



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Ecole Doctorale : Sciences Technologie Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Médecine

Spécialité : Médecine Interne, Gériatrie et Biologie du Vieillissement

présentée et soutenue publiquement

par

le Docteur Abd-El-Rachid MAHMOUDI

le 02 Juin 2015

Titre

**ETUDE GENOTYPIQUE ET PHENOTYPIQUE DES POLYMORPHISMES DU
RECEPTEUR DU COMPLEMENT DE TYPE 1 (CR1, CD35) DANS LA MALADIE
D'ALZHEIMER**

Jury :

Pr. Jacques COHEN	Reims	Examineur
Pr. Caroline HOMMET	Tours	Rapporteur
Pr. Damien JOLLY	Reims	Président
Pr. Fatémeh NOURHASHEMI	Toulouse	Rapporteur
Pr. Jean Luc NOVELLA	Reims	Invité

N° attribué par la bibliothèque

|| R | E | I | | | | |

Remerciements

A nos directeurs de thèse

A Monsieur le Professeur Jean-Luc NOVELLA

Professeur de Gériatrie,

Praticien Hospitalier – Responsable de Structure Interne Service de Gériatrie Aigue et Médecin Interne – Chef du pôle Autonomie-Santé – CHU de Reims

Je te remercie pour tes précieux conseils, tu m’as guidé. Je t’ai fait confiance et ne le regrette pas. De notre collaboration est née une « amitié ». Ces années passées à tes côtés ont été riches d’apprentissage. C’est avec un profond respect que je témoigne de ton écoute attentive, ton dynamisme et ton dévouement.

Pour tout ce que tu m’as appris et apporté, tous mes remerciements sont bien peu de choses. Je te prie de trouver cher Jean Luc, le témoignage de ma très grande gratitude.

A Monsieur le Professeur Jacques COHEN

Professeur d’Immunologie,

Praticien Hospitalier – Responsable de Structure Interne Laboratoire d’Immunologie – CHU de Reims

Je vous remercie de m’avoir fait confiance en acceptant d’encadrer cette thèse et de m’accueillir au sein du laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Dysimmunitaire Humaine que vous dirigez. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et gratitude. Merci pour vos précieux conseils, votre disponibilité et votre suivi très actif pour la réalisation de ce travail. Vous avez su me transmettre votre passion pour cette thématique.

A nos juges,

A Monsieur le Professeur Athanase BENETOS

Professeur de Gériatrie,

Praticien Hospitalier – Responsable de Structure Interne Service de Gériatrie – CHU de Nancy

C’est avec un profond respect et une grande joie que je vous compte parmi mes juges. Je reste très admiratif devant vos compétences et nombreux travaux scientifiques. Votre opinion est pour moi d’une très grande valeur.

A Madame la Professeure Caroline HOMMET

Professeure de Gériatrie,

Praticien Hospitalier – Service de Médecine Interne Gériatrique – CHU de Tours

Vous nous faites l’honneur de juger ce travail. Merci pour l’intérêt que vous avez manifesté pour ce travail en acceptant d’être rapporteur. Veuillez accepter l’expression de notre profonde gratitude et profond respect.

A Monsieur le Professeur Damien JOLLY

Professeur d'épidémiologie, d'économie de la santé et prévention,
Praticien Hospitalier – Responsable de l'Unité de coordination de la recherche clinique –
CHU de Reims

En 2007, vous m'avez ouvert les portes de l'EA 3797. Vous avez guidé mes premiers pas dans la recherche et veillé à ce que ce travail se déroule dans des bonnes conditions. Aujourd'hui, c'est avec un profond respect que je témoigne de votre écoute attentive et de votre bienveillance. Je tiens à vous exprimer ma gratitude et profond respect.

A Madame la Professeure Fatémeh NOURHASHEMI

Professeure de Gériatrie,
Praticien Hospitalier – Service de Médecine Interne et Gériatrie Clinique – CHU de
Toulouse

Merci de nous avoir fait l'honneur de juger ce travail. Vos enseignements au Master 2 (Biologie du vieillissement) m'ont permis d'apprécier vos qualités scientifiques. Veuillez trouver ici le témoignage de tout mon respect et de ma reconnaissance.

Je tenais également à remercier :

Tous les patients et volontaires ayant participé à cette étude.

Le Professeur François Blanchard qui m'a accueilli en 2006. Je reste très admiratif devant votre attitude humaine et éthique envers les patients.

La Professeure Bach-Nga PHAM, pour votre aide et votre bienveillance. Votre rigueur scientifique et vos qualités humaines m'ont particulièrement marqué. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde admiration et gratitude.

Le Docteur Béatrice DONVITO-GAY qui m'a accompagné dans la conception du projet, le Docteur Moustapha DRAME de l'Unité d'Aide Méthodologique pour son aide dans la réalisation des statistiques, sa patience et ses conseils.

Mes collègues du service de Gériatrie aigue et Médecine Interne du CHU de Reims, en particulier le Docteur Laurie Anne BERTHOLON, le Docteur Sébastien COLAS, le Docteur Isabella MORRONE, les infirmières et Mme Nathalie KONZOLIC. Je remercie également le personnel du laboratoire d'immunologie et de la PRBI en particulier Madame Valérie DURET, Madame Brigitte REVEIL et Monsieur Aymric KISSERLI. Enfin, je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé à accomplir ce travail dans les meilleures conditions, puissent-elles trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

Dédicaces

A Camille, avec tout mon amour, pour ton soutien, la joie et le bonheur que tu m'apportes au quotidien.

A mes Parents, mes Sœurs, Neveux et Nièces, vous m'avez donné la force de continuer dans les moments difficiles, veuillez trouver ici le témoignage de mon affection.

Résumé

Les études d'association pangénomiques ont permis d'identifier de nouveaux loci, dont le gène *CR1* comme associé au risque de maladie d'Alzheimer (MA). Le récepteur du complément de type 1 (CR1) est une glycoprotéine transmembranaire, présente notamment à la surface des érythrocytes (CR1E), mais également dans le plasma sous forme soluble (CR1s). Le CR1 peut prendre des formes fonctionnelles différentes, qui pourraient conférer des niveaux de risque différents, voire suggérer des mécanismes physiopathologiques de la MA. Si la relation entre *CR1* et MA est aujourd'hui connue, son mécanisme reste énigmatique.

L'objectif principal de cette thèse était de corrélér aux données génétiques (single nucleotide polymorphisms, polymorphismes de longueur, polymorphismes de densité), des éléments phénotypiques acquis comme la densité du CR1E ou le CR1S. D'une part, notre étude a montré grâce à deux méthodes différentes, que la MA était associée à une densité basse de l'isoforme long de CR1 (CR1*2) et suggérait l'existence d'allèle silencieux de *CR1*. D'autre part, nous avons montré que même si les critères génétiques étaient respectés, certains phénotypes pourraient être acquis au cours de la maladie. Nos résultats suggèrent que la MA résulterait plus d'une insuffisance d'épuration des dépôts amyloïdes, que d'une réponse excessive dont la réaction inflammatoire serait délétère. Bien que cette recherche génotypique et phénotypique, à potentiel physiopathologique, nécessite des investigations à plus grande échelle, elle pourra ouvrir la voie à des nouvelles pistes thérapeutiques qui ne peuvent être envisagées aujourd'hui faute de vue claire du ou des mécanismes en cause.

Mots clés

Maladie d'Alzheimer, Récepteur du complément type I, Complément, Risque génétique, Polymorphisme de longueur, Polymorphisme de densité, Single nucleotide polymorphisms, Inflammation, Plaques amyloïdes, Démence, Physiopathologie, Génotypes, Phénotypes.

Abstract

Genome-wide association studies have identified new loci, including the *CR1* gene, as being associated with Alzheimer's disease (AD) risk. The complement receptor type 1 (CR1) is a transmembrane glycoprotein found on the surface of erythrocytes (CR1E), and also in the plasma in soluble form (CR1s). CR1 can have different functional forms that may confer different risk levels, or even suggest pathophysiological mechanisms of AD. Indeed, the relation between *CR1* and AD is now well established, the mechanism of this association remains to be elucidated.

The main objective of this thesis was to correlate acquired phenotype elements, such as density of CR1E (number of CR1 antigenic sites per erythrocyte) or CR1s with genetic data (single nucleotide polymorphisms, length and density polymorphisms). Firstly, our study showed using two different methods that AD is associated with low density of the long CR1 isoform (CR1*2) and suggested the possible existence of silent *CR1* alleles. Secondly, we showed that although genetic criteria were met, some phenotypes could be acquired during the course of the disease. Our findings suggest that AD stems more from insufficient clearance of amyloid deposits than from excessive response whose inflammatory reaction might be deleterious. Although this genetic and phenotypic study with pathophysiological potential still require further investigation on a larger scale, she could pave the way towards new therapeutic avenues that currently remain elusive in the absence of a clear overview of the mechanisms involved.

Keywords

Alzheimer's disease, Complement receptor type I, Complement, Genetic risk, Length polymorphisms, Density polymorphisms, Single nucleotide polymorphisms, inflammation, Amyloid plaque, Dementia, Pathophysiology, Phenotypes, Genotypes.

Table des matières

Abréviations	13
Introduction	15
PREMIERE PARTIE - Approche théorique.....	21
Chapitre I – Historique de la démence et de la maladie d’Alzheimer.....	22
I. Vieillissement - démence.....	22
II. La Maladie d’Alzheimer	23
Chapitre II – Epidémiologie de la maladie d’Alzheimer	28
I. Prévalence de la démence et de la maladie d’Alzheimer	28
II. Incidence de la démence et de la maladie d’Alzheimer	30
III. Evolutions épidémiologiques de la démence et de la maladie d’Alzheimer.....	31
IV. Facteurs de risque.....	33
1. Facteurs de risque environnementaux ou acquis.....	33
2. Facteurs de risque génétiques.....	34
V. Facteurs protecteurs.....	34
Chapitre III – Diagnostic de la maladie d’Alzheimer	37
I. Critères de définition de la maladie d’Alzheimer	37
II. Limites des anciens critères de définition de la maladie d’Alzheimer.....	38
III. Nouveaux critères de définition de la MA	39
IV. Recommandations pour le diagnostic de la MA	42
1. L’interrogatoire	42
2. Examen clinique.....	43
3. Evaluation fonctionnelle	43
4. L’évaluation cognitive globale.....	44
5. Evaluation psychique et comportementale.....	44
6. Evaluation neuropsychologique	45
7. Examens paracliniques.....	45
a. Examens biologiques.....	45
b. Imagerie morphologique	46
c. Imagerie fonctionnelle.....	46

d. Analyse du Liquide Céphalo Rachidien (LCR)	46
e. Electroencéphalogramme (EEG).....	47
f. Etude génétique	47
g. La Biopsie cérébrale.....	47
Chapitre IV – Génétique de la maladie d’Alzheimer et Hypothèses Physiopathologiques	
.....	48
I. MA à début précoce (forme familiale).....	49
1. Gène précurseur du peptide amyloïde (<i>APP</i>).....	49
2. Gène de la préséniline 1 (<i>PSEN1</i>)	50
3. Gène de la préséniline 2 (<i>PSEN2</i>)	50
4. Hypothèse physiopathologique ou hypothèse de la cascade amyloïde	51
II. La MA à début tardif (forme sporadique)	52
1. Gène de l’Apolipoprotéine E (<i>APOE</i>).....	52
2. Gène de la clustérine (<i>CLU</i>).....	54
3. Gène Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (<i>PICALM</i>).....	55
4. Gène Bridging integrator (<i>BIN1</i>).....	56
5. Gène Sortilin-related receptor L (<i>SORL1</i>)	57
6. Gène ATP-binding cassette, sub-family A transporter A7 (<i>ABCA7</i>).....	57
7. Gène récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes 2 (<i>TREM2</i>). 58	
8. Gène Siglec 3 (<i>CD33</i>)	59
9. <i>MS4A</i> (Membrane-Spanning 4-domains sub family A).....	60
10. Gène Ephrin type-A receptor 1 (<i>EPHA1</i>)	60
11. Gène CD2-Associated protein (<i>CD2AP</i>).....	61
12. Gène Phospholipase D family, member 3 (<i>PLD3</i>).....	61
13. Gène ADAM Metallopeptidase domain 10 (<i>ADAM10</i>).....	62
14. Autres gènes (<i>CASS4</i> , <i>HLA-DRB5-DRB1</i> , <i>INPP5D</i> , <i>PTK2B</i> , <i>MEF2C</i> , <i>CELF1</i> , <i>NME8</i> , <i>EXOC3L2</i> , <i>DSG2</i> , <i>FERMT2</i> , <i>SLC24H4-RIN3</i> , <i>ZCWPW1</i>)	62
15. Le gène <i>CRI</i>	63
Chapitre V – Le gène <i>CRI</i>	65
I. Localisation	65
II. Structure du gène <i>CRI</i>	65
III. Gène <i>CRI</i> et maladie d’Alzheimer.....	67
IV. Implication du gène <i>CRI</i> dans la pathogénèse de la MA.....	71

Chapitre VI – Le système du complément	73
I. Les voies d'activation du complément	73
1. La voie classique	73
2. La voie des lectines	74
3. La voie alterne	74
II. Les voies effectrices du système du complément	75
1. La voie d'amplification	75
2. La voie finale commune	76
III. Régulation de la voie du complément	76
IV. Complément et inflammation	77
Chapitre VII – La protéine CR1	79
I. Historique	79
II. Répartition cellulaire	79
III. Structure protéique et polymorphismes de CR1	80
1. Polymorphisme de longueur (polymorphisme allotypique ou de structure)	80
2. Polymorphisme de densité	84
a. Régulation génétique de la densité du CR1 Erythrocytaire	84
b. Régulation physiologique de la densité du CR1 Erythrocytaire	86
3. Polymorphisme du groupe sanguin Knops	86
IV. Fonctions du CR1	86
1. Inactivation des voies classique et alterne du complément	86
2. Capture et fixation des complexes immuns	87
3. Transport et clairance des complexes immuns	88
4. Rôle du CR1 dans l'immunité adaptative	88
V. Le CR1 soluble (CR1S)	89
1. Historique et distribution	89
2. Origine	90
3. Fonctions	90
VI. Rôle potentiel de CR1 dans la pathogénèse de la maladie D'Alzheimer	90
1. Hypothèse de la voie amyloïde	90
a. Au niveau périphérique	91
b. Au niveau cérébral	91
2. Hypothèse de la neuroinflammation	92

