplacé par des agglomérats de filaments en double hélice (PHF) qui sont composés, en grande partie, par des protéines tau hyperphosphorylées. L'assemblage et l'intégrité des microtubules sont inhibés par la phosphorylation de tau, peut-être par défaut de liaison de la protéine tau normale à la tubuline dans les microtubules. Les neurones présentant ces dégénérescences neurofibrillaires de filaments en double hélice, perdent l'assemblage microtubulaire de leur cytosol et dégènèrent.

L'apoE est un des constituants des DNF des patients ayant une DSTA [5]. Quand apoE3 est incubée avec apoE4, apoE3 forme des complexes stables avec tau contrairement à apoE4, alors qu'aucune isoforme ne se lie à tau phosphorylée. L'isoforme E3 pourrait être un cofacteur bénéfique ou un agent séquestrant de la protéine tau en la protégeant de la phosphorylation, ce qui lui permettrait de conserver son action sur les microtubules [32]. Ce rôle protecteur de l'apoE nécessite sa présence dans le neurone. Des études de détection immunohistochimiques récentes démontrent sa présence dans les neurones chez l'homme [32]. Les voies d'entrée dans le neurone, bien que mal connues, semblent de nature endosomale, médiées probablement par les VLDL-récepteurs ou les LRP [33, 34]. La démonstration récente par une équipe allemande de l'existence d'une corrélation entre le nombre d'allèles  $\epsilon 4$  et le nombre de DNF vient appuyer cette hypothèse [35].

## INTÉRÊT DIAGNOSTIQUE DE LA DÉTERMINATION DU GÉNOTYPE

La sensibilité du test de détermination du génotype de l'apoE (la découverte de l'allèle  $\epsilon 4$ ) dans le diagnostic de la DSTA est d'environ 60 p. 100 avec une spécificité de 80 p. 100. La faible sensibilité du test est due aux 43 p. 100 de patients qui ne sont porteurs d'aucun allèle  $\epsilon 4$  et qui ont la maladie. La valeur prédictive négative (la probabilité chez un patient non porteur de  $\epsilon 4$  de ne pas avoir la DSTA) est de 0,95 pour les patients de moins de 75 ans et de 0,69 pour les patients de plus de 85 ans. La valeur prédictive positive augmente avec l'âge (la probabilité d'un individu porteur de  $\epsilon 4$  d'avoir la maladie est de 0,45 avant 75 ans

et de 0,88 après 85 ans) en raison d'une augmentation de la prévalence de la maladie.

La détermination du génotype qui pourra, peut-être, être utile pour sous-grouper les patients en termes de réponse au traitement ou de progression de la maladie ne peut en aucun cas permettre le diagnostic de DSTA. Il n'apparaît pas souhaitable d'estimer le risque d'une personne asymptomatique de développer une DSTA (l'allèle  $\epsilon 4$  est un facteur de risque alors que l'allèle  $\epsilon 2$  protège de la maladie) en l'absence de traitement curatif, d'autant que l'allèle  $\epsilon 4$ , contrairement à l'allèle  $\epsilon 2$ , semble s'accompagner d'une diminution de l'espérance de vie.

## CONCLUSION

L'apoE n'est probablement qu'un des facteurs protéiques pouvant intervenir dans les DSTA. D'autres facteurs, tels que les glycosaminoglycanes, l' $\alpha 1$ -antitrypsine, la substance P, la cathepsine D, ont, eux aussi, probablement un rôle régulateur.

L'intérêt des hypothèses énumérées tient dans leurs applications thérapeutiques actuellement en développement, qu'il s'agisse des anti-inflammatoires, d'anti-chaperones ou de régulateurs du cholestérol. Toutes les substances qui interfèrent avec la production de l'apoE peuvent avoir un intérêt thérapeutique : la production de l'apoE par le macrophage est augmentée par le taux de cholestérol libre intracellulaire, de LDL, de protéines kinases A et C, de TGF $\beta$  (facteur de croissance tumorale bêta), par la dexaméthasone, le M-CSF, l'AMPc (acide adénosine monophosphorique cyclique)... Les agents tels que LPS, endotoxine, interféron  $\gamma$  et GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) conduisent à une diminution de synthèse de l'apoE.

Si l'allèle  $\epsilon 4$  est un facteur de risque pour la DSTA, ce qui semble maintenant clairement démontré, les pays où la fréquence de  $\epsilon 4$  est particulièrement élevée (en particulier les pays en voie de développement) risquent d'être confrontés à un problème majeur de santé publique si l'espérance de vie de leurs populations s'accroît. En effet, il existe des différences importantes de fréquence relative des allèles  $\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2$  entre groupes ethniques. L'allèle  $\epsilon 4$  est peu fréquent chez les Asiatiques alors que sa fréquence est très élevée chez les Africains noirs, en particulier les Bushmen (fréquence de  $\epsilon 4/\epsilon 4$  3 à 5 fois plus élevée que chez les Caucasiens).

Bien que la recherche concernant l'apoE permette de mieux comprendre la physiologie si complexe de la maladie d'Alzheimer et laisse entrevoir des espoirs thérapeutiques, il faut tout de même insister sur le fait que l'allèle  $\epsilon 4$  n'est qu'un facteur de risque, que sa présence n'est ni nécessaire, ni suffisante au développement de la DSTA et que l'apoE, qui n'est pas indispensable à la régénérescence neuronale [3], pourrait être remplacée, quand elle est déficiente, par d'autres apolipoprotéines (apoD, J ou AIV par exemple) qui devront, elles aussi, être étudiées dans la DSTA.

Références

1. Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW. Apolipoprotein E : the complet amino acid sequence. *J Lipid Res* 1992 ; 33:447-54.
2. Weisgraber KH, Rall SC, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity cysteine arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981 ; 256:9077-83.
3. Boerwinckle E, Visvikis S, Welsh D, Steinmetz J, Hanash S, Sing CF. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. The role of the apolipoprotein E polymorphisms in determining levels, variability and covariability of cholesterol, beta-lipoprotein and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am J Med Genet* 1987 ; 27:567-82.
4. Gueguen R, Visvikis S, Steinmetz J, Siest G, Boerwinckle E. An analysis of genotype effects and their interactions using the apolipoprotein E polymorphism and longitudinal data. *Am J Hum Genet* 1989 ; 45:793-802.
5. Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 1991 ; 541:163-6.
6. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Perikak-Vance MA, Roses AD. Apolipoprotein E : high avidity binding to  $\beta$  amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90:1977-81.
7. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993 ; 11:575-80.
8. Yamada T, Kondo A, Takamatsu JI, Tateishi J, Goto I. Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1995 ; 129:56-61.
9. Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI *et al.* Neuropathological changes in Scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol* 1991 ; 65:4759-68.
10. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ *et al.* Increased amyloid  $\beta$  amyloid-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90:9649-53.
11. Berr C, Hauw JJ, Delaerle P, Duyckaerts C, Amouyel P. Apolipoprotein  $\Sigma$  allele e4 os linked to increased deposition of the amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) in cases with or without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994 ; 178:221-4.
12. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goebert M *et al.* Microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol* 1994 ; 125:163-71.
13. Lucotte G, Visvikis D, Leininger-Muller B *et al.* Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Am J Med* 1994 ; 54:286-8.
14. Lucotte G, Davis F, Visvikis S *et al.* Apolipoprotein E-4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993 ; 342:1309.
15. Amouyel P, Brousseau T, Fruchart JC, Dallongeville J. Apolipoprotein  $\Sigma$  e4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993 ; 342:1309.
16. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ *et al.* Gene dose of Apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993 ; 261:921-3.
17. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ *et al.* Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele decreases risk of late onset Alzheimer's disease. *Nature Genet* 1994 ; 7:180-3.
18. Schachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, Rouger H, Frougel P, Cohen D. Genetic associations with human longevity at the ApoE and ACE loci. *Nature Genet* 1994 ; 6:29-32.
19. Perikak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC *et al.* Linkage studies in familial Alzheimer disease: Evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 1991 ; 48:1034-50.
20. Chartier-Harlin MC *et al.* 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. *Hum Mol Genet* 1994 ; 3:569-74.
21. Goodrum JF. Cholesterol from degenerating nerve myelin becomes associated with lipoproteins containing apolipoprotein E. *J Neurochem* 1991 ; 56:2082-6.
22. Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth *in vitro*. *Science* 1994 ; 264:850-2.
23. Roheim PS, Carey M, Forte T, Vega GL. Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci* 1979 ; 76:446-9.
24. Rifai N, Christenson RH, Gelman BB, Silverman LM. Changes in cerebrospinal fluid IgG and Apolipoprotein E indices in patients with multiple sclerosis during demyelination and remyelination. *Clin Chem* 1987 ; 33:1155-7.
25. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992 ; 256:184-5.
26. Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E : a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett* 1992 ; 135:235-8.
27. Loo DT, Copani A, Christain JP, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by  $\beta$ -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990:7951-5.
28. Fukuyama R, Adhwani KC, Galdzicki Z, Rapoport SI, Ehrenstein G.  $\beta$ -amyloid polypeptide increases calcium-uptake in PC12 cells : a possible mechanism for its cellular toxicity in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1994 ; 667:269-72.
29. Breitner JCS, Gau BA, Welsh KA *et al.* Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 1994 ; 44:227-32.
30. Whitson JS, Mims MP, Strittmatter WJ, Yamaki T, Morisset JD, Appel SH. Attenuation of the neurotoxic effect of A $\beta$  amyloid peptide by Apolipoprotein E. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 199:163-70.
31. Sparks DL, Scheff W, Hunsaker JC, Hiuachen LIU, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like  $\beta$ -amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 1994 ; 126:88-94.
32. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubules-associated protein tau: implication for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91:11183-6.
33. Okuizumi K, Onodera O, Namba Y *et al.* Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nature Genet* 1995 ; 11:207-9.
34. Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW *et al.* LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 1995 ; 82:331-40.
35. Ohm TG, Kirca M, Bohl J *et al.* Apolipoprotein E polymorphism influences not only cerebral senile plaque load but also Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Neuroscience* 1995 ; 66:583-7.

RÉSUMÉ

La grande star actuelle de la recherche sur la démence sénile de type Alzheimer (DSTA) est, sans aucun doute, l'apolipoprotéine E (apoE). Le locus de l'apoE situé sur le chromosome 19 (19q12) possède trois allèles majeurs  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  qui composent 6 génotypes et 6 phénotypes protéiques. L'apoE est bien connue pour ses propriétés de transporteur du cholestérol de cellule à cellule et d'organe à organe. La découverte récente de la fréquence élevée de l'allèle  $\epsilon 4$  chez les patients atteints de DSTA, la liaison entre DSTA et le gène de l'apoE sur le bras long du chromosome 19 ainsi que la présence de l'apoE aux côtés de la protéine bêta amyloïde (A $\beta$ ) dans les plaques séniles, les dégénérescences neuro-fibrillaires (DNF) et les vaisseaux des sujets atteints de DSTA sont autant d'arguments en faveur du rôle de l'apoE dans la physiopathologie de la maladie. Différentes hypothèses ont été avancées ; certaines impliquent l'action différentielle des isoformes sur la croissance et la réparation neuronale, sur la formation de complexes avec A $\beta$  ou sur la clairance de A $\beta$ . L'apoE serait ainsi, pour certains, une chaperone pathologique, pour d'autres, elle protégerait le neurone d'A $\beta$ . Une autre hypothèse met en jeu l'interaction entre l'apoE et la protéine tau, constituant principal des DNF, sous forme hyperphosphorylée. L'apoE3, contrairement à l'apoE4, pourrait séquestrer la protéine tau, empêcher sa phosphorylation et lui permettre de conserver son action de stabilisateur des microtubules neuronaux. Quoi qu'il en soit, la détermination du génotype de l'apoE ne peut, en aucune façon, permettre à elle seule le diagnostic de la maladie. L'allèle  $\epsilon 4$  constitue un facteur de risque indéniable mais sa présence n'est ni nécessaire, ni suffisante au développement de la DSTA. De nombreux autres facteurs ont probablement eux aussi un rôle modulateur.

Presse Med 1996 ; 25:763-8

Publication N°8

*Biologie prospective. Comptes Rendus du 9° Colloque de Pont à Mousson*, Ed.  
Galteau MM, Delwaide P, Siest G, Henny J. John Libbey Eurotext, Paris, (1997)  
pp 167-170.

**Apolipoprotein R136C. A rare variant of human  
apolipoprotein E discovered during the STANISLAS  
Cohort study**

Bohnet K., Schlenck A., Merched A., Siest G., Visvikis S.

## **Apolipoprotein E R136C. A rare variant of human apolipoprotein E discovered during the STANISLAS Cohort Study**

K. Bohnet, A. Schlenck, A. Merched, G. Siest, S. Visvikis

Laboratoire du Centre de Médecine Préventive, URA CNRS 597, 2, avenue du Doyen Jacques-Pariset, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

### **INTRODUCTION**

Apolipoprotein E (apoE) is a 299 amino acid glycoprotein of 34.2 kDa, which plays an important physiological role by mediating the interaction of lipoproteins with cellular receptors. It is therefore a key protein in the metabolism of cholesterol and triglycerides [1]. ApoE is a polymorphic protein which exists in humans as three common isoforms (E2, E3, E4), encoded by three alleles, called  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$ . At the protein level, the polymorphism corresponds to the presence of arginine (codon CGC) or cysteine (codon TGC) in positions 112 and 158 [2]. In addition to the three common isoforms, at least 30 rare mutations have been described [3]. The common isoforms can be identified either on the protein level on the basis of their global charge (phenotyping) or on the gene level by direct detection of the nucleotide substitution (genotyping). We report the identification of a rare apoE variant R136C [4], which was detected during a large scale apoE genotyping of the STANISLAS cohort, a cohort of 1006 Caucasian families.

### **METHODS**

#### **Subjects, blood samples and biochemical procedures**

The family of the two probands (Father, Mother, Daughter and Son) came to the Centre for Preventive Medicine, (Nancy, France) for a routine health screening and participation in a large population-based preventive medicine family study ("STANISLAS Cohort Study"). Blood was collected after an overnight fast, either in EDTA Vacutainers<sup>®</sup> or in tubes for serum separation. Buffy coat was separated by centrifugation (1000g, 10 min, room temperature) and frozen in liquid nitrogen until extraction of DNA. DNA extraction was performed according to the method of Miller *et al.* [5]. Total serum cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides were measured using standard enzymatic methods (Merck, Darmstadt, Germany), automatized on AU5000 (Olympus, Japan). Serum apoA1, apoB and Lp(a) were determined by immunonephelometry on Behring Nephelometer Analyzer, with Behring reagents (Rueil-Malmaison, France), serum apoE was determined by turbidimetry using reagents from Daiichi (Japan) automatized on COBAS MIRA.

#### **Apolipoprotein E genotyping, phenotyping and DNA sequencing**

ApoE restriction isotyping was performed by PCR amplification and subsequent digestion with restriction enzyme *HhaI* as described by Hixson *et al.* [6]. The restriction fragments were visualised on conventional polyacrylamide slab gel and analysed by laser induced fluorescence linked capillary gel electrophoresis detection using P/ACE<sup>™</sup> 5100 and LiFluor<sup>™</sup> dsDNA 1000kit Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA) as described by Schlenck *et al.* [7]. Two dimensional electrophoresis was performed as de-

scribed by Visvikis *et al.* [8]. DNA sequencing was performed by GENOME EXPRESS, Grenoble using Applied Biosystems A373 Automated Sequencer.

## RESULTS

### Anthropometric and biochemical determinations

The mutation was present in two related subjects of a nuclear family, Father and Son. For Mother, Daughter and Son, all biochemical values were within the reference values considered to be normal for the corresponding sex and age group [9]. The Father had an elevated serum concentration of triglycerides (2.57 mmol/l) and a slightly elevated serum concentration of cholesterol (7.17 mmol/l). For apoE serum levels, no acceptable reference values have yet been published, so we compared the values of the family members to mean values of individuals of the STANISLAS cohort belonging to the same sex and age group. ApoE serum concentration of the Father was elevated as compared to the mean concentration of the corresponding group (82.2 mg/l vs.  $50.7 \pm 16.1$  mg/l [n = 392]), apoE concentration of the Son was slightly elevated (57.2 mg/l vs.  $47.1 \pm 11.0$  mg/l [n = 282]).

### Restriction isotyping and DNA sequencing

*HhaI* isotyping of the members of the family revealed an unusual restriction profile for the Father and the Son, which was consistent with the presence of a  $\epsilon 3$  allele associated with an unusual larger fragment. The restriction fragments of Father and Son were analysed by laser induced fluorescence detection linked capillary gel electrophoresis [7] (Figure 1, only the sample of the Father is shown). Fragments a-f correspond to the fragments yielded by the digestion of allele  $\epsilon 3$  having the lengths a: 16 bp, b:17/18 bp, c:33 bp, d:38 bp, e:48 bp and f:91 bp. The length of the unusual fragment g was calculated to be ~111 bp (migration time 16.79 ; Fig. 2). Direct DNA sequencing revealed a point mutation at codon 136; the normal CGC sequence was changed to TGC which results indeed in the disappearance of a *HhaI* cutting site and the generation of a fragment of 109 bp. This variant has been previously described as apoE R136C [4].

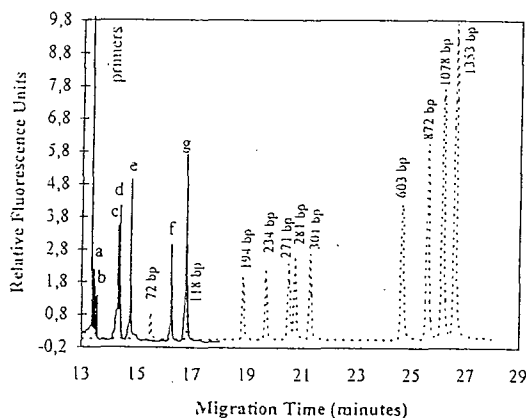


Figure 1 : Detection of the *HhaI* restriction fragments of the Father (solid line) by laser induced fluorescence detection linked capillary gel electrophoresis, in co-injection with the molecular weight marker *HaeIII* restriction digest of PhiX174 (dotted line).

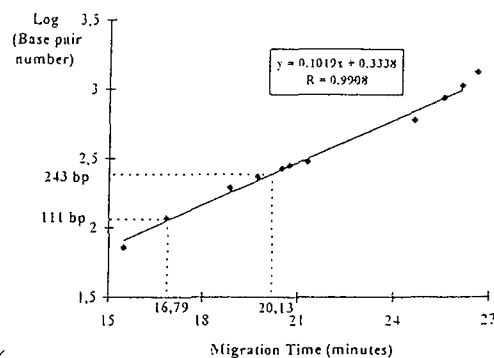


Figure 2 : Calibration curve derived from the injection of the molecular weight marker *HaeIII* restriction digest of PhiX174.



### Two dimensional electrophoresis

The DNA sequence change leads to an amino acid substitution Arg136 → Cys, which adds a negative charge to the protein and gives it the same global charge as apoE2. As shown in Figure 3, the migration patterns of Father and Son resemble indeed the migration pattern of E3/E2, the migration patterns of mother and daughter correspond to an E3/E3 phenotype.

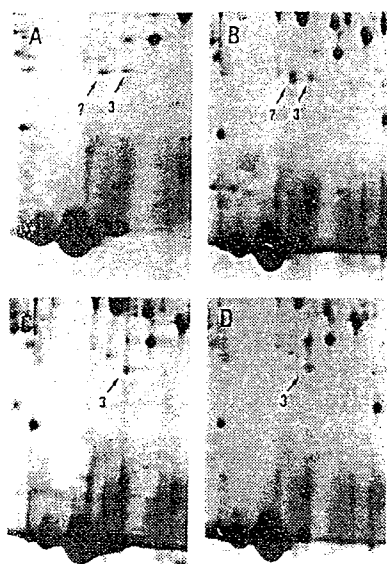


Figure 3 : Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the serum samples of the family. (A) Father, (B) Son, (C) Mother, (D) Daughter. The positions of apoE3 (3) and apoE R136C (?) are indicated.

### DISCUSSION

We identified the apoE variant R136C at the heterozygous status in two related subjects of the STANISLAS cohort. This variant has been detected by genotyping using molecular biology techniques that enabled the detection of the point mutation at the gene level. Phenotyping would not have been sufficient to detect apoE R136C, the global charge of it being equal to that of apoE2: apoE isoform E2 has a cysteine at position 112, a cysteine at position 158 and an arginine at position 136. ApoE R136C has a cysteine at position 112, an arginine at position 158 and a cysteine at position 136.

Three apoE mutations, including R136C, affecting amino acid 136 are known today. ApoE R136C has been detected, in the heterozygous state with the  $\epsilon 2$  allele, in a patient with type III hyperlipidaemia (HLP III). The variant has been reported to contribute to the inheritance of HLP III in a recessive fashion and it has been speculated that this contribution might be due to the defective receptor binding of R136C [4]. ApoE2-Christchurch (Arg136 → Ser) is a variant of the  $\epsilon 2$  allele, known to be associated with type III hyperlipoproteinaemia [10]. ApoE3' (Arg136 → His), a variant of the  $\epsilon 3$  allele has been reported to be associated with mild dyslipidaemia and double pre- $\beta$  very low density lipoproteins when inherited in combination with an  $\epsilon 3$  or an  $\epsilon 4$  allele. This variant has a slightly defective receptor binding, about 80% of apoE3 [11].

In conclusion, apoE R136C does not cause severe metabolic abnormalities when inherited in combination with a functional  $\epsilon 3$  allele. The transcription and translation of the  $\epsilon 3$  allele may provide enough func-

tional apoE to clear lipoprotein particles and thus be able to compensate for functional defects of the variant. The adult individual carrying the mutated gene displays mild disturbance of his lipid metabolism, his lipid profile resembles a moderate type III profile. The fact that no metabolic abnormalities whatsoever can be detected for the son might be due to his age. It has been observed that type III hyperlipoproteinaemia is almost exclusively a disease of adult life [12].