3. Hypothèse de la voie Tau	93
DEUXIEME PARTIE – Projet de Recherche	95
Chapitre I – Hypothèses et objectifs	96
Chapitre II – Méthodes	97
I. Population de l'étude	97
1. Critères d'inclusion	97
2. Critères de non inclusion	97
3. Variables recueillies	98
4. Plan d'investigation	100
5. Critères de jugement	101
6. Considérations éthiques	101
II. Etude des SNPs	101
1. Amplification de rs6656401, rs113531714 et rs112003429	101
2. Amplification de rs3818361	102
3. Amplification du SCR 24-25	102
4. Pyroséquençage	103
III. Etude des polymorphismes de longueur de CR1	104
1. Etude des polymorphismes de longueur au niveau de la protéine	104
a. Anticorps monoclonaux anti-CR1	104
b. Extraction des protéines membranaires érythrocytaire et Western Blot	106
2. Etude des polymorphismes de longueur de CR1 au niveau du gène	107
a. Détermination des polymorphismes de longueur de CR1 par HRM (High Resolution Melting ou fusion à haute résolution)	107
IV. Etude des polymorphismes de densité de CR1	108
1. Etude des polymorphismes de densité de CR1 au niveau de la protéine	108
a. Immunomarquage du CR1 érythrocytaire et lecture par cytométrie en flux	108
2. Etude des polymorphismes de densité de CR1 au niveau du gène	111
a. Extraction de l'ADN	111
b. Détermination du polymorphisme <i>HindIII</i> de l'intron 27 du gène CR1 par PCR RFLP	111
c. Détermination du polymorphisme Q981H de l'exon 19 du gène CR1 par pyroséquençage	112
V. Etude du CR1 soluble sérique par ELISA	114
	10

VI. Analyses Statistiques.....	115
Chapitre III – Résultats	116
I. Caractéristiques sociodémographiques et cliniques.....	116
II. Etude des polymorphismes de longueur de CR1	118
1. Etude des polymorphismes de longueur de CR1 au niveau de la protéine par Western blot (données phénotypiques)	118
2. Etude des polymorphismes de longueur de CR1 au niveau du gène par HRM (données moléculaires).....	121
3. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés au niveau du gène par HRM et au niveau de la protéine par WB	122
4. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 et SNPs	126
a. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 et rs6656401	126
b. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 et rs3818361	127
c. Association entre polymorphismes de longueur et rs113531714, rs112003429, SCR24-25	128
III. Etude du polymorphisme de densité de CR1	132
1. Nombre de sites antigéniques (phénotype) par cytométrie en flux	132
2. Etude de la densité de CR1 selon les polymorphismes de longueur observés en WB	133
a. Etude de la densité de CR1 chez les sujets exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2.....	136
b. Etude de la densité de CR1 chez les sujets CR1*1 CR1*2 en utilisant d'autres anticorps	140
3. Etude des polymorphismes de densité de CR1 au niveau du gène (densité génotypique).....	142
a. Etude de la densité génotypique pour <i>HindIII</i> et Q981H.....	142
b. Etude de la concordance entre polymorphismes de densité <i>HindIII</i> et Q981H (génotype).....	145
4. Etude du nombre de sites antigéniques de CR1 (phénotype) selon les polymorphismes de densité (génotype).....	147
a. Etude du nombre de sites antigéniques de CR1 (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site <i>HindIII</i> (génotype)	147

b. Etude du nombre de sites antigéniques de CR1 (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype)	149
c. Comparaison entre cas et témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site <i>HindIII</i> (génotype).....	151
d. Comparaison entre cas et témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype).....	152
IV. Association entre polymorphismes de longueur et polymorphismes de densité....	154
1. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB (protéine) et polymorphismes de densité pour les sites <i>HindIII</i> et Q981H (gène)	154
2. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par HRM (gène) et polymorphismes de densité pour les sites <i>HindIII</i> et Q981H (gène)	154
V. Etude du CR1 soluble sérique par ELISA.....	157
1. Taux du CR1 soluble sérique selon les polymorphismes de longueur de CR1.....	158
2. Taux du CR1 soluble sérique selon les polymorphismes de densité de CR1	160
a. Etude du CR1 soluble sérique selon les polymorphismes de densité pour le site <i>HindIII</i> et Q981H (génotype).....	160
b. Comparaison entre cas et témoins du taux du CR1 soluble selon les polymorphismes de densité pour le site <i>HindIII</i> (génotype).....	164
c. Comparaison entre cas et témoins du taux de CR1 soluble selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype)	164
3. Corrélation entre taux du CR1 soluble et nombre de sites antigéniques de CR1 (densité).....	165
4. Corrélation entre taux du CR1 soluble et score au MMSE	165
VII. Etude des facteurs associés à la MA (analyse multivariée)	166
Article 1	169
Brevet.....	186
Discussion générale	215
Conclusion et Perspectives.....	227
Bibliographie.....	232

Abréviations

A β : Peptide amyloïde β

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BET : Bromure d'Ethidium

BSA : Bovine serum Albumin ou Albumine sérique Bovine

C4bp : C4 binding protein ou protéine fixant le C4

CAM : Complexe d'attaque membranaire

CCP : Complement Control Protein

CMF : Cytométrie en flux

CR1 : Récepteur pour le C3b/C4b, CD35

CR1 : gène codant le CR1

CR1/E : Densité de CR1 par érythrocyte

CR1S : CR1 Soluble

CR2 : Récepteur pour le C3d

DAF : Decay Accelerating Factor, CD35

DFT : Démence Fronto-Temporale

DCL : Démence à corps de Lewy

dNTP : déoxynucleotide triphosphates

EDTA : EthyleneDiamine Tetraacetic Acid, ou Acide éthylène-diamine-tétra-acétique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

HRM : High Resolution Melting ou fusion à haute résolution

IL : Interleukine

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LCR : Low-Copy Repeats

LES : Lupus Erythémateux Systémique

LHR : Long Homologous Repeat

MA : Maladie d'Alzheimer
 MASP : Mannan-Associated Serine Protease
 MCP : Membrane Cofactor Protein, CD46
 MBL : Lectine spécifique des résidus mannanes, « *Mannan Binding Lectin* »
 MCP : « *Membrane Cofactor Protein* », CD46
 MCI : Mild cognitive impairment
 MEM : Milieu Essentiel Minimum
 PAGE-SDS : élektrophorèse en gel polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
 PBS : Phosphate Buffer-Saline ou tampon phosphate salin
 PET-Scan : Positron Emission Tomography
 PCR : Polymerase Chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
 PCR-RFLP : Polymérase chain reaction- Restriction fragment length polymorphism ou réaction de polymérisation en chaîne- polymorphismes de longueur des fragments de restriction
 PLC : Phospholipase C
 PVDF : PolyVinylidene Fluoride
 RCA : Regulator of Complement Activation, Locus regroupant les gènes codant des régulateurs de l'activation du complément
 rCR1s : CR1 soluble recombinant
 SAB : Sérum Albumine Bovine
 SCR : Short Consensus Repeat
 SNP : Single Nucleotide Polymorphism
 SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography
 Tau : Tubulin Associated Unit
 TBE : Tris Borate EDTA
 TEP : Tomographie par Emissions de Positons
 TEMP : Tomographie par Emission Monophotonique
 TNF : Tumor Necrosis Factor
 WB : Western Blot

Introduction

Considérée à tort et pendant longtemps comme un effet du vieillissement, la maladie d'Alzheimer (MA) est aujourd'hui reconnue comme une entité pathologique. De par sa prévalence croissante, elle représente un enjeu majeur de santé publique et un réel défi médico-économique. En effet, à l'échelle mondiale le nombre de cas est estimé à 35,6 millions avec près de 4,6 millions de nouveaux cas par an, et ce chiffre va doubler en 2030 puis tripler en 2050 (Jiang et *al.*, 2013a). En France, les estimations, probablement sous-évaluées, montrent qu'il y aurait plus de 850 000 cas de démences avérées dont 70 % seraient des cas de MA chez les sujets âgés de plus de 65 ans, avec quasiment trois fois plus de femmes que d'hommes. Par ailleurs, les prévisions actuelles prévoient un doublement du nombre de personnes atteintes de MA d'ici 20 ans si l'augmentation de l'espérance de vie se poursuit au même rythme qu'aujourd'hui (Ferri et *al.*, 2005).

La MA est une maladie neurodégénérative évolutive s'exprimant principalement par des troubles mnésiques et/ou une atteinte des autres fonctions cognitives (langage, praxies, gnosies, fonctions exécutives), parfois associés à des troubles du comportement, évoluant vers une perte progressive d'autonomie, caractérisant un syndrome démentiel. C'est la cause la plus fréquente de démence (Alzheimer's Disease International, 2013). Son diagnostic repose essentiellement sur les critères du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-V) (American Psychiatric Association, 2013) et du NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) (McKhann et *al.*, 1984). Les premiers critères permettent le diagnostic de démence et les seconds de poser le diagnostic de MA en maladie possible, probable ou certaine (une fois la preuve histologique apportée par la biopsie ou l'autopsie). En raison de l'absence de connaissances suffisantes sur le vieillissement cognitif normal, ces seconds critères sont relativement restrictifs pour éviter de porter à tort un diagnostic chez les sujets présentant un vieillissement cognitif normal. Une nouvelle révision des critères diagnostiques faite en 2010 par Dubois et *al.*, permet l'identification de la MA quel que soit le stade de l'affection, avant même le seuil de la démence (Dubois et *al.*, 2010). Ils reposent sur la mise en évidence d'un trouble significatif et inaugural de la mémoire épisodique associé à une atrophie hippocampique à l'Imagerie par Résonance Magnétique cérébrale (IRM), d'une modification des biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien (LCR), d'un profil d'hypoperfusion à la Tomographie par Emission monophotonique (TEMP) ou SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), ou d'un hypométabolisme à la Tomographie par

Emission de Positrons (TEP-scan) ou PET-scan (Positron Emission Tomography) (Dubois et *al.*, 2010). Or, malgré l'établissement de ces critères, le diagnostic de MA demeure un diagnostic de probabilité et la certitude n'est établie qu'à l'examen anatomo-pathologique post mortem basée sur la physiopathologie de la maladie à savoir la présence de deux types de lésions : (i) les plaques amyloïdes dues à l'accumulation extracellulaire de peptides A β neurotoxiques et (ii) les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires liées à l'accumulation intraneuronale de protéine Tau hyperphosphorylée (Avramopoulos, 2009). En outre, l'inflammation, via l'activation de la voie du complément, est une des caractéristiques importantes de la physiopathologie de la MA (Eikelenboom et *al.*, 2006 ; Jiang et *al.*, 2012).

Bien que les processus et causes exactes menant à la formation de ces lésions et leurs associations combinées avec la MA restent encore mal connus (Small & Duff, 2008), des facteurs génétiques et environnementaux contribuent à son apparition et à son développement. Ainsi, à ce jour quatre gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans l'étiologie de la MA : (i) des mutations du gène précurseur de la protéine amyloïde (*APP*) situé sur le chromosome 21 codant pour le précurseur de la protéine amyloïde, (ii) des mutations du gène préséniline 1 (*PSEN1*) situé sur le chromosome 14 codant pour la préséniline 1 et (iii) des mutations du gène préséniline 2 (*PSEN2*) situé sur le chromosome 1 codant pour la préséniline 2 (Hardy & Selkoe, 2002). Cependant, il est estimé aujourd'hui que ces formes à transmission monogénique (transmission autosomique dominante ou récessive) ne concernent que des formes familiales à début précoce (moins de 65 ans) et représenteraient moins de 1 % des cas de MA (Bekris et *al.*, 2010 ; Campion et *al.*, 1999 ; Rogaeva et *al.*, 2006). Tandis que dans la forme la plus commune de la maladie (forme sporadique à début tardif), il existe d'autres déterminants génétiques plus complexes et à ce jour (iiii), seul l'allèle E4 du gène de l'apolipoprotéine E (*APOE*), situé sur le chromosome 19 et codant pour l'apolipoprotéine E, a été explicitement établi comme gène de susceptibilité (Avramopoulos, 2009 ; Campion et *al.*, 1999).

Récemment, les études d'association pangénomiques (Genome Wide Association Studies- GWAS) ont permis d'identifier plus de 20 loci associés à la MA, incluant le gène *CRI* (Complement Receptor Type I) (Carrasquillo et *al.*, 2010 ; Chen et *al.*, 2012 ; Chung et *al.*, 2014 ; Corneveaux et *al.*, 2010 ; Guerreiro et *al.*, 2013 ; Harold et *al.*, 2009 ; Hazrati et *al.*, 2012 ; Hollingworth et *al.*, 2011 ; Jin et *al.*, 2012 ; Jonsson et *al.*, 2013 ; Jun et *al.*, 2010 ;

Lambert et *al.*, 2009; Lambert et *al.*, 2013; Ma et *al.*, 2014 ; Naj et *al.*, 2011; Schjeide et *al.*, 2011 ; Seshadri et *al.*, 2010; Wijsman et *al.*, 2011 ; Zhang et *al.*, 2010). A ce jour, neuf SNPs (Single Nucleotide polymorphisms) dont deux non codants, rs6656401 et rs3818361, situés sur le gène *CR1* ont été établis comme associés aux formes sporadiques de la MA aussi bien chez des caucasiens que chez des asiatiques (Carrasquillo et *al.*, 2010 ; Chen et *al.*, 2012 ; Corneveaux et *al.*, 2010 ; Jin et *al.*, 2012 ; Jun et *al.*, 2010 ; Lambert et *al.*, 2009 ; Schjeide et *al.*, 2011 ; Wijsman et *al.*, 2011 ; Zhang et *al.*, 2010). Le gène *CR1* situé sur le chromosome 1 code pour la protéine CR1 qui constitue une des protéines régulatrices de l'activation du complément.