#### ACKNOWLEDGEMENTS

P/ACE™ 5510 and LiFluor™ dsDNA 1000kit for capillary electrophoresis were kindly provided from Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA). K. Bohnet is a recipient of a grant of the Gottlieb Daimler- und Karl Benz-Stiftung, Ladenburg/Germany. The STANISLAS Cohort Study is supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAM), the University Henri Poincaré-Nancy I, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Préviate, Astra Calvé, Beckman Instruments, BioMérieux, Daiichi Pure Chemicals, Johnson & Johnson, and Merck.

#### REFERENCES

- 1 - Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transporting protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240 : 622-630.
- 2 - Rall, SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982; 257 : 4171-4178.
- 3 - Knijff P de, Maagdenberg AMJM van den, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Human Mutation* 1994; 4 : 178-194.
- 4 - Walden CC, Huff MW, Leiter LA, Connelly PW, Hegele RA. Detection of a new apolipoprotein E mutation in type III hyperlipidemia using deoxyribonucleic acid restriction isotyping. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78 : 699-704.
- 5 - Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16 : 1215.
- 6 - Hixson JE Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31 : 545-548.
- 7 - Schlenck A, Visvikis S, O'Kane M, Siest G. High resolution separation of PCR product and gene diagnosis by capillary gel electrophoresis. *Biomed Chromatogr* 1995; 10 : 48-50.
- 8 - Visvikis S, Steinmetz J, Cuvelier I, Galteau MM, Siest G. Study of apoAI and apoE polymorphisms using two-dimensional electrophoresis. In : Galteau MM, Siest G (eds) *Recent progress in two-dimensional electrophoresis*. Nancy : Presses Universitaires, 1986 : 159-165
- 9 - Siest G, Henny J, Schiele F. *Références en biologie clinique*. Editions Scientifiques Elsevier, Paris, 1990.
- 10 - Wardell MR, Brennan SO, Janus ED, Fraser R, Carrell RW. Apolipoprotein E2-Christchurch (Arg136→Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinaemia. *J Clin Invest* 1987; 80 : 483-490.
- 11 - Minnich A, Weisgraber KH, Newhouse Y, Dong LM, Fortin LJ, Tremblay M, Davignon J. Identification and characterization of a novel apolipoprotein E variant, apolipoprotein E3'(Arg136→His): association with mild dyslipidemia and double pre-β very low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1995; 36 : 57-66.
- 12 - Shepherd J, Fruchart JC. Lipoproteins in health and disease : Lipoprotein nomenclature and classification of Hyperlipoproteinemia. In : Shepherd J, Fruchart JC (eds) *Human Plasma Lipoproteins*. Berlin : W. de Gruyter, 1989 : 14-16.

Publication N°9

Sous presse dans *Progrès Récents sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes  
Apparentées*. Edition SOLAL.

**Les apolipoprotéines D et E dans le système nerveux  
central des patients Alzheimeriens.**

Merched A., Terrisse L., Bertrand P., Poirier J.,  
Visvikis S., Siest G., Milne R., Rassart E.

# LES APOLIPOPROTEINES D ET E DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL DES PATIENTS ALZHEIMERIENS

A. MERCHED, L. TERRISSE, P. BERTRAND, J. POIRIER, S. VISVIKIS,  
G. SIEST, R. MILNE, E. RASSART

## I- RESUME

Afin d'étudier la fonction des apolipoprotéines (apo) D et E dans la maladie d'Alzheimer (MA), nous avons déterminé leur quantité dans l'hippocampe ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients atteints de la MA et d'autres patients ayant ou non des atteintes neurologiques différentes. Nos résultats montrent que dans l'hippocampe, la quantité de l'apoD, contrairement à celle de l'apoE, est significativement plus élevée chez les patients ayant la MA par rapport aux patients contrôles. Dans le LCR, la concentration des deux protéines augmente mais de façon plus substantielle pour l'apoD aussi bien chez les patients ayant la MA que chez ceux souffrant d'autres pathologies neurologiques par rapport aux individus exempt de toute maladie neurologique. De plus, dans le LCR des patients alzheimeriens, la concentration de l'apoD contrairement à celle de l'apoE, augmente de manière proportionnelle au nombre d'allèle  $\epsilon 4$  de l'apoE, le facteur de risque majeur de la MA. Ces résultats montrent l'importance des apoD et E dans les maladies neurodégénératives telle que la MA. La relation entre la concentration d'apoD et l'allèle  $\epsilon 4$  souligne une nouvelle interaction ou régulation métabolique potentielle par laquelle l'allèle  $\epsilon 4$  pourrait moduler ou expliquer la susceptibilité accrue des porteurs de cet allèle à la MA.

## II- INTRODUCTION

L'apolipoprotéine (apoE) est une protéine polymorphe qui possède trois allèles majeurs  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ . Le rôle de l'apoE dans le métabolisme lipidique est bien établi. Elle est l'un des composants des lipoprotéines riches en triglycérides dans la circulation, assurant la liaison de ces lipoprotéines aux récepteurs cellulaires (Mahley, 1988). Dans la maladie d'Alzheimer il est clairement démontré que la présence de l'allèle  $\epsilon 4$  augmente le risque de développer la MA et diminue l'âge de survenue de la maladie (voir revue Siest et al, 1995). Toutefois, les mécanismes précis expliquant l'implication

de l'apoE dans la MA ne sont pas encore démontrés. Tandis que certaines études postulent un rôle de l'apoE dans la clairance du peptide amyloïde (Strittmatter et coll, 1993), d'autres suggèrent un rôle dans la protection contre la phosphorylation excessive de la protéine tau (Strittmatter et al, 1994), et dans la plasticité neuronale (Poirier et coll, 1993). Les deux apolipoprotéines D et E sont exprimées dans de nombreux tissus notamment le système nerveux central (SNC). Leur synthèse est largement induite au cours de la régénération des nerfs périphériques et suggère des fonctions importantes dans la régénération neuronale du SNC au cours des maladies neurodégénératives tel que la MA. En effet, par comparaison à l'apoE, les fonctions physiologiques de l'apoD sont encore peu élucidées. Cette dernière appartient à la famille des lipocalines ayant la caractéristique de transporter des petites molécules hydrophobes dont la nature reste peu connue pour l'apoD.

Afin d'évaluer la possible synergie des deux apolipoprotéines D et E dans le SNC au cours du vieillissement neuropathologique, nous avons étudié leur niveau dans l'hippocampe ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients atteints de la MA et d'autres patients (ayant ou non des pathologies neurologiques diverses). Nous avons rapporté les variations des ces deux protéines en relation avec le polymorphisme de l'apoE, l'âge, le sexe et le statut mental des patients (le MMS).

### **III- SUJETS ET METHODES**

Les concentrations d'apoD et E ont été mesurées dans le LCR de 41 patients ayant une MA probable établie selon les critères NINCDS-ADRA, 11 sujets exempts de toute maladie neuropsychiatrique et 29 patients présentant d'autres pathologies neurologiques ou inflammatoires. Les échantillons de LCR ont été obtenus par ponction lombaire, recueillis dans les unités hospitalières de neurologie ou de gériatrie de la région de Nancy et stockés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse. Les tissus des hippocampes proviennent de 72 cas confirmés de MA et 35 sujets contrôles obtenus de l'hôpital Douglas (Verdun, QC, Canada). Dans le LCR, l'apoD a été mesurée à l'aide d'une technique radioimmunométrique (Camato et al, 1989) et l'apoE à l'aide d'une technique ELISA (Merched et al, 1997). L'immunoréactivité des deux protéines dans les homogénats hippocampaux a été évaluée après migration électrophorétique, électrotransfert et immunodétection classiques à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-apoD (2B9) et anti-apoE (3H1) dont les caractéristiques ont été décrites antérieurement (Camato et al, 1989; Weisgraber et al, 1986).

#### IV- RESULTATS ET DISCUSSION

Les apo D et E ont été détectées dans tous les homogénats d'hippocampe et la plupart des échantillons de LCR. La quantité de l'apoD est significativement supérieure ( $p < 0.005$ ) dans les hippocampes des patients atteints de la MA par rapport aux sujets contrôles (Fig 1 et 2A). Dans le LCR, elle est de 3 à 4 fois supérieure ( $p < 0.0001$ ) chez les patients avec la MA ( $4.23 \pm 1.58$  mg/l) par rapport à celle chez les sujets contrôles ( $1.15 \pm 0.71$  mg/l)), mais elle était également élevée chez les patients ayant d'autres pathologies neurologiques ( $3.29 \pm 1.35$  mg/l,  $p < 0.0001$ ) (Fig 2B). De même, une augmentation de la concentration de l'apoE, bien que moins marquée que celle de l'apoD, a été observée chez les patients MA, et les patients « neurologiques » ( $p < 0.001$  et  $p < 0.05$ , respectivement). Par contre, les niveaux hippocampaux d'apoE diminuent dans la MA (Bertrand et al, 1995).

L'augmentation *in vivo* des deux apolipoprotéines avec la MA et les autres maladies inflammatoires et neurodégénératives corrobore les précédentes études cellulaires rapportant une augmentation importante de leur synthèse suite à des lésions expérimentales (Boyles et al 1990). Une implication dans la remobilisation et la réutilisation du cholestérol a été proposée pour l'apoE (Poirier et al, 1993). Des fonctions similaires peuvent être proposées ici. L'apoD pourrait jouer un rôle accessoire dans la redistribution des lipides, par exemple via la stabilisation de la lécithine cholestérol acyl transférase LCAT (Steyer and Kostner, 1987). Etant donné son appartenance à la famille des lipocalines, elle pourrait assurer le transport de ligand(s) hydrophobe(s) essentiel(s) dans les situations pathologiques ou alternativement l'élimination de substance(s) neurotoxique(s).

Quant aux effets de l'allèle  $\epsilon 4$ , nous avons montré des variations significatives de la concentration de l'apoD dans le LCR des patients en relation avec cet allèle (Fig 3). L'allèle  $\epsilon 4$  est corrélé de manière dose-dépendante à une augmentation de la concentration en apoD (Fig 3C). La concentration était significativement supérieure chez les patients homozygotes  $\epsilon 4 / \epsilon 4$  ( $5.8 \pm 0.73$  mg/l) par rapport à celle des patients hétérozygotes  $\epsilon 3 / \epsilon 4$  ( $4.78 \pm 0.6$ ), elle-même supérieure à celle des patients de génotypes  $\epsilon 3 / \epsilon 3$  ( $3.05 \pm 0.19$ ).

Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre la concentration de l'apoE et la dose de l'allèle  $\epsilon 4$  (Fig 3D), ni entre les concentrations des deux apolipoprotéines dans l'hippocampe et le nombre

d'allèle  $\epsilon 4$  (Fig 3A et 3B). L'âge et le sexe n'affectent pas la concentration des apoD et E ni dans le LCR des patients atteints de la MA ni chez les contrôles. Les concentrations des apoD et E ne sont pas liées au score MMS et ne semblent pas varier avec la sévérité de la MA.

L'augmentation dose-dépendante de l'apoD dans le LCR avec l'allèle  $\epsilon 4$  pourrait refléter une certaine interaction ou régulation spécifique. Les niveaux d'apoD dans l'hippocampe n'étant pas affectée par le polymorphisme de l'apoE, l'interaction entre les deux marqueurs serait probablement de nature métabolique. En effet, les apo D et E font partie d'au moins une population de lipoprotéines dans le LCR (Borghini et al, 1995) qui pourrait être régulée par un turn-over différent suivant la nature de l'isoforme de l'apoE. L'absence de corrélation entre l'apoE et la dose de l'allèle  $\epsilon 4$  pourrait être due à l'appartenance de l'apoE à plus qu'une population de lipoprotéines de régulation différente (Borghini et al, 1995).

## **V- CONCLUSION**

L'augmentation des apoD et E semble être liée aux caractères communs de la MA et des autres pathologies neurologiques et inflammatoires, probablement en réaction aux dommages subis par les neurones. Ces résultats sont en faveur d'un rôle de coordination des deux protéines dans la réparation et la régénération neuronale. La corrélation positive entre la concentration de l'apoD dans le LCR et la dose d'allèle  $\epsilon 4$  souligne une interaction entre les deux protéines, qui pourrait être pertinente dans la physiopathologie de la MA.

## **VI- REMERCIEMENTS**

Nous tenons à remercier Drs C. Jeandel, H. Blain, J.M. Serot, et M. Weber pour la collecte des échantillons de LCR. Nous remercions également D. Aguilon et D. Derex pour leur assistance technique.

## VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERTRAND P., POIRIER J., ODA T., FINCH C. and PASINETTI G. Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Molec. Brain Res.*, 1995, 33 174-178.
- BORGHINI I., BARGA F., POMETTA D., JAMES R.W. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1255: 192-200.
- BOYLES J.K., NOTTERPEK L.M., ANDERSON L.J. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. *J Biol Chem*, 1990, 254, 17805-17815.
- CAMATO R., MARCEL Y., MILNE R., LUSSIER-CACAN S., WEECH P. Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J Lipid Res*, 1989, 30: 865-875.
- MAHLEY R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988, 240 : 622-630.
- MERCHED A., BLAIN H., VISVIKIS S., HERBETH B., JEANDEL C., SIEST G. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1996, 5146.
- POIRIER J., BACCICHET A., DEA D., GAUTHIER S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience*, 1993, 55(1): 81-90.
- SIEST G., PILLOT T., RÉGIS-BAILLY A., LENINGER-MULLER B., STEINMETZ J., GALTEAU M. M., VISVIKIS S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin. Chem.*, 1995, 41(8) : 1068-1086.
- STEYER E., KOSTNER G.M. Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: Comparison of proteo-liposomes containing apolipoprotein D, A-I, or C-I. *Biochem Biophys Acta*, 1987, 958: 484-491.
- STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., SCHMECHEL D., PERIKAK-VANCE M.A., ROSES A.D. Apolipoprotein E : high avidity binding to  $\beta$  amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl.Acad Sci. U.S.A.* 1993, 90: 1977-1981.1993.
- STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., GOEDERT M., WEISGRABER K.H., DONG L.M., JAKES R., HUANG D.Y., PERIKAK-VANCE M., SCHMECHEL D., ROSES A.D. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(23):11183-11186
- WEISGRABER K.H., RALL S.C., MAHLEY R.W., MILNE R.W., MARCEL Y.L., SPARROW J.T. Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem*, 1986, 261: 2068-2076.



Fig. 1. Immunodetection des ApoD et E dans les extraits des hippocampes des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (A) et des sujets contrôles (C) .

Fig 2. Variation de la concentration des ApoD et E dans les hippocampes (A) et les LCR (B) des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), des sujets contrôles et des patients atteints d'autres pathologies neurologiques que la MA (AP). Les bars représentent les moyennes  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  .

Fig. 3. Variation de la concentration des ApoD et E dans les extraits hippocampaux (A et B) et les LCR (C et D) des patients en fonction du nombre d'allèle  $\epsilon 4$ . \*  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  .