CR1, également appelé récepteur au C3b/C4b ou CD35, est une glycoprotéine transmembranaire. C'est une des protéines régulatrices du complément. Elle contient des récepteurs pour C3b, C4b, C3bi mais aussi pour C1q, MBL (Mannan Binding Lectin, lectine spécifique des résidus mannanes) et permet l'élimination des complexes immuns (Jacquet et *al.*, 2013). Cette glycoprotéine présente trois types de polymorphismes : un polymorphisme de longueur correspondant à un polymorphisme structural, un polymorphisme de densité et un polymorphisme en rapport avec l'expression d'antigènes du groupe sanguin Knops (Cohen et *al.*, 1999).

Le polymorphisme de longueur (polymorphisme structural) se traduit par l'existence de quatre isoformes de CR1 de longueur différentes. Par ordre croissant de poids moléculaire, ces isoformes sont : CR1*3 ou CR1-F' (160 kDa), CR1*1 ou CR1-F (190 kDa), CR1*2 ou CR1-S (220 kDa), et CR1*4 ou CR1-D (250 kDa) (Birmingham et *al.*, 2003 ; Krych-Golbergh et *al.*, 2002 ; Wong et *al.*, 1983). L'isoforme la plus commune est CR1*1, puisqu'il est retrouvé chez 87% des caucasiens. Son domaine extracellulaire est constitué de 4 LHRs (Long Homologous Repeat) appelés respectivement LHR-A, LHR-B, LHR-C et LHR-D (Hourcade et *al.*, 1988; Klickstein et *al.*, 1987). Le LHR-A présente un site de liaison pour le C4b, tandis que le LHR-B et le LHR-C présentent un site de liaison pour le C3b et le C4b. Les autres isoformes de CR1 sont liées à la variation du nombre de LHR. Dans ce sens, la deuxième isoforme la plus commune après CR1*1, retrouvée chez 11% des caucasiens est CR1*2. L'isoforme CR1*2 présente un cinquième LHR, appelé LHR-S ; ainsi, cet isoforme présente un site de liaison additionnel pour le C3b et le C4b. Les deux autres isoformes,

CR1*3 et CR1*4, plus rares, présentent respectivement un LHR en moins et deux LHR additionnels.

Le polymorphisme de densité correspond à un phénotype stable qui représente le niveau d'expression constitutive de CR1 sur les érythrocytes, bien qu'une déficience acquise puisse survenir dans certaines pathologies comme le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) ou le Lupus érythémateux systémique (LES) (Cohen et *al.*, 1992). Chez les caucasiens, il a été montré que les érythrocytes provenant de différents sujets sains ont une variation dans le nombre de molécules du CR1 érythrocytaire, allant jusqu'à un facteur dix (variations de 150 à 1500 molécules par cellules) (Cornillet et *al.*, 1991; Moulds et *al.*, 1991, 1992).

Bien que de nombreuses études aient identifiées le gène *CRI* comme gène de susceptibilité associé à la MA dans sa forme sporadique, avec une crédibilité épidémiologique évidente, considérant le gène *CRI* comme un des plus importants loci associé à la MA à début tardif après le gène *APOE* (Bertram et *al.*, 2007 ; Bertram & Tanzi., 2010 ; Zhu et *al.*, 2015), la signification fonctionnelle de cette association reste inconnue, d'où la nécessité d'études investiguant le rôle de ces polymorphismes dans la pathogénèse de la MA. Par ailleurs, toutes ces études d'association entre *CRI* et MA suggèrent un rôle du complément dans la physiopathologie de la MA.

Dans la première partie, approche théorique, nous présentons le contexte général de ce travail en commençant par un bref historique rappelant la confusion entre vieillissement cognitif et démence/MA qui existait dès l'antiquité, l'épidémiologie de la MA en mettant l'accent sur les facteurs de risques notamment génétiques, en particulier dans la forme la plus fréquente de la maladie (MA à début tardif ou forme sporadique) et les grandes lignes du diagnostic de la MA. Puis, nous aborderons le système du complément, et plus particulièrement le gène *CRI* et la protéine CR1 et son rôle potentiel dans la pathogénèse de la MA.

Dans la seconde partie, projet de recherche, nous décrivons le projet exposé dans ce travail de thèse en commençant par sa problématique scientifique (hypothèses et objectifs), puis en décrivant les méthodes utilisées. Nous présentons ensuite les résultats de notre premier travail qui a montré que la MA était associée à l'isoforme long de CR1 (CR1*2) mais

à une densité basse. Les premiers résultats de cette étude sont présentés dans une publication internationale faisant partie de ce travail. **Article 1** : « *Alzheimer's disease is associated with low density of the long CR1 isoform* ». Ces résultats nous ont également permis de déposer un brevet d'invention, grâce à la mise en place d'une technique innovante pour la détermination des polymorphismes de longueur de la protéine CR1 à partir de l'acide désoxyribonucléique (ADN). **Brevet** : « «Méthode de Détermination du polymorphisme de longueur du récepteur CR1 ». Enfin, les derniers résultats concernant l'étude des polymorphismes de densité de CR1 ont montré que, bien que les critères génétiques soient respectés, le phénotype « densité basse de CR1 » est probablement acquis chez les patients atteints de MA. Ces résultats vont être soumis à une revue internationale. **Article 2** : « *Acquired decrease of CR1 density in Alzheimer's disease* ».

Dans la conclusion, nous discutons de l'apport et de l'avenir d'un projet à plus grande échelle combinant à la fois l'étude des polymorphismes de CR1 au niveau du LCR et *in situ*. Pour ce faire, nous exposons les perspectives de notre travail.

PREMIERE PARTIE - Approche théorique

Chapitre I – Historique de la démence et de la maladie d’Alzheimer

I. Vieillissement - démence

L’idée que le vieillissement puisse s’accompagner de troubles de l’esprit est connue dès l’antiquité, mais cela a inquiété les juristes bien avant les médecins. C’est Platon, en 350 avant Jésus-Christ, qui reconnaît qu’un état de folie ou de maladie, sous l’influence de l’âge extrême, peut rendre excusable certains crimes comme le sacrilège, la perfidie ou la haute trahison.

Solon, en 500 avant Jésus-Christ, avait défini les altérations du jugement liées au très grand âge comme des conditions pour lesquelles la volonté se trouverait être nulle et non avenue, en particulier pour permettre d’invalidier un testament.

Galien, au II^{ème} siècle de notre ère, est le premier à avoir introduit le terme « dementia » qu’il distingue du delirium, caractérisé par son évolution aiguë.



Philippe Pinel
1745-1826

Le terme « démence » va apparaître dans le vocabulaire médical français en 1797, suite aux écrits de Pinel. Il dérive du latin « demens » constitué du préfixe « de » (hors de) et du suffixe « mens » (esprit). Il renvoie donc à une situation caractérisée par la disparition des qualités intellectuelles spécifiques de l’être humain. Cela marquera très longtemps le sort des personnes atteintes de ce trouble qui seront considérées plutôt comme exclues de la communauté humaine que comme des malades. Son élève Esquirol fit rapidement faire un pas

en avant à la nosographie, en séparant le concept de démence de celui d'arriération mentale et des psychoses fonctionnelles. Il en donna la première description rigoureuse. "La démence est une affection cérébrale caractérisée par l'affaiblissement de la sensibilité, de l'intelligence, de la volonté... ". Ainsi, « L'homme en démence est privé des biens dont il jouissait autrefois. C'est un riche devenu pauvre ; l'idiot a toujours été dans l'infortune et la misère ». Les notions de chronicité et d'incurabilité sont dès lors indispensables au diagnostic de démence.

En 1892, Blocq et Marinesco observent pour la première fois les plaques séniles que Redlich, en 1898, rattacherait à la démence sénile.

II. La Maladie d'Alzheimer

C'est en 1907, qu'Aloïs Alzheimer (Alzheimer, 1907), neuropathologiste de l'école de Munich, publie l'étude anatomoclinique d'Augusta D, patiente âgée de 51 ans ayant présenté un délire de jalousie suivi d'une désintégration des fonctions cognitives, décédée après une évolution progressive de 4 ans et 6 mois dans un grand tableau démentiel. Dans son étude histologique, il montre l'existence de congglomérats intra-neuronaux de fibres anormales co-existant avec des plaques séniles. A cette première description histologique complète de la maladie démentielle il donne le nom de dégénérescence neuro-fibrillaire.



Aloïs Alzheimer

1864-1915

Dès lors, la démence va intégrer le champ des affections organiques du cerveau et devenir une maladie neurologique.

En 1912, dans son influent *Traité de Psychiatrie*, Kraepelin individualise la "maladie d'Alzheimer" comme une démence du sujet jeune, rare et dégénérative, laissant au terme de "démence sénile", les démences vasculaires du sujet âgé. Cette opposition sera reprise sans discussion par la majorité des écoles européennes.

L'involution cérébrale est considérée pendant longtemps comme une fatalité, un ordre naturel des choses médicalement explicité par la très fameuse «artériosclérose». En 1965, Corsellis découvre que les sujets déments n'ont pas de stigmates d'artériosclérose cérébrale significativement plus importants que les sujets non déments du même âge. Il faudra tout de même attendre les années 80 pour voir disparaître le concept de démence sénile.

En 1968 puis en 1970, Blessed, Tomlinson et Roth (Blessed et *al.*, 1968) retrouvent une corrélation hautement significative entre la dégénérescence neuro-fibrillaire d'Alzheimer et le processus démentiel. L'importance des anomalies histologiques étant proportionnelle au degré de détérioration et au degré d'invalidité fonctionnelle.

Le premier congrès mondial sur la maladie d'Alzheimer et les autres démences séniles a lieu à Londres en 1977, cette date coïncide aussi avec la prise de conscience débutante qu'il s'agit d'un réel problème de Santé Publique. L'opinion commence alors à être sensibilisée.

Les progrès des neurosciences ont permis des avancées importantes dans les connaissances physiopathologiques de la maladie. Roth et son équipe, entre 1960 et 1980, précisent la nature et la localisation des lésions histologiques. Les travaux de Glenner et Wong, en 1983, conduisent à la purification de la protéine " β -4 amyloïde" (Glenner & Wong., 1984 ; Glenner et *al.*, 1984). Dans les années 1976-77, trois équipes (celles de Bowen, de Perry, et de Davies) démontrent l'altération des systèmes cholinergiques centraux dans la maladie d'Alzheimer. De là est née la première piste de recherche pour une thérapeutique rationnelle, imposant de fait, une identification fiable et reproductible des patients, de la nature et de la sévérité de leurs troubles.

Puis, dans les années 1980, des progrès considérables sont réalisés dans les études cliniques et épidémiologiques grâce à l'établissement de critères diagnostiques standardisés internationaux. L'Association Américaine de Psychiatrie édite le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-III, 1980 (American Psychiatric Association, 1980) ;

DSM-III-R, 1987 (American Psychiatric Association, 1987) ; DSM-IV, 1994 (American Psychiatric Association, 1994).

En 1984, le groupe de travail multidisciplinaire NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) établit des critères diagnostiques de maladie d'Alzheimer (McKhann et *al.*, 1984) permettant de structurer le diagnostic de la maladie d'Alzheimer et le développement de la recherche.

C'est à Ball et *al.* (1985) que l'on doit d'avoir utilisé le premier le terme de démence hippocampique pour désigner la maladie d'Alzheimer. Ultérieurement, les travaux de Braak et Braak ont confirmé que les lésions cérébrales de la MA progressaient selon des stades successifs, au sein du cortex entorhinal, de l'hippocampe, du lobe temporal externe, puis de tout le néo-cortex, expliquant la progression de la séméiologie clinique (Braak et *al.*, 1993). (Figure 1)

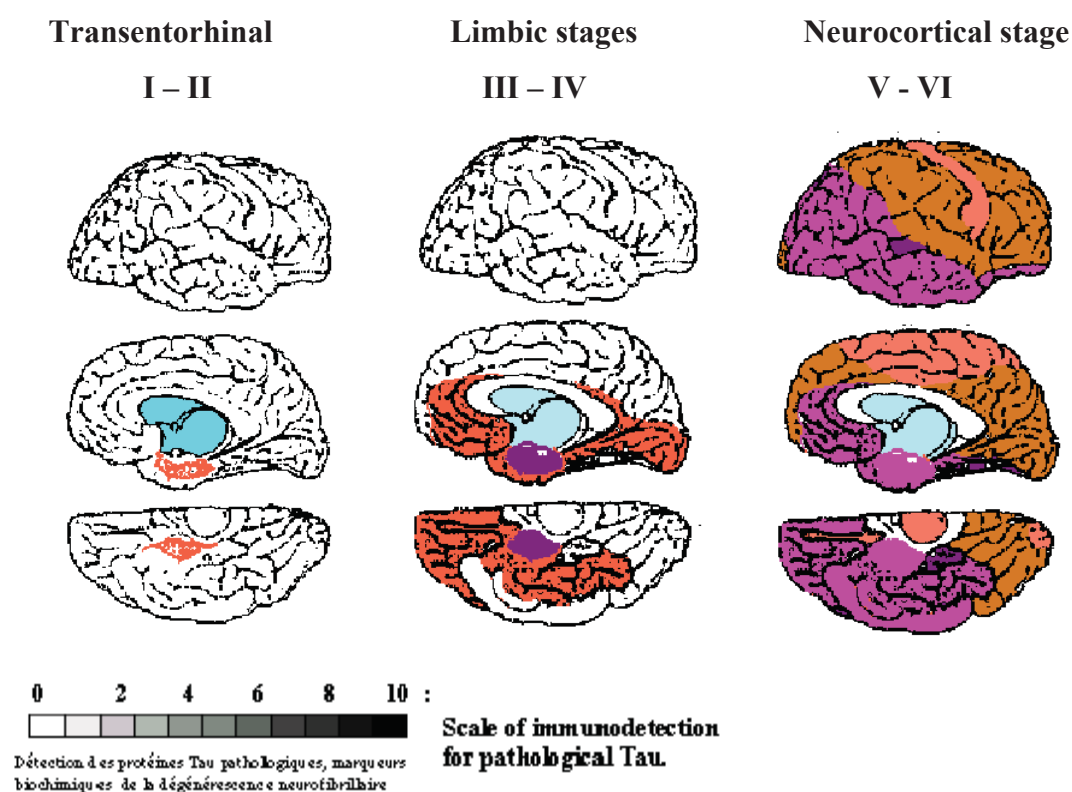


Figure 1 Les stades évolutifs de Braak et Braak.

Depuis les années 90, la recherche concernant la biologie et la génétique moléculaire des lésions fondamentales de la maladie se développe de façon exponentielle permettant, sous l'impulsion des travaux de pharmacologie appliquée, de nouveaux espoirs thérapeutiques. En 1997, il paraît environ 150 articles scientifiques par mois sur les démences de type Alzheimer et sur le vieillissement cérébral normal et pathologique.

Les progrès des investigations neurologiques ont montré l'existence de multiples pathologies correspondant aux critères cliniques des démences. Au sein même des affections neurodégénératives s'opposent désormais :

- les démences corticales (Syndrome démentiel de type Alzheimer, les démences frontales, les démences fronto-temporales),
- les démences sous corticales (démences parkinsoniennes, les atrophies multi-systématisées ou la paralysie supra nucléaire progressive),
- les démences cortico-sous-corticales (démences à corps de Lewy et dégénérescence cortico-basale).

Le terme « démence » fait référence à une série de symptômes identifiés chez les personnes atteintes de maladies cérébrales entraînant une détérioration puis une disparition neuronale. La déperdition neuronale est un processus inhérent au vieillissement naturel, mais, en cas de démence, elle se produit beaucoup plus rapidement et conduit à un dysfonctionnement cérébral.

Les symptômes de la démence comprennent une détérioration lente, progressive et irréversible des capacités fonctionnelles du malade. La détérioration cérébrale affecte le fonctionnement cognitif du sujet. Les troubles mnésiques y sont constants. Dans la plus grande partie des cas, ils constituent le premier symptôme. Ils font partie des critères de définition de l'état démentiel selon le DSM-IV, associés aux troubles du jugement, aux troubles du caractère, à l'existence d'autres troubles instrumentaux (praxies, langage, gnosies) et à l'altération de la pensée abstraite. On admet aujourd'hui que la maladie d'Alzheimer évolue en 3 phases.

La première, la plus longue (15-20 ans), correspond à l'installation silencieuse des lésions cérébrales, sans aucun signe ni symptôme cliniquement décelable.

La seconde correspond à l'apparition progressive de modifications cognitives et comportementales dont l'intensité n'est pas suffisante pour permettre un diagnostic de démence (cette phase durerait, en moyenne, de 2 à 5 ans).

Enfin, lorsque les lésions cérébrales ont atteint un certain seuil de sévérité ou d'extension, les manifestations cliniques remplissent les critères de démence et on parle alors de Démence de Type Alzheimer (DTA) légère, puis modérée et sévère, selon l'intensité des déficits cognitifs et le degré de perte d'autonomie (Déroutesné & Lacomblez, 2000).

Les progrès scientifiques dans la compréhension des mécanismes des maladies démentielles sont évidents. Ils se basent sur une meilleure localisation des atteintes neurologiques, en particulier par les techniques d'imagerie et sur une meilleure compréhension des mécanismes neurochimiques et neuro-génétiques. La nosographie s'affine, les classifications sont plus précises. Or, dans le même temps, la représentation sociale de ces maladies se dégrade, l'angoisse et la peur augmentent et deviennent plus prégnantes dans le public, mais également auprès de bon nombre de professionnels de santé. Aux mots sénilité ou gâtisme d'autrefois, on a substitué le mot d'Alzheimer porteur de fantasmes, globalisant tous les troubles de la mémoire, y compris les simples ralentissements psychiques chez les sujets âgés alors que tout trouble de la mémoire ne témoigne pas d'une maladie de la mémoire et que toutes les maladies de la mémoire ne sont pas des maladies d'Alzheimer (Blanchard et *al.*, 2000).

Ce rappel historique permet de nous éclairer sur la représentation léguée par les générations précédentes et son incidence sur le comportement actuel vis-à-vis du vieillard jugé inutile, ce vieux qui fait peur, ce vieux auquel nous ne voulons en aucun cas ressembler et qu'il est parfois plus simple d'oublier « ce vieux dit dément ».

Chapitre II – Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer

Depuis trente ans, les connaissances sur les démences et plus particulièrement sur la Maladie d'Alzheimer (MA) ont considérablement progressé. La MA est habituellement diagnostiquée sur la base d'examen anamnestique, physiques et neurologiques et la vérification de troubles cognitifs par le biais de tests standardisés neuropsychologiques (voir prochain chapitre). La MA représente environ 60% des démences. Les études de cohorte sur la maladie d'Alzheimer restent assez rares car elles nécessitent des études longitudinales.

- Aux USA, la cohorte de Framingham est la plus célèbre.
- En Europe, un programme EURODEM (European Concerted Action on Dementia) a été mis en place pour étudier l'épidémiologie et la prévention de la démence de type Alzheimer (Andersen et *al.*, 1999).
- En France, le programme de recherche PAQUID (Personnes Agées Aquitaine ou QUID des Personnes Agées) a débuté en 1988. Il vise à apprécier de façon prospective le vieillissement normal et pathologique d'une cohorte de 4 134 sujets de plus de 65 ans, issus de 2 départements du sud-ouest de la France (Edjolo et *al.*, 2013 ; Ramaroson et *al.*, 2003).

I. Prévalence de la démence et de la maladie d'Alzheimer

La prévalence d'une maladie est la proportion d'une population qui, à un moment donné, est atteinte de cette maladie. Elle s'exprime en taux qui selon l'importance du phénomène mesuré s'exprime en ‰, ‰‰ ou ‰‰‰.

La Maladie d'Alzheimer pose aux épidémiologistes d'importants problèmes méthodologiques. En effet, le diagnostic du vivant du malade reste un diagnostic de présomption. Si la prévalence et l'incidence de la démence et de la maladie d'Alzheimer ont été étudiées à de multiples reprises, il existe néanmoins un certain nombre de problèmes méthodologiques qui rendent les résultats plus ou moins critiquables : hétérogénéité des méthodes utilisées, des populations étudiées, ainsi que l'utilisation de critères diagnostiques différents (Riedel-Heller et *al.*, 2000). Ceci est d'ailleurs bien mis en évidence par Erkinjuntti et *al.* (1997) qui retrouvent une prévalence de la démence variant de 3,1 % à 29,1 % selon les critères diagnostiques retenus. A noter en particulier que la plupart des études

épidémiologiques ont été effectuées auprès d'un très petit nombre de sujets de plus de 90 ans (Ankri, 2006).

La prévalence de la démence varie naturellement avec l'âge. Selon les données de l'EURODEM, elle augmente respectivement de 1,4 % entre 60 et 64 ans à 32,2 % entre 89 et 94 ans (Launer et *al.*, 1999). Pour la France, les données disponibles sont principalement issues de la cohorte PAQUID réalisée en Aquitaine (Edjolo et *al.*, 2013 ; Ramaroson et *al.*, 2003). Cette cohorte est constituée d'un échantillon représentatif de sujets âgés de 65 ans et plus, vivant au domicile et pour qui ont été appliqués les critères du DSM III-R pour le diagnostic de démence et du NINCDS-ADRDA pour celui de la maladie d'Alzheimer.

Afin d'estimer le nombre de patients atteints de démence attendu, nous disposons donc d'une étude épidémiologique française, ainsi que de la combinaison de plusieurs études européennes, regroupées dans le programme européen EURODEM fournissant les niveaux des principaux indicateurs de morbidité des démences en population.

Devant les écarts entre les différentes estimations concernant la prévalence et l'incidence de cette maladie, un rapport de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) (Moise et *al.*, 2004) préconisait de se fonder sur les estimations fournies par le groupe Eurodem (Lobo et *al.*, 2000 ; Helmer et *al.*, 2006).

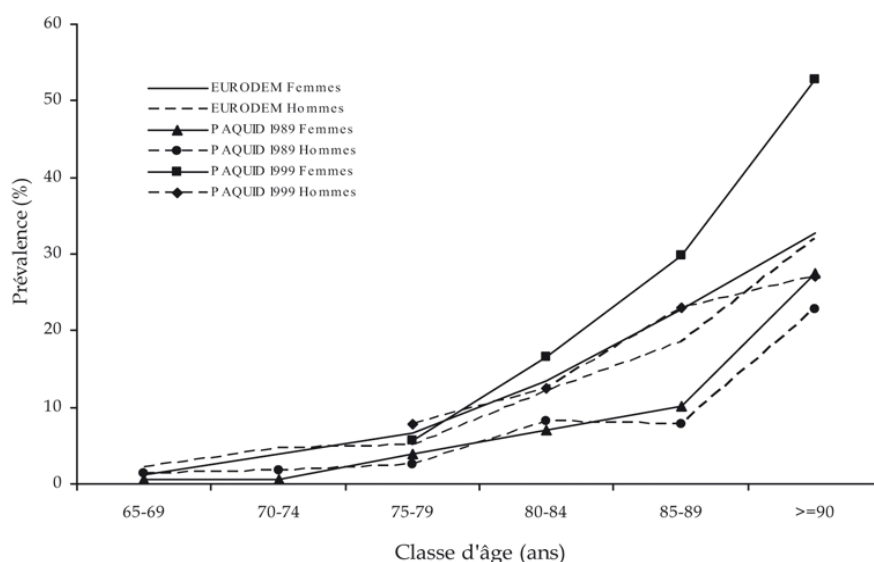


Figure 2 Prévalence de la Maladie d'Alzheimer selon les classes d'âge. A partir des statistiques de projection de la population de l'ONU (Organisation des Nations Unies) pour 2012 et deux séries de taux de prévalence : EURODEM et EuroCoDe studies (Gallez, 2005).

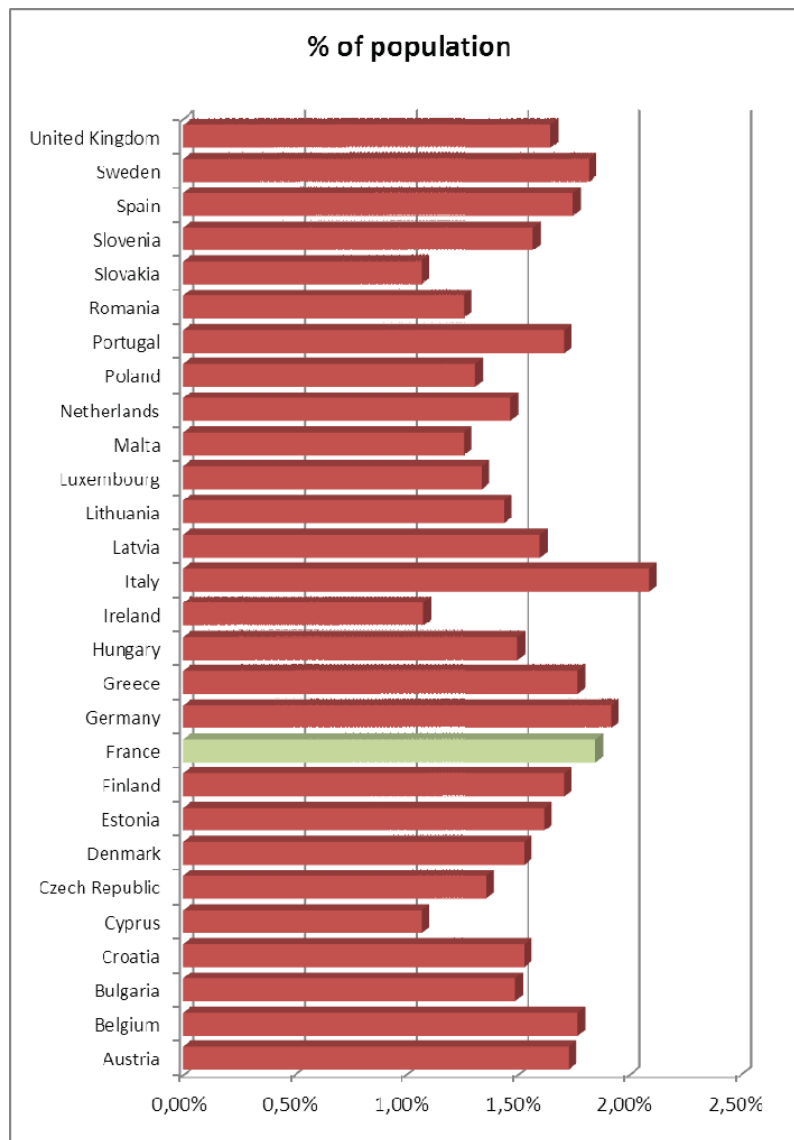


Figure 3 Prévalence de la démence en europe.
D'après l'annuaire de la démence dans le cadre d'Alzheimer Europe 2013.

II. Incidence de la démence et de la maladie d'Alzheimer

L'incidence se définit comme le nombre de nouveaux cas d'une maladie dans une population et pour un intervalle de temps donné. Il faut donc l'exprimer par taux rapporté à une unité de temps, par exemple pour 1 000 habitants et par an.

L'incidence annuelle des démences est difficile à apprécier, les nouveaux cas étant loin d'être tous recensés. Elle augmente avec l'âge, passant de près de 3 / 1000 entre 65 et 69 ans à 60 / 1000 après 85 ans (Mayeux & Stern, 2012).