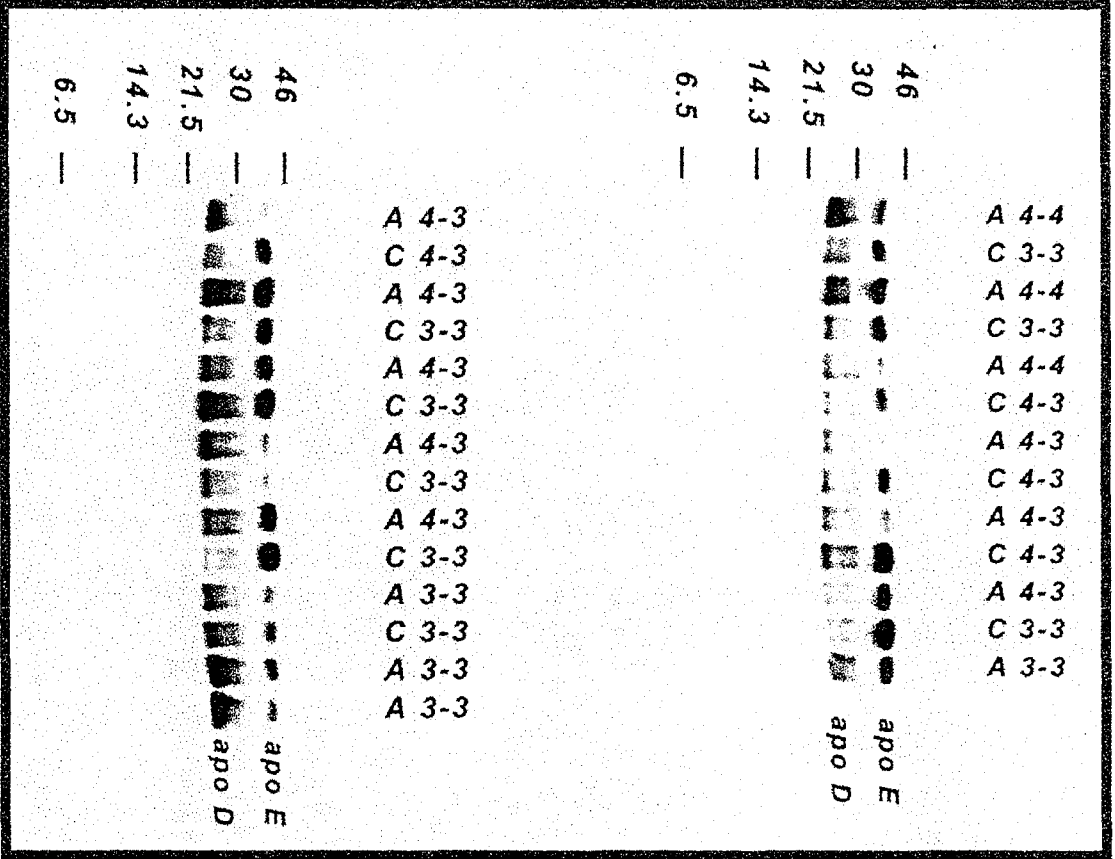
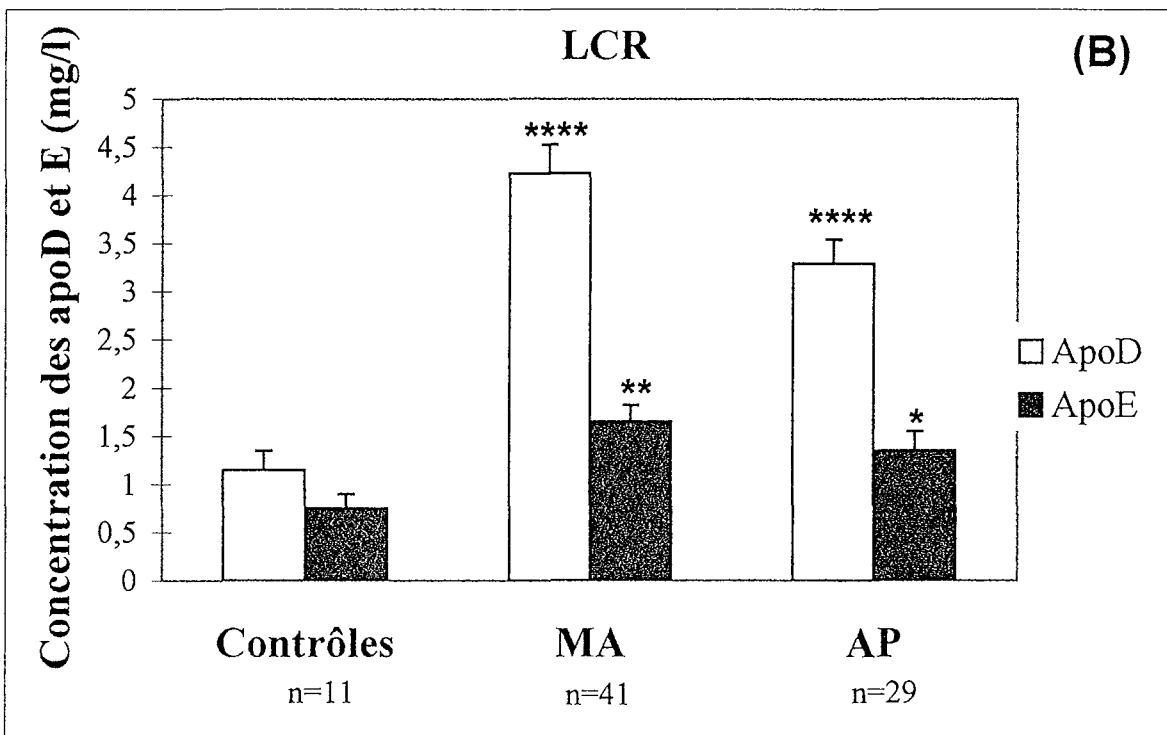
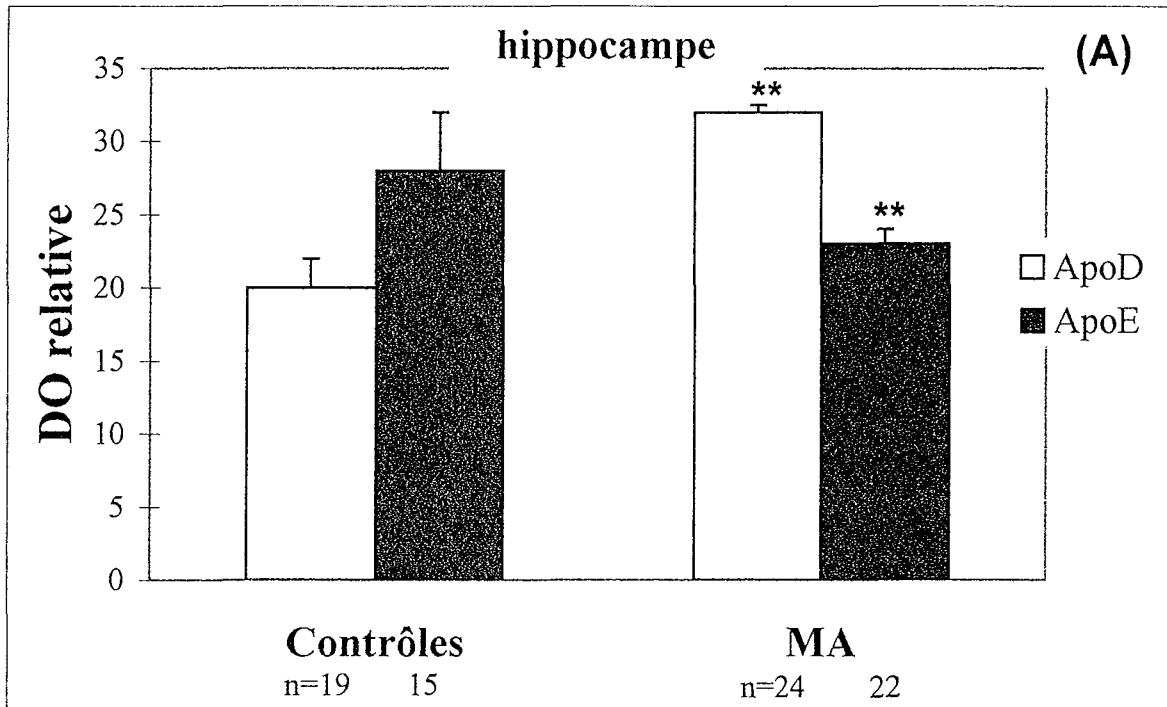
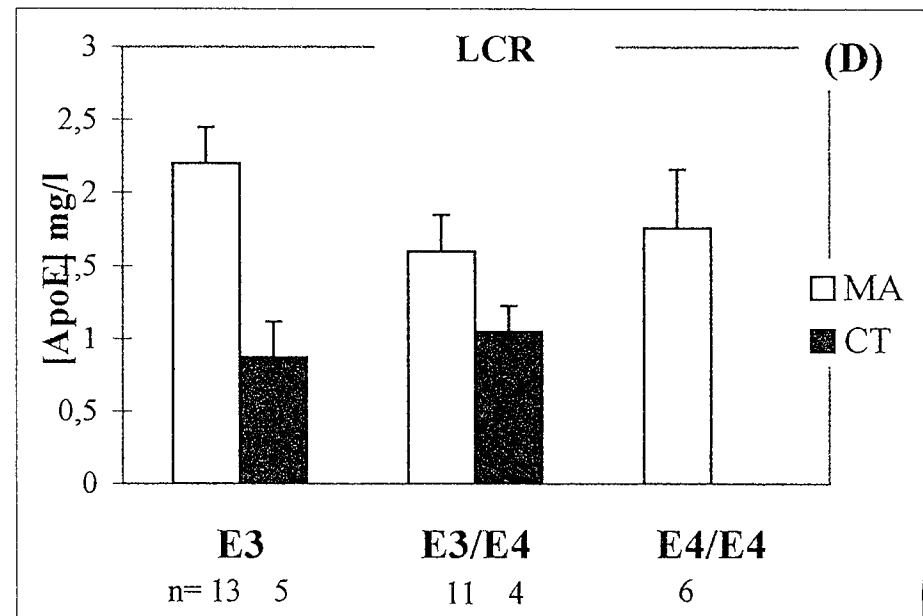
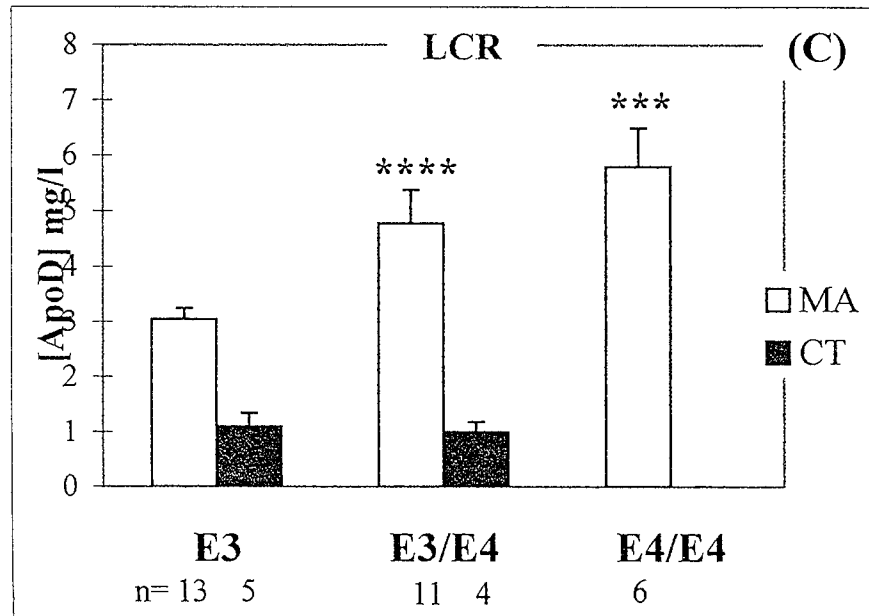
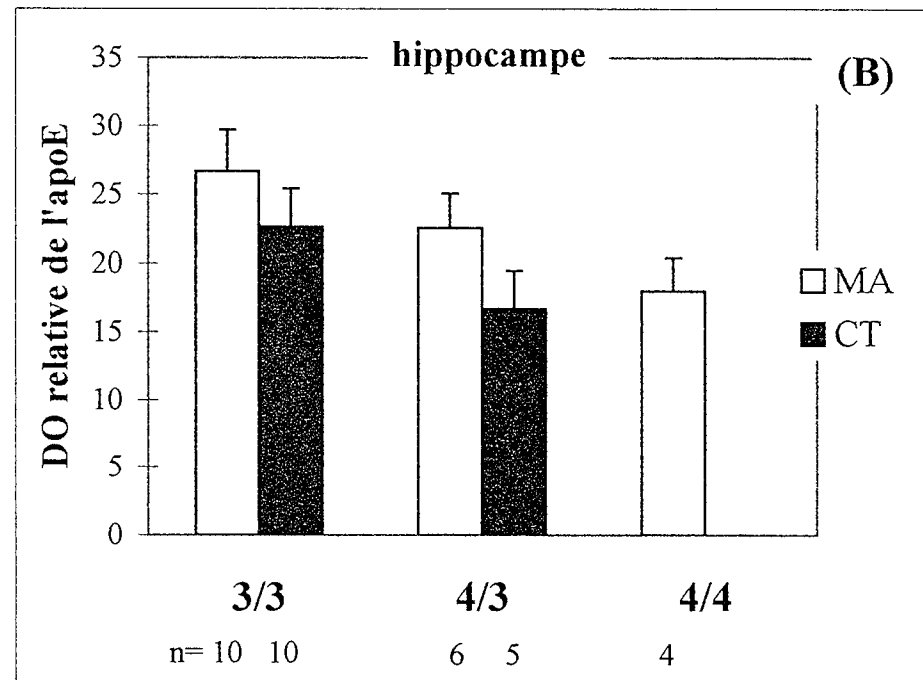
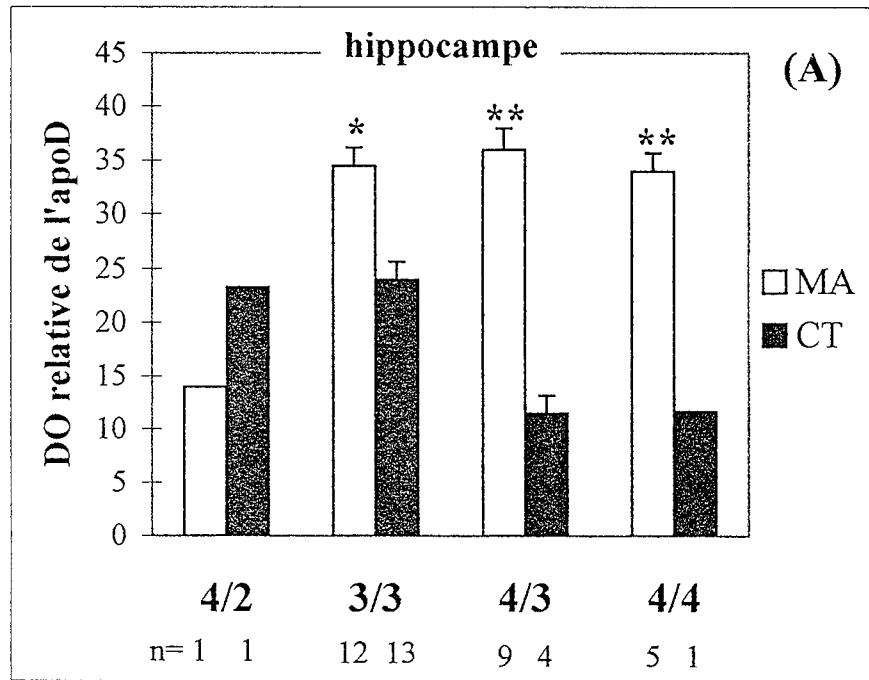


Figure 1

Figure 2





Publication N°10

Sous presse dans *Progrès Récents sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes Apparentés*. Edition SOLAL.

**Génétique de l'apolipoprotéine E et Association avec  
la transthyrétine, l'apolipoprotéine D et l'actine dans  
la maladie d'Alzheimer.**

Merched A., Visvikis S., Serot J.-M., Terrisse L., Rassart E., Siest G.

# GENETIQUE DE L'APOLIPOPROTEINE E ET ASSOCIATION AVEC LA TRANSTHYRETINE, L'APOLIPOPROTEINE D ET L'ACTINE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

A. MERCHED, S. VISVIKIS, J.-M. SEROT, L. TERRISSE, E. RASSART, G. SIEST

## I- RESUME

L'allèle  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E (apoE) est le facteur de risque génétique le plus important de la maladie d'Alzheimer (MA). Des implications spécifiques ont été proposées de l'apoE4 dans la genèse des plaques séniles et des lésions neurofibrillaires en dehors de la remobilisation du cholestérol et la réparation des neurones. Afin de mieux comprendre les trois fonctions différentes de l'apoE4, nous avons étudié dans le liquide céphalorachidien (LCR), trois facteurs pouvant être impliqués dans l'amyloïdogénèse, la réparation neuronale et l'intégrité du cytosquelette qui sont respectivement, la transthyrétine (TTR), l'apoD et l'actine. Nous avons suivi les variations pathologiques de ces trois protéines simultanément à celles de l'apoE dans le LCR des patients atteints de la MA et des contrôles. Nos résultats montrent une augmentation de la concentration d'apoD et E mais une diminution de celle de la TTR en liaison avec la MA. Quant aux effets de l'allèle  $\epsilon 4$ , nous avons constaté des relations dose-dépendantes avec l'augmentation de la concentration de l'apoD, de celle de l'actine et du nombre des plaques séniles. Par ailleurs, la concentration de TTR diminue en relation avec l'abondance des plaques séniles. L'ensemble de nos résultats montrent que l'apoE4 pourrait être impliquée dans une ou plusieurs voies de métabolisme mettant en jeu l'apoD, la TTR et l'actine dans un processus physiopathologique spécifique de la MA.