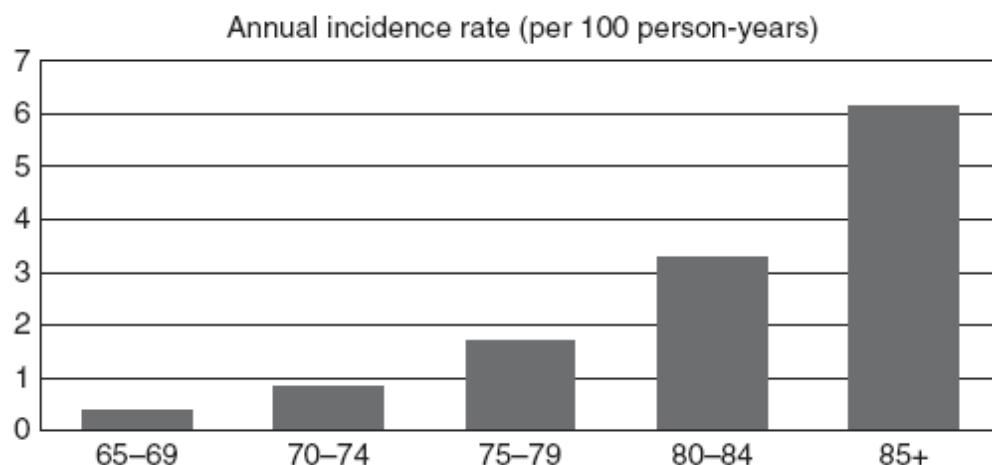


Figure 4 Taux d'incidence annuel de la maladie d'Alzheimer pour 100 personnes-années. Ce graphique est une estimation à partir des données collectées dans 24 études publiées. D'après Mayeux & Stern (2012).

L'analyse de l'incidence de la démence en fonction de l'âge et du sexe a montré des différences entre hommes et femmes : en effet, le taux d'incidence de la MA est de 0,8 pour 100 personnes-année pour les hommes, et de 1,4 chez les femmes. Il est plus important pour les hommes que pour les femmes avant 75 ans (ratio femmes / hommes : 0,8) alors qu'il devient plus faible après 75 ans (ratio femmes / hommes : 1,7 à 85 ans). Cela suggère que la prévalence plus élevée de la DTA observée chez les femmes n'est pas seulement due aux différences d'espérance de vie mais à un risque plus grand (Andersen *et al.*, 1999).

III. Evolutions épidémiologiques de la démence et de la maladie d'Alzheimer

En fonction de différents scénarii essentiellement liés au vieillissement de la population, a été modélisée la prévalence attendue de la démence selon les sexes entre 2010 et 2030 sur les bases de la cohorte PAQUID. Ainsi pour 2030, les modélisations permettent d'évaluer un nombre attendu de sujets souffrant de démence en France aux alentours des 1 700 000 individus (Jacqmin-Gadda *et al.*, 2013).

Cependant, ces évaluations faites à partir des données d'incidence ou de prévalence d'étude de cohorte sur laquelle on applique une modélisation liée au vieillissement de la population, semblent aujourd'hui remises en question par quelques études récentes. Celles-ci mettent en évidence à partir de méthodologie robuste une tendance à une

diminution du nombre de nouveaux cas de maladie d'Alzheimer et ce, notamment dans les populations anglaises, suédoises et néerlandaises. Ainsi, des comparaisons de cohortes constituées sur des populations et avec une méthodologie similaire, à 10 ou 20 ans d'écart, permettent de mettre en évidence cette évolution. C'est notamment le cas sur les études Danoises, avec une cohorte de 2010 sensiblement plus âgée que la cohorte de 1998 et malgré cet état de fait, cette cohorte de 2010 avait une performance cognitive et fonctionnelle meilleure que celle de la fin des années 2000. Le vieillissement plus marqué dans la deuxième cohorte est sans doute lié à des améliorations de la prise en charge et de la prévention de certaines pathologies. La modélisation attendue aurait du identifier une deuxième cohorte plus âgée, mais en même temps plus fragile notamment d'un point de vue cognitif. Pour autant, la réalité de la comparaison permettait de mettre en évidence un bénéfice d'état de santé qui l'emportait sur la vulnérabilité et ce, notamment sur les domaines cognitifs et fonctionnels (Christensen *et al.*, 2013).

Cet élément de comparaison de cohorte a été retrouvé également dans le Rotterdam study sur des comparaisons similaires entre 1990 et 2000 avec une réduction d'incidence de la maladie d'Alzheimer constatée. Pour les auteurs, ceci était vraisemblablement lié à une diminution de la prévalence de certains facteurs de risque modifiables, notamment une meilleure prise en charge médicamenteuse de l'hypertension, de la dyslipidémie et des pathologies emboligènes. Ils constataient également sur ces comparaisons inter-cohorte une moindre prévalence des niveaux d'étude faibles ou du tabagisme (Schrijvers *et al.*, 2012). Sur une méthodologie comparable, l'étude sur l'incidence au sein de la population de Stockholm retrouvait des résultats similaires avec une diminution d'incidence de la maladie d'Alzheimer en deux décennies d'observation (Qiu *et al.*, 2013). Cette étude objectivait également une prévalence qui restait relativement stable dans la cohorte la plus récente et ce, malgré une mortalité moindre dans cette population par rapport à ce qu'elle pouvait être à la fin des années 1980.

Pour autant à ce jour aux Etats Unis, la maladie d'Alzheimer est la cinquième cause de mortalité chez les plus de 65 ans après les pathologies cardiaques, les cancers, les pathologies respiratoires chroniques et les événements cérébrovasculaires (Tinetti *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'étude des variations en pourcentage des causes de décès, tous âges confondus, entre 2000 et 2010, met en évidence une réduction d'impact des différentes

pathologies et notamment de l'AVC, des pathologies cardiaques, de certains cancers dans des proportions variables, et seules les causes liées à la maladie d'Alzheimer augmentent de façon importante de près de 70 %. En soit, la maladie d'Alzheimer est aujourd'hui une des pathologies chroniques dont l'importance est de plus en plus marquée dans nos sociétés.

IV. Facteurs de risque

Une vraie politique de prévention ne peut se baser que sur l'existence de facteurs de risque connus et établis. Un certain nombre de facteurs ont été étudiés. La maladie d'Alzheimer est une pathologie multi-factorielle faisant intervenir de multiples facteurs combinés entre eux dont certains pourraient modifier le risque de développer la maladie.

1. Facteurs de risque environnementaux ou acquis

Parmi les différents facteurs qui ont été mis en évidence lors des études épidémiologiques, l'âge reste sans conteste un facteur important. On retrouve également le sexe féminin et les antécédents familiaux de démence.

La dépression quant à elle est reconnue comme un facteur de risque mais pose le problème de l'interprétation de ce lien retrouvé. On sait que démence et dépression ont des facteurs de risque communs et que la dépression peut être un syndrome prodromique de la démence et qu'elle est souvent réactionnelle à des troubles cognitifs précoces (Bennett & Thomas, 2014 ; Gao et *al.*, 2013).

Les facteurs de risque vasculaires sont depuis quelques années source d'un débat allant jusqu'à définir la maladie d'Alzheimer comme une maladie vasculaire (De la Torre, 2002). L'hypertension artérielle et l'athérosclérose semblent être associées à un risque accru de maladie d'Alzheimer et le traitement de l'hypertension artérielle pourrait entraîner une réduction importante de l'incidence de la maladie. Le diabète majorerait également le risque de survenue de maladie d'Alzheimer (Cheng et *al.*, 2012 ; Gudala et *al.*, 2013) avec un sur risque évalué à 1,54 (95% CI, 1,33–1,79) dans une méta analyse (Profenno et *al.*, 2009). L'obésité serait également un facteur de risque indépendant avec un sur risque évalué dans une méta analyse à 1,59 (95% CI 1,02–2,5) (Profenno et *al.*, 2009). Le tabagisme apparaît également associé à un sur

risque aussi bien de démence que de déclin cognitif (Anstey et *al.*, 2007). Enfin, concernant le cholestérol, des travaux soutiennent l'hypothèse d'un rôle important du cholestérol dans la formation des plaques amyloïdes (Sambamurti et *al.*, 2004). Toutefois, les résultats sont contradictoires et ce serait plutôt les niveaux élevés de cholestérol du milieu de vie qui seraient les plus associés à une augmentation du risque de MA à un âge plus avancé (Shobab et *al.*, 2005).

La figure 5 présente les principaux mécanismes pouvant expliquer l'association entre facteurs de risque vasculaires et augmentation du risque de démence.

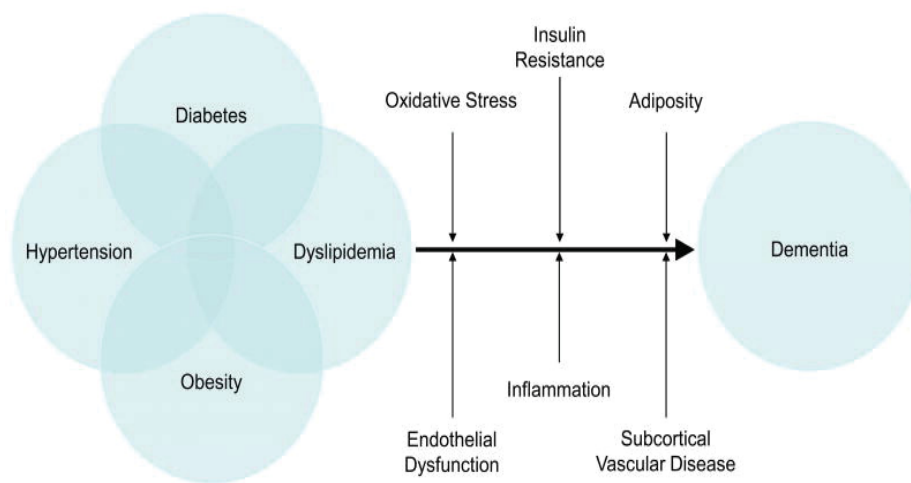


Figure 5 Principaux mécanismes pouvant expliquer l'association entre facteurs de risque vasculaires et démence.
D'après Middleton & Yaffe (2009).

2. Facteurs de risque génétiques

Cette partie sera traitée dans le chapitre suivant (génétique de la maladie d'Alzheimer).

V. Facteurs protecteurs

A l'inverse des facteurs associés à une augmentation du risque de développer une démence ou un déclin cognitif, d'autres facteurs ont été démontrés comme protecteurs, c'est le cas du niveau d'éducation et/ou des activités occupationnelles (Meng & D'Arcy, 2012). Dans ce sens, Dekhtyar et *al.* (2015) ont montré que la réserve cognitive aurait un effet protecteur dès l'école primaire (réduction du risque de 21% chez les personnes ayant eu de bonnes notes à l'école primaire, et de 23% chez les personnes ayant eu à gérer des données complexes dans leur vie professionnelle).

Tout comme la diététique, l'activité physique représente un facteur lié au mode de vie et pourrait être traitée également avec les facteurs vasculaires. Une revue de la Cochrane (Angevaren et *al.*, 2008) a constaté que 8 des 11 essais aléatoires contrôlés sur l'exercice physique chez des personnes âgées sans trouble cognitif connu, retrouvaient que les interventions d'exercices aérobiques étaient associées à une amélioration des fonctions cognitives. Néanmoins, les résultats demeurent controversés avec certaines études n'ayant pas montré d'association entre l'activité physique et la démence (Verghese et *al.*, 2003), et d'autres qui ont observé un rôle bénéfique (Larson et *al.*, 2006; Wang et *al.*, 2006).

Les activités intellectuelles et sociales sont également envisagées comme des facteurs de protection face à la MA. Chez les personnes présentant une MA, les activités intellectuelles sont réduites que ce soit en intensité ou en diversité (Wilson et *al.*, 2002). Néanmoins, il est difficile de dire si cette diminution des activités intellectuelles et sociales est un facteur de risque potentiel de MA ou si elle est le reflet de signes cliniques très précoces de la maladie. Fratiglioni et *al.* (2004) ont mené une revue sur 15 études longitudinales afin de faire le point sur la place des activités intellectuelles et aussi des contacts sociaux. Leurs résultats montraient que globalement les activités intellectuelles, les relations sociales et le statut marital avaient un effet favorable, toutefois ces résultats dépendent fortement de l'intensité et de la diversité de ces activités.

Enfin, plusieurs études ont examiné de façon spécifique les effets potentiels de l'entraînement cognitif sur le risque de MA. Dans l'étude de cohorte des « Trois-Cités », des analyses ont été effectuées sur 5698 participants sans démence, âgés de 65 ans et plus. Stimuler les activités de loisirs était significativement associé à un risque réduit de MA (Akbaraly et *al.*, 2009). Ce résultat est indépendant d'autre forme de réserve cognitive et reste significatif après ajustement sur les facteurs de risque vasculaire, les symptômes dépressifs et le fonctionnement physique.

Le Tableau 1 résume les principaux facteurs de risque environnementaux ou acquis et leurs mécanismes potentiels.

Tableau 1 Facteurs modifiant le risque de maladie d'Alzheimer (Mayeux & Stern, 2012).

Antécédent	Risque	Mécanismes possibles
Trouble cardiovasculaire	Augmenté	Destruction parenchymateuse Lieu stratégique ↑ des dépôts de peptides A β
Tabagisme	Augmenté	Effets cérébrovasculaires Stress oxydatif
Hypertension	Augmenté ou diminué	Trouble microvasculaire
Diabète de type II	Augmenté	Effet vasculaire cérébral Compétition entre l'insuline et A β pour la clairance
Obésité	Augmenté	Augmentation du risque de diabète de type II
Traumatisme crânien	Augmenté	↑ dépôts de peptides A β et d'APP
Education	Diminué	Réserve cognitive
Niveau d'activité	Diminué	Améliore le métabolisme lipidique, stimulation mentale
Régime méditerranéen	Diminué	Antioxydant, anti-inflammatoire
Activité physique	Diminué	Activation de la plasticité cérébrale, améliore la vascularité cérébrale

Chapitre III – Diagnostic de la maladie d’Alzheimer

La MA est une maladie neurodégénérative évolutive s’exprimant principalement par des troubles mnésiques et/ou une atteinte des autres fonctions cognitives (langage, praxies, gnosies, fonctions exécutives), parfois associés à des troubles du comportement, évoluant vers une perte progressive d’autonomie, caractérisant un syndrome démentiel. C’est la cause la plus fréquente de démences (Alzheimer’s Disease International, 2010).

En France et dans le monde, la MA demeure sous diagnostiquée, particulièrement chez le sujets jeunes et les plus âgés. De plus, c’est essentiellement au stade de démence, parfois avancée, que la maladie est identifiée, retardant de manière préjudiciable la prise en charge médico-sociale des patients et alourdissant la charge des aidants.

I. Critères de définition de la maladie d’Alzheimer

Le diagnostic clinique de la MA demeure un diagnostic probabiliste et repose sur une démarche en deux temps avec mise en évidence, dans un premier temps, d’un syndrome démentiel puis mise en évidence des arguments en faveur d’une MA. Le DSM-V (American Psychiatric Association, 2013) a proposé une série de critères permettant d’opérationnaliser le diagnostic de démence : troubles de la mémoire et perturbation d’au moins une autre fonction cognitive (langage, praxie, gnosie, fonctions exécutives...) suffisamment sévère pour retentir sur les activités de la vie quotidienne. Le retentissement dans la vie quotidienne a permis de circonscrire le concept de démence défini comme étant la perte d’autonomie du sujet et de son indépendance dans la vie quotidienne. Une fois le diagnostic de syndrome démentiel établi, les critères de McKhann et *al.* (1984) permettent de retenir le diagnostic de MA probable sur la base d’une installation progressive du syndrome démentiel et de l’absence de maladie cérébrale ou systémique pouvant rendre compte des troubles mnésiques et cognitifs. Cette stratégie opérationnelle permet donc l’identification d’une démence de type Alzheimer (DTA).

D’une façon générale, le diagnostic de la MA est plus difficile aux deux extrémités de l’évolution de la maladie. Au début de la maladie, les symptômes sont discrets et peuvent être confondus avec des difficultés liées au vieillissement normal. C’est une des raisons expliquant d’une part le sous diagnostic de la maladie et d’autre part le retard du

diagnostic. A la fin de l'évolution, c'est-à-dire aux stades ultimes de la dégradation cognitive et comportementale, il est également difficile de retrouver à l'examen des stigmates spécifiques d'une affection en raison des difficultés de l'évaluation (tests psychométriques voire neuropsychologiques non réalisables). D'où l'importance de l'interrogatoire de l'entourage sur le mode d'installation des troubles dans le diagnostic de la MA.

II. Limites des anciens critères de définition de la maladie d'Alzheimer

Bien que les anciens critères de définition de la MA aient une sensibilité globalement satisfaisante pour le diagnostic de la MA (81%), leur spécificité est globalement faible (70%) (Knopman et *al.*, 2001). Par ailleurs, selon certaines données post-mortem, les manifestations caractéristiques d'une MA et d'une maladie vasculaire peuvent être associées dans 20% des cas (Inserm, 2007). De plus, dans la MA, les premières lésions cérébrales sont présentes plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes. Cette phase pré-symptomatique, où les lésions s'installent à bas bruit, précède une phase de transition où les symptômes apparaissent sans atteindre les critères de démence et donc, selon ces classifications (DSM-V, NINCDS-ADRDA), de MA. En effet, plusieurs auteurs ont cherché à repérer cette première phase symptomatique de la MA, en identifiant des sujets atteints de troubles mnésiques ou d'autres troubles cognitifs, mais pas suffisamment sévères pour altérer l'autonomie (Flicker et *al.*, 1991). Ces études ont montré que ces patients, par rapport à d'autres sujets du même âge mais sans troubles cognitifs, avaient un risque élevé de développer un syndrome démentiel après une ou quelques années de suivi (Flicker et *al.*, 1993 ; Petersen et *al.*, 1999). Le terme utilisé pour définir l'atteinte de ces patients était celui de Mild Cognitive impairment (MCI) ou troubles cognitifs légers, comprenant plusieurs formes : le MCI amnésique pur, le MCI intéressant plusieurs domaines cognitifs incluant la mémoire, le MCI portant sur plusieurs domaines cognitifs à l'exclusion de la mémoire et le MCI caractérisé par un déficit dans un domaine isolé, en dehors de la mémoire (Petersen, 2004 ; Winblad et *al.*, 2004) (Figure 6).

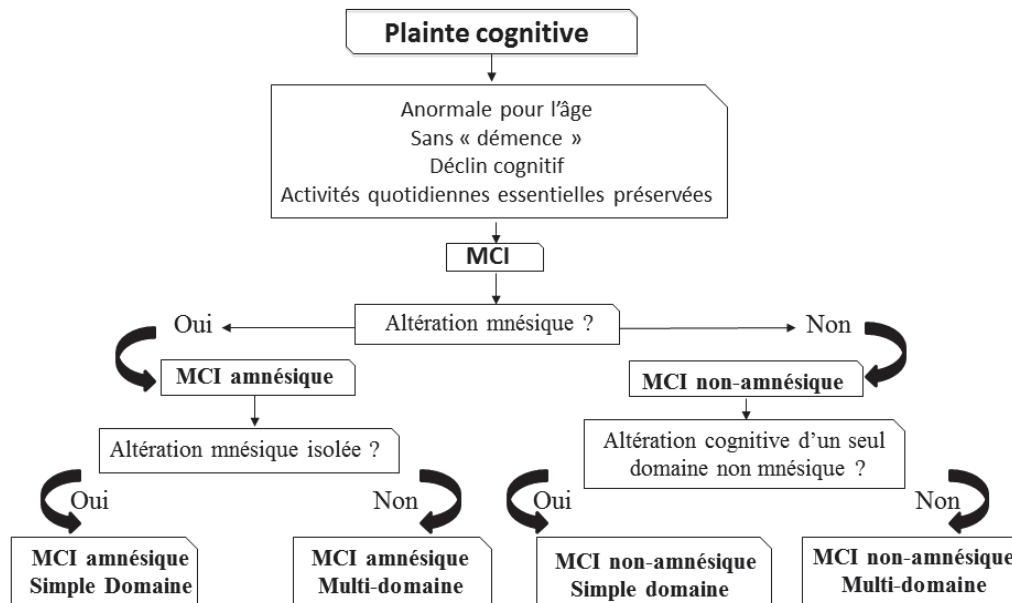


Figure 6 Critères élargis du MCI.
D'après Winblad et *al.* (2004).

Le but de cette classification étant de prédire au mieux la pathologie sous-jacente aux troubles constatés. En effet, le MCI amnésique pur, pour lequel le déficit est limité à la mémoire épisodique, évolue le plus souvent vers une MA, alors que l'évolution des autres types de MCI est beaucoup plus hétérogène. C'est pourquoi, certains auteurs ont considérés qu'il était temps d'identifier les patients atteints de MA au stade pré-démontiel, sur la base de troubles mnésiques avérés et des données de la neuro-imagerie ou de marqueurs biologiques.

III. Nouveaux critères de définition de la MA

Une nouvelle révision des critères de définition de la MA effectuée par Dubois et *al.* (2010) permet l'identification de la MA quel que soit le stade de l'affection, avant même le seuil de la démence. Ils reposent sur la mise en évidence d'un trouble significatif et inaugural de la mémoire épisodique associé à une atrophie hippocampique à l'IRM cérébrale, d'une modification des biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien ($A\beta$, Protéine tau et phospho-tau), d'un profil d'hypoperfusion au SPECT ou d'hypométabolisme au Pet-scan (Dubois et *al.*, 2010). Ces nouveaux critères permettent d'établir deux types de MA : la MA typique et la MA atypique, mais surtout un diagnostic précoce.

En effet, la MA (typique) est une maladie latente, qui évolue pendant plusieurs années, avant l'apparition des premiers troubles cognitifs, et aboutit à un tableau démentiel (Figure 7).

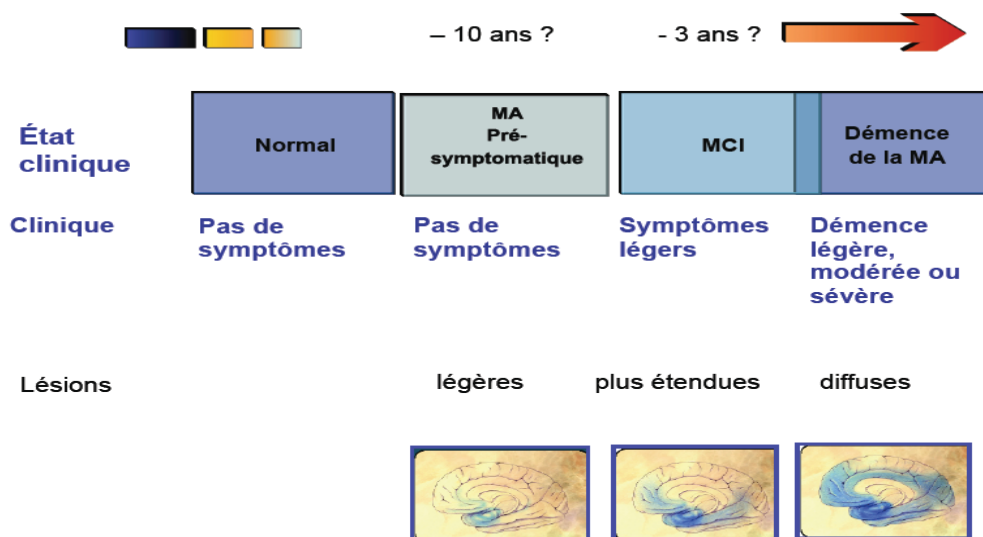


Figure 7 Discordance entre la clinique de la maladie d'Alzheimer et les lésions neuropathologiques.

Dans ce sens, le recours aux biomarqueurs du LCR et à la neuroimagerie permet non seulement d'améliorer les performances diagnostiques, mais également un diagnostic précoce. Ceci permet d'une part, d'instaurer plus rapidement une prise en charge adaptée, mais également une meilleure caractérisation des patients pouvant être inclus dans les essais thérapeutiques. Dans ce sens, Bloudek et *al.* (2011), dans une méta-analyse évaluant les études dans lesquelles les critères cliniques ont été utilisés, ont montré que le recours aux biomarqueurs du LCR ($A\beta_{42}$ et protéines Tau), améliorait la sensibilité à 84% (76-90 %) et la spécificité à 71% (59-81%) pour la MA aussi bien au stade de la démence, qu'aux différents stades de MCI (Bloudek et *al.*, 2011 ; Guerreiro et *al.*, 2015).

Par ailleurs, d'après plusieurs auteurs, les premières modifications des biomarqueurs montrent que l'accumulation du peptide $A\beta$ précède de plusieurs années la maladie (10 à 20 ans), avec des marqueurs $A\beta$ précédant les marqueurs Tau de 5 à 10 ans (Buchhave et *al.*, 2012 ; Fagan et *al.*, 2014 ; Guerreiro et *al.*, 2015), plaçant le peptide $A\beta$ avant la protéine Tau dans la séquence des événements concernant le processus de la maladie (Figure 8).

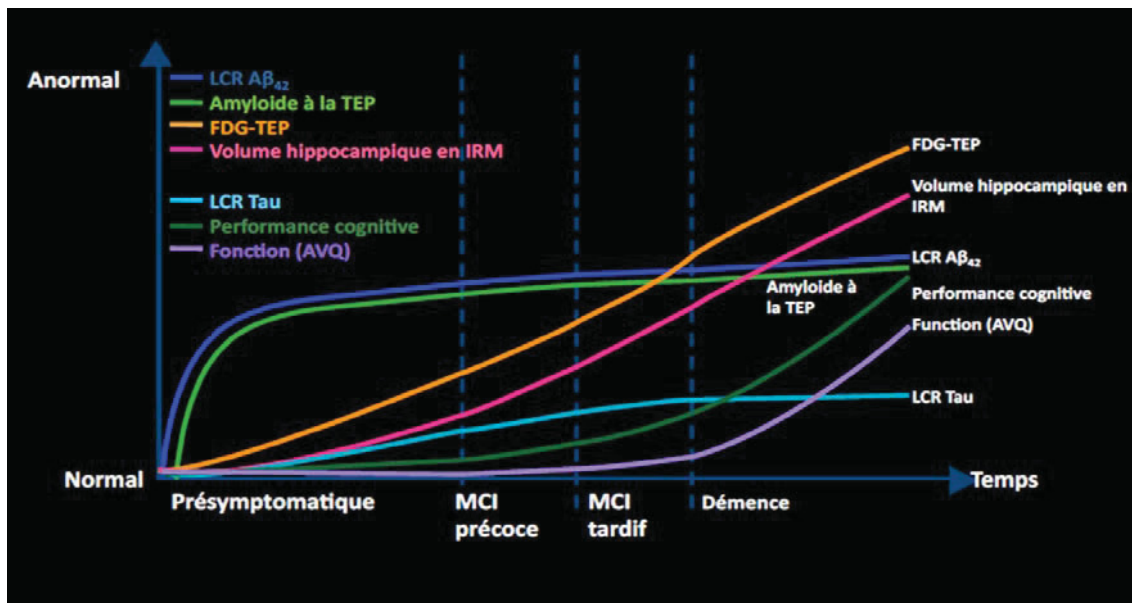
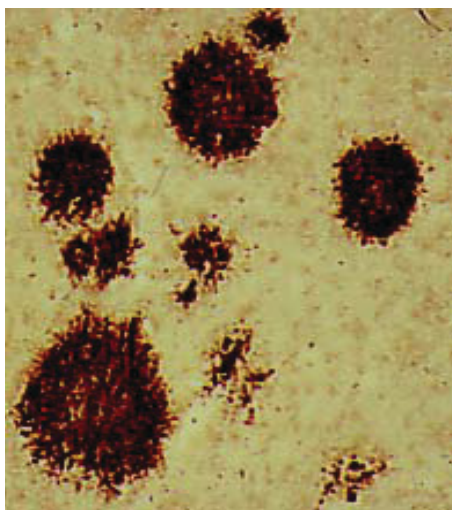


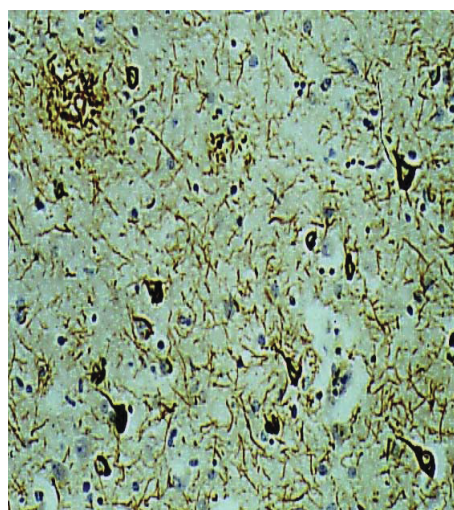
Figure 8 Trajectoires des biomarqueurs au cours de la progression de la MA.