## II- INTRODUCTION

Le locus du gène de l'apoE code pour 3 allèles communs ( $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  et  $\epsilon_4$ ) qui diffèrent les uns des autres par une substitution d'un ou deux acide(s) aminé(s). Dans le système nerveux central l'apoE est synthétisée principalement par les astrocytes (Pitas et al., 1987). Certains travaux originaux ont montré l'importance de l'apoE dans la croissance, la régénération neuronale et la synaptogénèse (Mahley, 1988, Boyles et al., 1990; Poirier et al., 1994). Ces données sont en faveur d'une implication de l'apoE dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau. Les mécanismes précis pouvant impliquer les dysfonctions de l'apoE dans la MA ne sont pas encore définis. Tandis que certaines études postulent pour un rôle de l'apoE dans la clairance de l'amyloïde (Schmechel et al., 1993, Strittmatter et al., 1993), d'autres suggèrent un rôle dans la protection contre la phosphorylation excessive de la protéine tau (Strittmatter et al., 1994), et dans la plasticité neuronale (Poirier et al., 1994). Toutefois, L'association de l'allèle  $\epsilon_4$  à 64% des cas de MA (Saunders et al., 1993) suggèrent un rôle particulier de cet allèle.

Le LCR contient la majorité des facteurs impliqués dans la formation des plaques amyloïdes et des lésions neurofibrillaires. Parmi ces facteurs se trouvent principalement l'apolipoprotéine (apo) E, la protéine *tau*, le peptide amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ), mais également l'apoD, J, la TTR, l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine. La transthyréine (TTR) séquestre vraisemblablement le peptide  $A\beta$  dans le milieu extracellulaire (Schwarzman et al, 1994), l'apolipoprotéine D (apoD) participe dans la régénération et la réparation neuronale (Boyles et al, 1990) et l'actine, un composant majeur du cytosquelette, impliquée dans la croissance cellulaire, pourrait interagir avec l'apoE (Fleming et al., 1996). Dans des échantillons de LCR, nous avons donc examiné les variations de la concentration des apoEs avec celle de la TTR, de l'apoD et de l'actine évaluée par électrophorèse bidimensionnelle. Nous avons étudié leur état d'équilibre et/ou d'interaction dans ce compartiment en relation avec la MA et en parallèle avec le polymorphisme de l'apoE, le statut mental, les données de l'histopathologie clinique du cerveau.

### III- POPULATION ET METHODES

Les apoD et E ont été mesurées dans les LCR prélevés par ponction lombaire chez 41 patients atteints de MA probable selon les critères de NINCDS-ADRDA, 11 individus n'ayant pas d'atteintes neurologiques et 39 patients ayant diverses atteintes neurologiques périphériques et inflammatoires.

La relation de la TTR et de l'apoE avec les plaques séniles et l'actine a été réalisée chez 20 patients ayant une MA confirmée sur le plan anatomopathologique et 10 patients avec diverses atteintes neurologiques et inflammatoires. En *post mortem*, du LCR intraventriculaire a été prélevé. Une analyse semi-quantitative des plaques séniles a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-A $\beta$  (Dako) (Serot et al., 1994) au niveau des lobes temporal, frontal, pariétal et de l'hippocampe (CA1). L'abondance des plaques séniles a été classée en modérée (+), abondante (++) et très abondante (+++).

Les deux apolipoprotéines ont été mesurées à l'aide des techniques ELISA classiques décrites précédemment (Camato et al., 1989, Merched et al., 1997), la TTR par immunonéphélométrie à l'aide du système Array™ (Beckman). L'étude de l'actine a été réalisée après séparation des protéines de LCR par électrophorèse bidimensionnelle (Visvikis et al., 1986) et des mesures densitométriques quantitatives des deux spots d'actine identifiés par comparaison aux cartes publiées et par révélation immunospécifique à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-actine (Sigma). Le polymorphisme génétique de l'apoE a été déterminé par électrophorèse bidimensionnelle ou par PCR à l'aide de la technique de Hixson et Vernier (1990).

### IV- RESULTATS ET DISCUSSION

#### A- ApoE, ApoD et réparation neuronale

Nous avons d'abord étudié l'ApoD dont l'expression est stimulée comme celle de l'apoE dans les conditions de lésions expérimentales du tissu périphérique (Boyles et al, 1990). Nos résultats montrent que parallèlement à la concentration de l'apoE dans le LCR, celle de l'apoD augmente de façon considérable chez les patients atteints de la MA mais aussi chez les patients atteints d'autres pathologies par rapport au groupe contrôle ( $4.23 \pm 1.58$  et  $3.29 \pm 1.35$  vs  $1.15 \pm 0.70$  mg/l, avec dans



les deux cas  $p < 0.0001$ ) (Fig 1). La concentration de l'apoD est positivement corrélée avec la dose de l'allèle ApoE- $\epsilon 4$  ( $p < 0.001$ ) (Fig 2). Une augmentation de la concentration de l'apoE, bien que moins marquée que celle l'apoD, a été observée chez les patients MA, et les patients « neurologiques » ( $p < 0.001$  et  $p < 0.05$ , respectivement) (Fig 1).

L'augmentation des apoD et E semble être liée aux caractères communs de la MA et des autres pathologies neurologiques et inflammatoires, probablement en réaction aux dommages cellulaires. Ces résultats sont en faveur d'un rôle de coordination des deux protéines dans la réparation et la régénération neuronale. Etant donné l'appartenance de l'apoD à la famille des lipocalines, elle pourrait assurer le transport de ligand(s) hydrophobe(s) essentiel(s) dans les situations pathologiques ou alternativement l'élimination de substance(s) neurotoxique(s). La corrélation positive entre la concentration de l'apoD dans le LCR et la dose de l'allèle  $\epsilon 4$  souligne une interaction probablement de nature métabolique entre les deux marqueurs.

### **B- ApoE, transthyréline et formation des plaques séniles**

Par ailleurs, afin de mieux comprendre le processus de dépôts de l'amyloïde  $\beta$  dans les plaques séniles (PS) au niveau du cerveau, nous avons étudié la contribution potentielle de deux protéines ayant une affinité assez forte vis-à-vis de l'A $\beta$ , l'ApoE et la TTR. Nous avons mesuré leur concentration dans le LCR *postmortem* en tenant compte de l'abondance des dépôts amyloïdes estimée par études immunohistochimiques sur le cerveau des mêmes patients et en sachant que les résultats peuvent varier en fonction des observateurs (Duyckaerts et al., 1990). Nos résultats montrent que la concentration de la TTR, contrairement à celle de l'ApoE, est plus basse dans le LCR des patients atteints de la MA par rapport aux patients ayant ou non d'autres pathologies neurologiques ( $22.21 \pm 1.41$  vs  $36.52 \pm 4.12$  mg/l  $\pm$  SEM,  $p < 0.01$ ) (Fig 3). Elle est également négativement corrélée à l'abondance des PS ( $p < 0.01$ ) (Fig 4). Tandis que le nombre des plaques séniles augmente significativement avec le nombre d'allèle  $\epsilon 4$  ( $p < 0.05$ ). La TTR et l'apoE semblent avoir des effets opposés dans la formation des plaques séniles. Leur affinité au peptide A $\beta$  suggère une relation de compétition entre les deux protéines, avec un rôle protecteur de la TTR et un effet amyloïdogénique de l'apoE4.

### C- ApoE, actine et cytosquelette

Un autre aspect de la physiopathologie de la MA a été abordé via l'étude par électrophorèse bidimensionnelle d'un composant majeur du cytosquelette, l'actine (Fig 5). L'actine a été étudiée dans le LCR, en relation avec la génétique de l'apoE. De plus en plus d'arguments sont en faveur d'un rôle important de l'apoE dans la biochimie du cytosquelette grâce à ses affinités différentielles vis-à-vis de plusieurs composants de celui-ci, comme la protéine *tau*, l'actine et la protéine *MAP2* (Fleming et al, 1996). Nos résultats montrent une augmentation de l'actine en relation avec la dose de l'allèle  $\epsilon 4$  ( $p < 0.05$ ) (Fig 6) Ces résultats suggèrent que l'apoE4 pourrait moduler et réguler la plasticité du cytosquelette via des interactions directes avec les composants du cytosquelette.

En résumé, l'ensemble de ce travail montre les résultats suivants :

(i) la présence de l'allèle  $\epsilon 4$  , la diminution de la concentration de la TTR semblent être les conditions les plus favorables à la formation des plaques séniles. Ces fonctions pourraient être dues à un mécanisme de compétition entre les deux facteurs vis à vis du peptide A $\beta$  ou à une implication dans le métabolisme anormale de ce peptide, (ii) les deux apolipoprotéines D et E sont importantes dans les maladies neurodégénératives telle que la MA probablement au niveau de la remobilisation de cholestérol et la réparation neuronale. Toutefois, la présence de l'allèle  $\epsilon 4$  semble inhiber ou ralentir cette remobilisation et pourrait compromettre par conséquence la régénération cellulaire, (iii) L'apoE semble intervenir activement au niveau de la biochimie du cytosquelette. L'isoforme  $\epsilon 4$  pourrait avoir une contribution négative à la stabilité du cytosquelette à travers l'actine, et finalement (iv) l'actine pourrait servir comme marqueur du cytosquelette dans la MA. Sa polymérisation semble être négativement régulée par l'apoE4. Cette régulation pourrait s'exercer de manière directe ou indirecte.

Ces résultats montrent que l'apolipoprotéine E4 pourrait être impliquée dans une ou plusieurs voies de corrélation particulière(s) mettant en jeu l'apoD, la TTR, l'actine et probablement d'autres dans un processus physiopathologique spécifique de la MA. L'élucidation des bases moléculaires de la maladie d'Alzheimer et la définition de bons marqueurs seront utiles sur le plan étiopathologique mais également pour le suivi thérapeutique de cette maladie.

**VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- BOYLES J.K., NOTTERPEK L.M., ANDERSON L.J. *J Biol Chem*, 1990, 254: 17805-17815.
- CAMATO R., MARCEL Y., MILNE R., LUSSIER-CACAN S., WEECH P. *J Lipid Res*, 1989, 30: 865-875.
- DUYCKAERTS C., DELAERE P., HAUW J.J., ABBAMONDI-PINTO A.L., SORBI S., et al. *J Neurol Sci* 1990, 97(2-3) : 295-323.
- FLEMING L.H., WEISGRABER K.H., STRITTMATTER W.J., TRONCOSO J.C., JOHSON G.N.W. *Exp Neurol*, 1996, 138: 252-260.
- HIXSON J. E., VERNIER D.T. *J Lipid Res*, 1990, 31: 545-548.
- MAHLEY R. W. *Science*, 1988, 240 : 622-630.
- MERCHED A., BLAIN H., VISVIKIS S., HERBETH B., JEANDEL C., SIEST G. *J Neurol Sci*, 1997, 145: 33-39.
- PITAS R.E., BOYLES J.K., LEE S.H., HUI D., WEISGRABER K.H. *J Biol Chem*, 1987, 262: 14352-14360.
- POIRIER J., BACCICHET A., DEA D., GAUTHIER S. *Neuroscience*, 1993, 55(1): 81-90.
- ROSES A.D., EINSTEIN G., GILBERT J., GOEDERT M., et al, *Ann NY Acad Sci USA*, 1996, 777: 147-157.
- SCHMELCHEL D.E., SAUDERS A.M., STRITTMATTER W.J. et al. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90: 9649-9653.
- SCHWARZMAN A.L., GREGORI L., VITEK M.P., LYUBSKI S., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 8368-8372.
- SEROT J.M, BÉNÉ M. C., FAURE G.C. *Hum Pathol*, 1994, 25 : 1185-1190.
- STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., GOEDERT M. et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(23):11183-11186 .
- STRITTMATTER W.J., SAUNDERS A.M., SCHMECHEL D., PERIKAK-VANCE M.A., ROSES A.D. *Proc Natl. Acad Sci. U.S.A.* 1993, 90: 1977-1981.
- VISVIKIS S., STEINMEITZ J., CUVELIER I., GALTEAU M. M., SIEST G. In *Recent Progresses in Two -Dimentional Electrophoresis* (Galteau M. M., and Siest G., eds), 1986, pp. 159-165. Presses Universitaires/ Nancy, France.