Le peptide $A\beta_{42}$ dans le LCR et l'imagerie amyloïde reflètent l'accumulation des plaques amyloïdes et évoluent en tandem. L'accumulation des plaques amyloïdes précède le déclin cognitif et fonctionnel de plusieurs années et ne se modifie que progressivement, une fois que les symptômes se développent. Comparée à l' $A\beta_{42}$ dans le LCR et l'imagerie amyloïde, le volume hippocampique à l'IRM, le taux des protéines tau et le TEP-FDG sont les biomarqueurs les plus dynamiques de la progression de la maladie, à travers le spectre neurobiologique de la maladie. Le déclin cognitif devient évident dès le début du stade de MCI précoce, et s'accélère avec la progression de la maladie. Le déclin fonctionnel devient évident dès le stade de début de la démence (MCI tardif) et s'accélère avec la progression de la maladie. Tous ces points sont conjecturaux à des degrés divers et nécessitent une confirmation avec un suivi longitudinal à long terme. D'après Aisen et *al.* (2010) et Petersen (2010).

Or, malgré l'établissement de ces critères, le diagnostic de MA demeure un diagnostic de probabilité et la certitude n'est établie qu'à l'examen anatomo-pathologique post mortem par la présence de deux types de lésions : (i) les plaques amyloïdes dues à l'accumulation extracellulaire de peptide $A\beta$ et (ii) les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires liées à l'accumulation intraneuronale de protéine Tau hyperphosphorylée (Avramopoulos, 2009) (Figure 9).



Dépôts amyloïdes



Dégénérescences Neuro-Fibrillaire (DNF)

Figure 9 Lésions neuropathologiques de la Maladie d'Alzheimer.

IV. Recommandations pour le diagnostic de la MA

La Haute Autorité de Santé (HAS, 2011) et la fédération nationale des CMRR de France (Centres Mémoire de Ressources et de Recherche) (FCMRR, 2012) stipulent que le diagnostic étiologique de la MA doit être établi par un médecin spécialiste (neurologue, gériatre ou psychiatre) et doit reposer sur une collaboration multidisciplinaire. La réalisation des évaluations cognitive globale, fonctionnelle, thymique et comportementale est laissée à l'appréciation du binôme médecin spécialiste-médecin généraliste traitant. Elles peuvent être réalisées en partie par le médecin généraliste, en s'appuyant sur une équipe multidisciplinaire qualifiée, ou effectuées dans un centre mémoire.

Pour aboutir au diagnostic étiologique et définir l'élaboration du plan de soins et d'aides, la démarche devra s'appuyer sur un entretien avec le patient avec, après son accord, un accompagnant identifié capable de donner des informations fiables, un examen clinique, une évaluation fonctionnelle approfondie, une évaluation cognitive globale, une évaluation psychique et comportementale, une évaluation neuropsychologique et des examens paracliniques spécialisés.

1. L'interrogatoire

L'évaluation initiale peut être réalisée en une ou plusieurs consultations. Il est recommandé d'effectuer un entretien avec le patient et, si possible après son accord, avec un accompagnant identifié capable de donner des informations fiables.

L'entretien évalue le type et l'origine de la plainte et reconstitue l'histoire de la maladie avec le patient et son accompagnant, en recherchant le mode de début insidieux et l'évolution progressive des troubles. L'entretien recherche également d'éventuels changements de comportement et un retentissement des troubles sur les activités quotidiennes.

La recherche des antécédents médicaux porte notamment sur :

- les antécédents et les facteurs de risque cérébro-vasculaires ;
- les antécédents familiaux de maladie d'Alzheimer ou de maladies apparentées ;
- la prise de médicaments, d'alcool ou de toxique pouvant induire ou aggraver des troubles cognitifs ;
- les antécédents psychiatriques ;
- les antécédents traumatiques ;
- un syndrome confusionnel antérieur.

2. Examen clinique

L'évaluation initiale peut être réalisée en une ou plusieurs consultations. L'examen clinique doit apprécier :

- l'état général (poids) et cardio-vasculaire (hypertension artérielle, troubles du rythme cardiaque, etc.) ;
- les déficits sensoriels (visuel, auditif) et moteurs pouvant interférer avec la passation des tests neuropsychologiques ;
- le degré de vigilance (recherche d'une confusion mentale).

L'examen neurologique reste longtemps normal dans la maladie d'Alzheimer. L'existence de signes neurologiques (signe de Babinski, syndrome pseudo-bulbaire, réflexes archaïques, signes parkinsoniens, myoclonies, mouvements involontaires, troubles de l'oculo-motricité, troubles sphinctériens, troubles de la posture et de la marche, dysautonomie, etc.) doit faire évoquer un autre diagnostic que celui de maladie d'Alzheimer ou l'existence d'une comorbidité.

3. Evaluation fonctionnelle

L'évaluation initiale peut être réalisée en une ou plusieurs consultations. Le retentissement peut être apprécié à l'aide de l'échelle simplifiée des activités instrumentales de la vie quotidienne (IADL simplifiée) comportant les 4 items les plus

sensibles (utilisation du téléphone, utilisation des transports, prise de médicaments, gestion des finances) (Barberger-Gateau et *al.*, 1992, 1993). La nécessité d'une aide, du fait des troubles cognitifs, à au moins un de ces items constitue un retentissement significatif de ces troubles sur l'activité quotidienne du patient.

4. L'évaluation cognitive globale

L'évaluation initiale peut être réalisée en une ou plusieurs consultations. Il est recommandé d'effectuer une évaluation globale de manière standardisée à l'aide du Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein et *al.*, 1975) dans sa version consensuelle établie par le groupe de recherche et d'évaluation des outils cognitifs (GRECO) (Derouesné et *al.*, 1999 ; Kalafat et *al.*, 2003), qui ne préjuge d'aucune étiologie. L'âge, le niveau socioculturel, l'activité professionnelle et sociale, ainsi que l'état affectif (anxiété et dépression) et le niveau de vigilance du patient doivent être pris en considération dans l'interprétation de son résultat.

Il n'y a pas d'accord professionnel concernant le choix des autres tests de repérage à effectuer dans le cadre d'une évaluation des fonctions cognitives. Parmi les tests utilisés et de passation brève, on peut citer :

- des tests de mémoire : épreuve de rappel des 5 mots (Dubois et *al.*, 2002), Memory Impairment Screen (MIS) (Buschke et *al.*, 1999; De Rotrou et *al.*, 2007) ;
- d'autres tests de repérage : test de l'horloge (Manos, 1998), tests de fluence verbale (Cardebat et *al.*, 1990), etc.

5. Evaluation psychique et comportementale

L'entretien doit rechercher des troubles psycho-comportementaux ou une dépression (critères DSM-IV-TR), qui peut parfois se présenter sous l'aspect d'un syndrome démentiel, mais surtout peut accompagner ou inaugurer un syndrome démentiel. Cet entretien peut s'appuyer sur des échelles telle que la Geriatric Depression Scale (GDS) (Reisberg et *al.*, 1982). Cet entretien doit également apprécier le comportement du patient pendant l'examen et en situation de vie quotidienne, en recherchant des troubles affectifs, comportementaux ou d'expression psychiatrique (troubles du sommeil, apathie, dépression, anxiété, hyperémotivité, irritabilité, agressivité,

hallucinations, idées délirantes, etc...), qui peuvent être observés dans le cadre d'une maladie d'Alzheimer ou d'une maladie apparentée. Cet entretien peut être structuré à l'aide d'échelles tel que le NeuroPsychiatric Inventory (NPI) (Cummings et *al.*, 1994) et l'échelle de dysfonctionnement frontal (EDF) (Lebert et *al.*, 1998).

6. Evaluation neuropsychologique

Le choix des tests neuropsychologiques standardisés et validés à effectuer dans le cadre d'une consultation spécialisée est laissé à l'appréciation du professionnel qui les réalise. Le bilan neuropsychologique doit évaluer chacune des fonctions cognitives et tout particulièrement la mémoire épisodique, la mémoire sémantique, les fonctions exécutives, l'attention et les fonctions instrumentales (langage, communication, praxies, gnosies, fonctions visuo-constructives, calcul). Les tests appréciant notamment la mémoire épisodique verbale avec un apprentissage, comportant un contrôle de l'encodage, des rappels libres, indicés, immédiats et différés, ainsi qu'une reconnaissance, sont recommandés, par exemple le RL/RI-16 items (Van der Linden et *al.*, 2004), ou le RI-48 items (Adam et *al.*, 2004, 2007). L'investigation de chacune des fonctions cognitives permet de dresser un profil cognitif. Il met en évidence les fonctions qui présentent un déficit et le quantifie mais il précise également celles qui sont préservées.

7. Examens paracliniques

En présence d'un trouble cognitif avéré, il est recommandé d'orienter les examens paracliniques en fonction de l'hypothèse étiologique.

a. Examens biologiques

Le bilan biologique doit rechercher une éventuelle cause curable ou dépister une comorbidité. Il est recommandé de prescrire un dosage de la TSH, un hémogramme, une CRP, une natrémie, une calcémie, une glycémie, une albuminémie et un bilan rénal (créatinine et sa clairance). Si ces examens biologiques ont été pratiqués récemment pour une raison quelconque, il est inutile de les prescrire de nouveau.

Un dosage de vitamine B12, un dosage de folates, un bilan hépatique (transaminases, gamma GT), une sérologie syphilitique, VIH ou de la maladie de Lyme sont prescrits en fonction du contexte clinique.

b. Imagerie morphologique

Une imagerie cérébrale systématique est recommandée pour tout trouble cognitif avéré de découverte récente. Le but de cet examen est :

- de ne pas méconnaître l'existence d'une autre cause (processus expansif ou occupant intracrânien, hydrocéphalie à pression normale, séquelle d'accident vasculaire, etc.) ;
- d'objectiver une atrophie associée ou non à des lésions vasculaires.

Cet examen est une imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) avec des séquences T1, T2, T2* et FLAIR et des coupes coronales permettant de visualiser les hippocampes. À défaut une tomodensitométrie cérébrale est réalisée. Si une imagerie cérébrale a été récemment pratiquée, il n'est pas recommandé de la répéter en l'absence d'éléments susceptibles de la motiver.

c. Imagerie fonctionnelle

Dans des cas difficiles ou atypiques, certains examens paracliniques peuvent être proposés par les équipes spécialisées.

La réalisation systématique d'une imagerie par tomographie d'émission monophotonique (TEMP), d'une scintigraphie cérébrale avec le ioflupane [¹²³I] (DATscan®) ou d'une imagerie par tomographie par émission de positrons (TEP) n'est pas recommandée pour porter un diagnostic positif de MA. Une TEMP, voire une TEP, peut être demandée en cas de démence atypique, ou s'il existe un doute sur une dégénérescence fronto-temporale (DFT) ou autre atrophie focale. Un DATscan® peut être envisagé s'il existe un doute sur une démence à corps de Lewy (DCL).

d. Analyse du Liquide Céphalo Rachidien (LCR)

Une analyse standard du LCR (cellules, glucose, protéines, électrophorèse des protéines) est recommandée chez les patients avec une présentation clinique

atypique et/ou rapidement évolutive (suspicion de maladie inflammatoire, infectieuse, paranéoplasique ou de Creutzfeldt-Jakob).

Le dosage dans le LCR des protéines A β 42, Tubulin Associated Unit (TAU) totales, TAU phosphorylées peut être réalisé en cas de doute diagnostique et en particulier chez les patients jeunes.

e. Electroencéphalogramme (EEG)

La réalisation d'un électroencéphalogramme (EEG) n'est recommandée qu'en fonction du contexte clinique : crise comitiale, suspicion d'encéphalite ou d'encéphalopathie métabolique, suspicion de maladie de Creutzfeldt-Jakob, etc., ou en cas de confusion ou d'aggravation rapide d'une démence connue dans l'hypothèse d'un état de mal non convulsif.

f. Etude génétique

Le génotypage de l'apolipoprotéine E n'est recommandé ni comme test de dépistage de la maladie d'Alzheimer, ni comme test diagnostique complémentaire de la maladie d'Alzheimer.

Après consentement écrit, la recherche d'une mutation sur l'un des 3 gènes actuellement en cause (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) peut être réalisée chez les patients ayant des antécédents familiaux de démence évocateurs d'une transmission autosomique dominante. Si une mutation a été identifiée chez un patient, un diagnostic présymptomatique peut être réalisé chez les apparentés qui le souhaitent avec leur consentement écrit. Ce diagnostic présymptomatique ne peut être entrepris que dans le cadre d'une procédure d'information et de prise en charge se déroulant au sein d'une consultation multidisciplinaire de génétique.

g. La Biopsie cérébrale

La biopsie cérébrale peut permettre un diagnostic spécifique dans certaines démences de cause rare. Ce prélèvement ne doit être entrepris qu'exceptionnellement et dans des centres spécialisés.