Fig. 1. Variation de la concentration des Apo D et E dans le LCR des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), des contrôles et des patients atteints d'autres pathologies neurologiques et inflammatoires que la MA (AP). Les bars représentent les moyennes  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  .

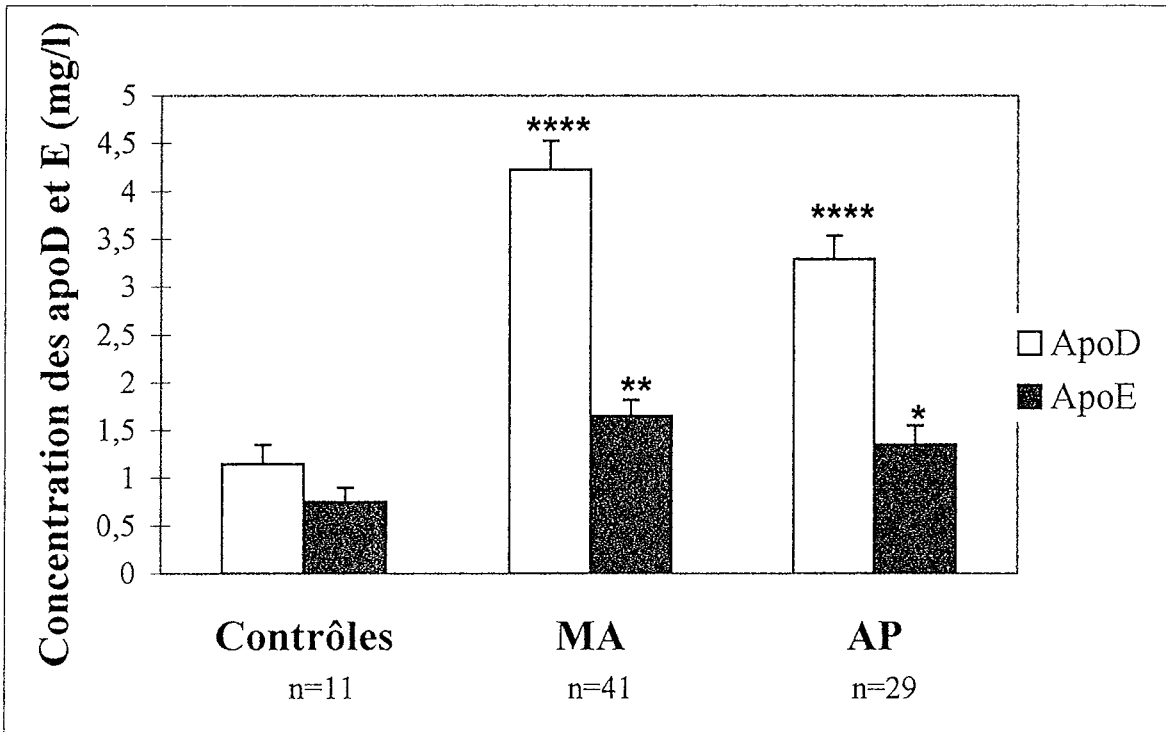
Fig. 2. Variation de la concentration de l'ApoD (A) et l'ApoE (B) dans le LCR des patients en fonction du nombre d'allèle  $\epsilon 4$ . \*\*\* :  $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  .

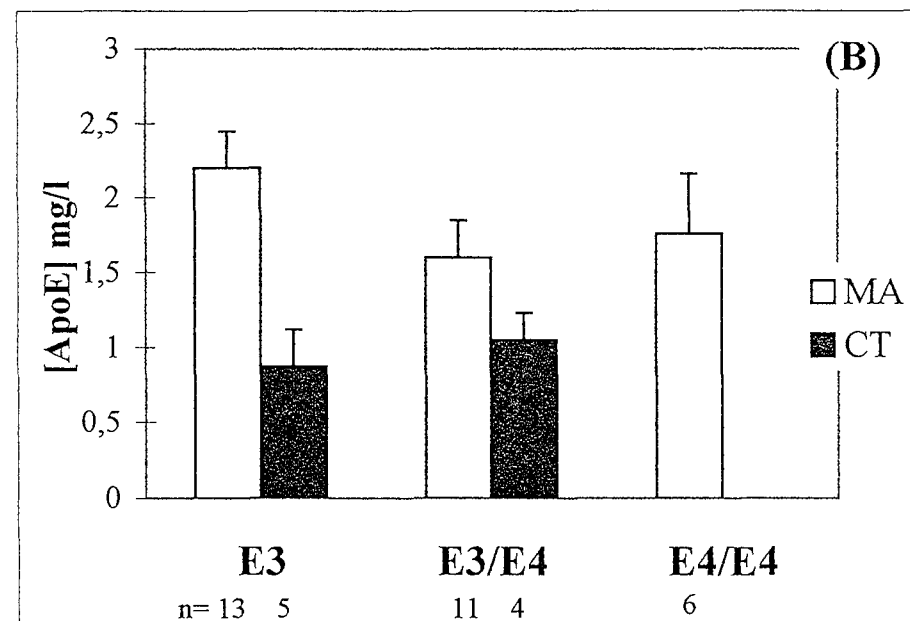
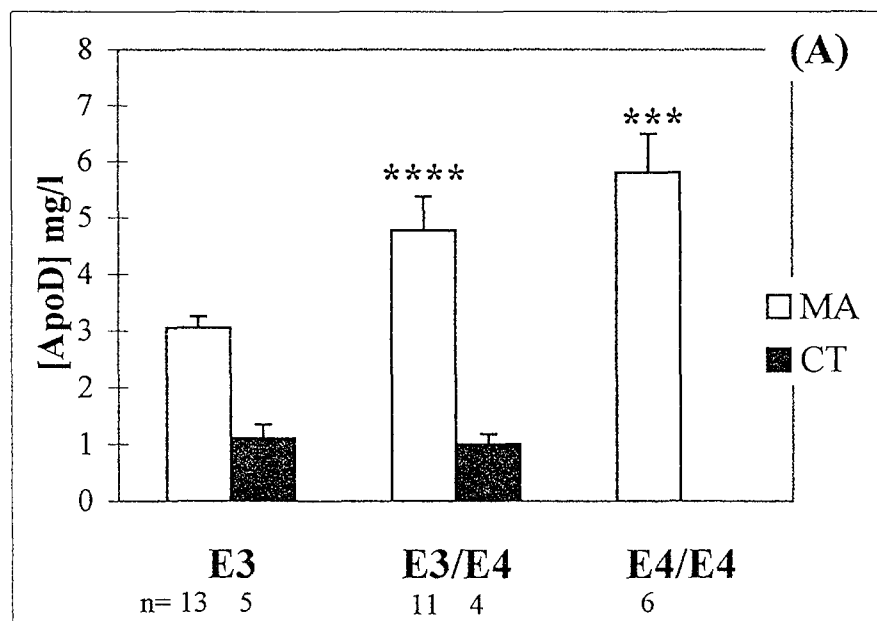
Fig 3. Concentration de la transthyréline dans le LCR intraventriculaire des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) et d'autre pathologies neurologiques et inflammatoires (contrôles) . \*\* :  $p < 0.01$

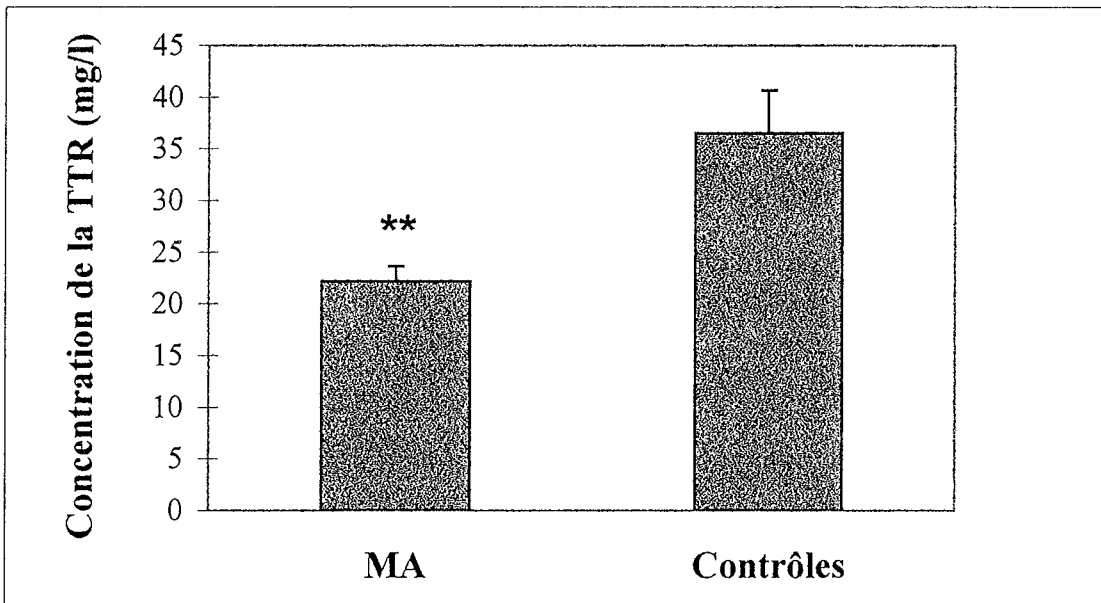
Fig. 4. Relation entre les concentrations moyennes de l'apoE et la TTR dans le LCR intraventriculaire et l'abondance des plaques séniles dans le cerveau des mêmes patients. L'évolution de la fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  est présentée en pointillé. (+) abondance moyenne, (++) abondant, (+++) très abondant. \*  $p < 0.05$ .

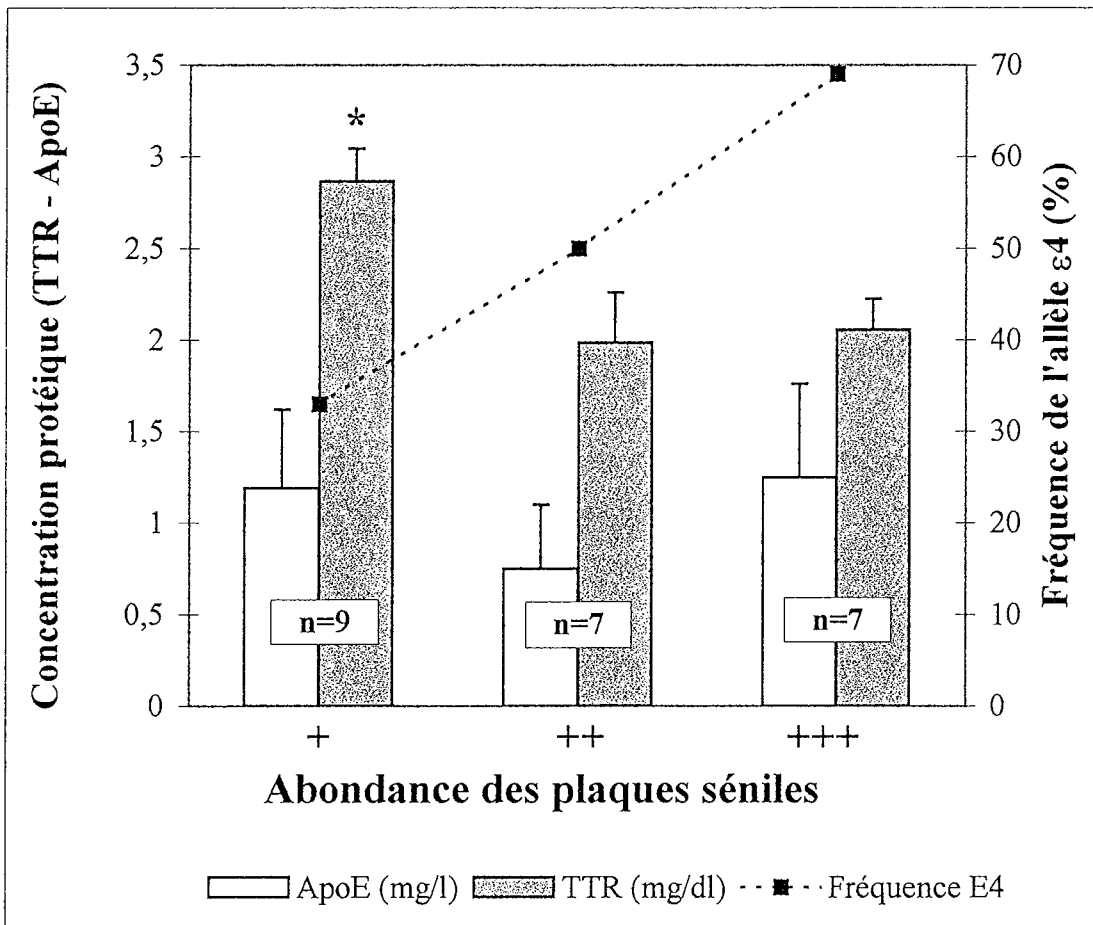
Fig. 5. Profil électrophorétique bidimensionnel des protéines de LCR colorées au nitrate d'argent (A). A droite sont présentés un agrandissement de la région d'actine (B) et une révélation immunospécifique de l'actine à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-actine (Sigma). PM ; marqueur de poids moléculaire.

Fig. 6. Variation de la quantité d'actine dans le LCR intraventriculaire des patients atteints de la MA en fonction du nombre d'allèle  $\epsilon 4$ . \* $p < 0.05$ .

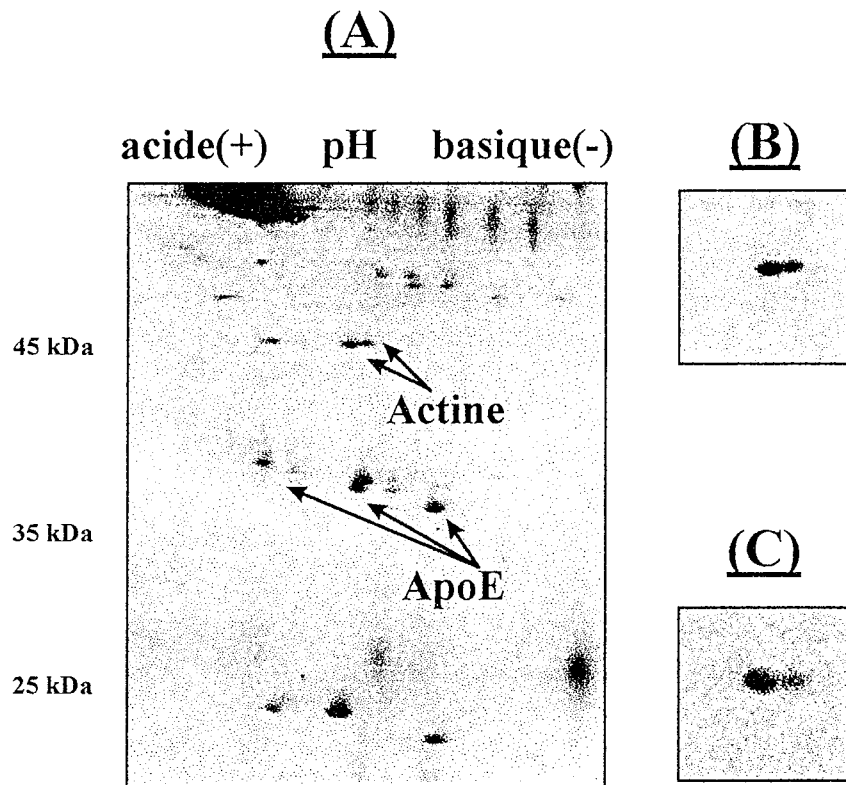


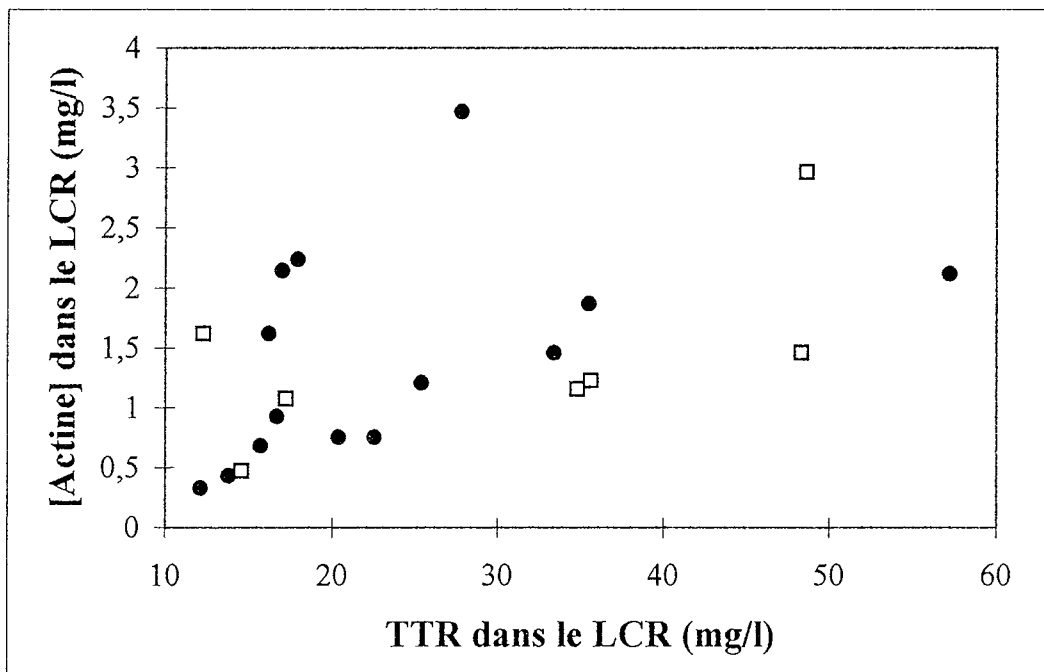












**Nom, Prénom :** M E R C H E D Aksam

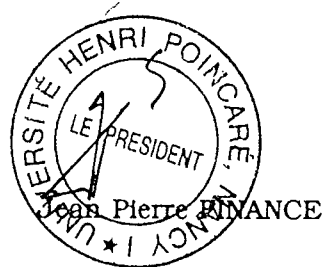
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1  
en Biologie et Santé

**VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER**

Nancy, le 10 MAR 1998 <sup>0</sup> 15

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



## RESUME

La maladie d'Alzheimer (MA) est un problème de santé majeur dans une société qui vieillit de plus en plus. Malgré les progrès importants dans ce domaine, il subsiste beaucoup d'inconnus au niveau physiopathologique. L'incertitude du diagnostic et le manque de marqueurs périphériques précoces posent des problèmes à la recherche thérapeutique qui connaît actuellement un grand essor.

La combinaison de dosages biochimiques dans le liquide céphalorachidien (LCR), d'approches épidémiologiques et d'études immunohistochimiques du cerveau, est notre stratégie pour suivre *in vivo* les modifications biochimiques liées à la génétique qui provoquent ou accompagnent l'apparition de la MA. La recherche des marqueurs biologiques de cette maladie est, en effet, un objectif en soi.

Nous avons évalué dans le LCR les variations quantitatives et qualitatives de l'apoE, le facteur de risque génétique le plus important de la MA. En parallèle, d'autres protéines telles que les apoAI, AIV et D, la transthyréline (TTR), et l'actine ont été analysées dans la mesure où elles pourraient participer, avec l'apoE, au mécanisme physiopathologique de la MA. Ces études nous ont permis de mieux comprendre l'implication multifonctionnelle de l'apoE et d'évaluer les critères cliniques et méthodologiques de ses variations quantitatives dans le LCR.

Nous avons également mis en évidence une augmentation de 300% de l'apoD dans le LCR avec les pathologies neurogénéralives et inflammatoires. La spécificité et la sensibilité de ce nouveau marqueur sont de 95% et 91%, respectivement.

Nous avons montré la présence de l'apoAI dans les plaques séniles et trouvé une diminution de la concentration sérique de l'apoAI dans la MA liée à la sévérité de cette maladie. Nous avons également défini l'intérêt clinique de cette protéine périphérique comme marqueur potentiel de diagnostic de la MA.

Deux nouveaux marqueurs, la TTR et l'actine sont impliqués dans la protection contre l'amyloïdogénèse et dans la biochimie du cytoquelette neuronal, respectivement. A travers l'étude de ces deux protéines, nous avons proposé de nouvelles hypothèses étiologiques de la MA.

Au niveau génétique, l'étude du polymorphisme de l'apoAIV (codon 360) a révélé un nouveau gène pouvant être impliqué dans la longévité et non dans la MA.

En résumé, nous avons évalué des marqueurs génétiques et biochimiques de la maladie d'Alzheimer en utilisant les liquides biologiques périphériques : LCR, sérum et cellules sanguines.

**Mots clés :** *maladie d'Alzheimer ; liquide céphalorachidien ; apolipoprotéines AI, AIV, D et E ; transthyréline ; actine ; immunohistochimie ; génétique ; marqueur ; diagnostic ; étiologie.*