Chapitre IV – Génétique de la maladie d’Alzheimer et Hypothèses Physiopathologiques

La maladie d’Alzheimer est une affection polyfactorielle, résultant de l’interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux.

Dès 1934, il était connu que certaines formes de la MA présentaient une cause génétique, avec un mode de transmission autosomique dominant (Lowenberg & Waggoner, 1934). Cependant, il aura fallu attendre les années 1980 pour la caractérisation des gènes impliqués. Ainsi, à ce jour quatre gènes ont été identifiés avec certitude comme étant impliqués dans l’étiologie de la MA. Des mutations des gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* sont responsables de formes monogéniques, et ne concernent que des formes familiales à début précoce (Bekris et al., 2010 ; Campion et al., 1999). Tandis que, dans la forme la plus commune de la maladie, forme sporadique à début tardif, il existe d’autres déterminants génétiques plus complexes et, à ce jour, si plus de 20 loci ont été identifiés comme étant associés à la MA, seul l’allèle E4 du gène de l’apolipoprotéine E (*APOE*), a été explicitement établi comme gène de susceptibilité (Avramopoulos, 2009 ; Campion et al., 1999).

Nous aborderons dans ce chapitre, les principaux gènes identifiés comme étant potentiellement impliqués dans la pathogénèse de la MA ainsi que les hypothèses physiopathologiques associées (Figure 10).

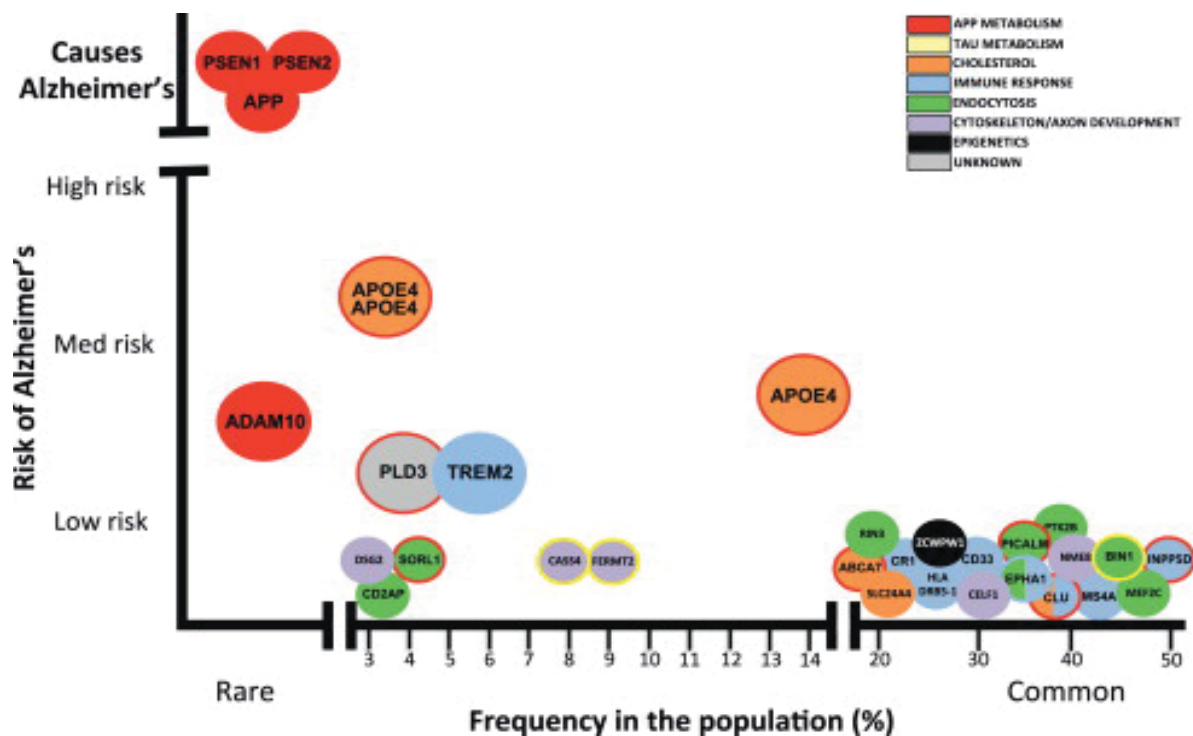


Figure 10 Variants communs et variants rares contribuant au risque de la maladie d'Alzheimer et mécanismes pathogéniques potentiels.

D'après Guerreiro et *al.* (2013), mise à jour par Karch & Goate (2015).

I. MA à début précoce (forme familiale)

1. Gène précurseur du peptide amyloïde (*APP*)

Le gène *APP* est situé sur le chromosome 21, et code la protéine précurseur du peptide amyloïde (Amyloid Precursor Protein). Ce gène a été placé au centre du processus pathologique de la MA d'une part, en raison de la découverte du composant principal des dépôts amyloïdes, le peptide A β , et d'autre part, en raison des similitudes neuropathologiques entre les patients atteints de trisomie 21 (syndrome de Down) et les patients atteints de la MA (St George-Hyslop et *al.*, 1987 ; Tanzi et *al.*, 1987).

Des mutations rares sur le gène de l'*APP* ont été identifiées comme impliquées dans la MA à début précoce (forme familiale). Ces mutations ont une pénétrance élevée. Elles sont pour la plupart liées à une transmission autosomique dominante et augmentent le taux relatif du peptide A β ₄₂, son agrégation et une apparition précoce de la maladie, généralement à partir de la quatrième ou cinquième décennie de vie. Toutes les mutations faux-sens du gène de l'*APP*, en raison de leur positionnement à l'intérieur ou à côté des

exons codant l'Aβ (exon 16 et exon 17) de l'*APP*, influencent la protéolyse de l'APP et/ou son agrégation (Mayeux & Stern, 2012). Par ailleurs, outre ces mutations ponctuelles, une duplication du gène de l'*APP* ou une microduplication sur un locus de l'*APP* ont également été décrites comme responsables de certaines formes autosomiques dominantes (Rovelet-Lecrux et *al.*, 2006).

Bien que des variants rares de ce type aient également été observés dans les familles de patients atteints de MA à début tardif (Athán et *al.*, 2001), les mutations sur le gène de l'*APP* représentent une fraction très faible (moins de 1% de tous les patients atteints de maladie d'Alzheimer).

2. Gène de la préséniline 1 (*PSEN1*)

Le gène *PSEN1* est situé sur le chromosome 14 et code la préséniline 1. C'est en 1995 qu'a été décrite pour la première fois l'existence de mutations pathogènes sur un gène jusque là inconnu, et dénommé préséniline 1 (Sherrington et *al.*, 1995).

A ce jour, plus de 182 mutations différentes sur le gène *PSEN1* chez 401 familles ont été décrites comme associées à la maladie d'Alzheimer. Ces mutations expliquent la majorité des formes autosomiques dominantes de la MA. La majorité des mutations sur *PSEN1* correspondent à la substitution d'un seul nucléotide, mais des petites insertions ou délétions ont également été décrites. *PSEN1* participe au complexe γ-sécrétase. De ce fait, les mutations sur *PSEN1* modifient le clivage protéolytique de l'APP médié par la γ-sécrétase, ce qui entraîne une augmentation relative de peptides Aβ₄₂ toxiques par rapport aux peptides Aβ₄₀ (augmentation du rapport Aβ₄₂/Aβ₄₀ par augmentation des peptides Aβ₄₂ et/ou une diminution des peptides Aβ₄₀), suggérant un mécanisme par perte de fonction partielle plutôt que par gain de fonction (Murayama et *al.*, 1999 ; Tanzi, 2012 ; Walker et *al.*, 2005).

3. Gène de la préséniline 2 (*PSEN2*)

Le gène *PSEN2* est situé sur le chromosome 1 et code la préséniline 2. C'est également en 1995 que Levy-Lahad et *al.* (1995a,b) ont montré l'existence d'un locus situé sur le chromosome 1, impliqué dans la MA. La mise en évidence d'une très forte homologie de séquence entre un ADN complémentaire issu de ce locus et le gène *PSEN1* a alors conduit à nommer ce gène *PSEN2*.

A ce jour, seules 14 mutations sur le gène *PSEN2* ont été rapportées chez 23 familles. Ces mutations sont responsables des formes autosomiques dominantes de la MA. De façon similaire à ce qui a été observé pour le gène *PSEN1*, certaines de ces mutations entraîneraient une augmentation relative de peptides A β ₄₂ toxiques par rapport aux peptides A β ₄₀ (Murayama et al., 1999 ; Tanzi, 2012 ; Walker et al., 2005) (Tableau 2).

Tableau 2 Gènes/Loci impliqués dans la MA à début précoce et hypothèses physiopathologiques.

	Gènes/Loci	Chr	Principales altérations	Mécanismes physiopathologiques
MA à début précoce	<i>APP</i>	21	Mutations, duplication	Production accrue d'A β
	<i>PSEN1</i>	14	Mutations	Production accrue d'A β (activité γ -sécrétase)
	<i>PSEN2</i>	1	Mutations	Production accrue d'A β (activité γ -sécrétase)

Chr = chromosome, MA = Maladie d'Alzheimer, A β = peptide amyloïde β .

4. Hypothèse physiopathologique ou hypothèse de la cascade amyloïde

Bien que les mutations de ces trois gènes représentent des causes rares de la MA, leur découverte appuie grandement un rôle pivot du peptide A β dans la pathogenèse de cette maladie. En effet, la découverte des mutations responsables de formes monogéniques de la MA, le lien de causalité entre mutations, fonctions des gènes mutés et développement de la maladie a donné lieu à l'émergence d'une hypothèse physiopathologique qui a permis d'orienter notre compréhension de la MA : l'hypothèse de la cascade amyloïde.

Cette hypothèse, s'appuyant sur le fait que les mutations pathogènes soient systématiquement associées à une modification du métabolisme de la protéine APP, et plus particulièrement à une surproduction relative de peptides neurotoxiques A β ₄₂, a placé ce métabolisme au centre du processus pathologique. Selon cette hypothèse, ce serait la surproduction relative de ces peptides A β ₄₂ qui conduirait à la dégénérescence neuro-fibrillaire, puis à la mort neuronale (Hardy, 1997 ; Hardy & Selkoe, 2002) (Figure 11).

Néanmoins, les processus neurodégénératifs pourraient également résulter d'un déséquilibre entre la production et la clairance de peptides A β , ce qui suggère que d'autres gènes impliqués dans ces voies pourraient également s'avérer être des facteurs de risque.

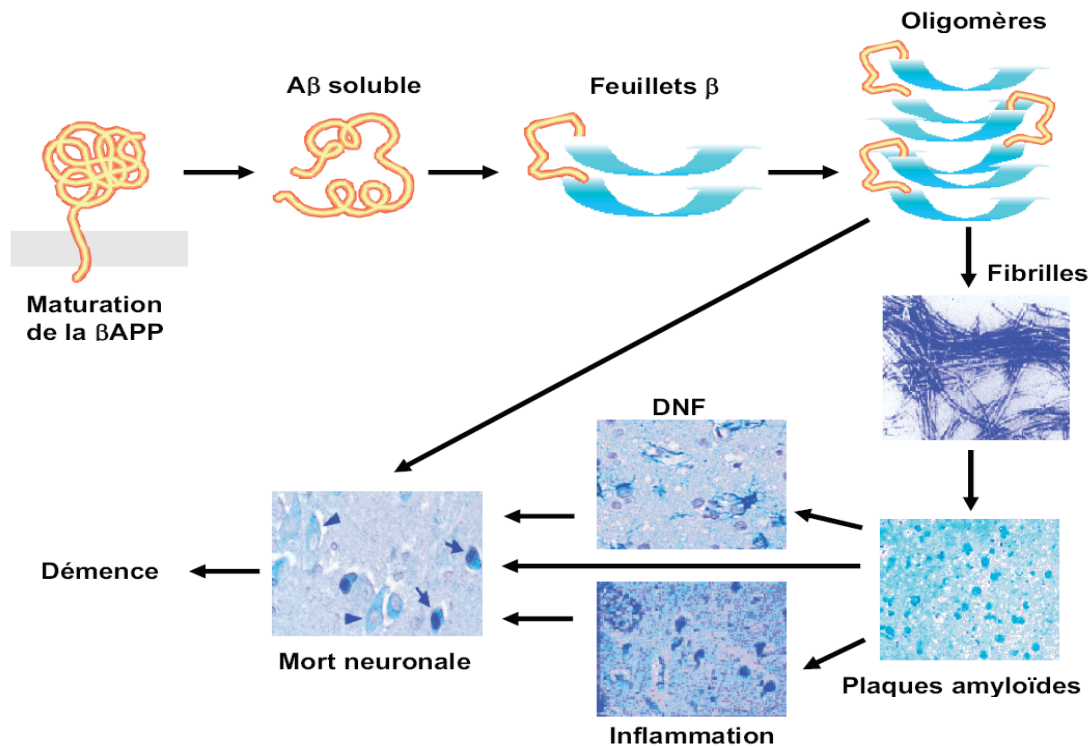


Figure 11 Hypothèse de la cascade amyloïde.

Les données génétiques, biochimiques et neuropathologiques suggèrent que l'aggrégation du peptide Aβ est au cœur de l'initiation du processus pathogénique de la maladie (Hardy & Selkoe, 2002). Par ailleurs, d'une part, la dégénérescence neurofibrillaire est fortement corrélée à un dysfonctionnement neuronal et à la progression de la maladie et d'autre part, la phase clinique de la maladie est marquée par une perte synaptique, une mort neuronale sélective, une perte des neurotransmetteurs et une neuroinflammation (Holtzman et *al.*, 2011).

II. La MA à début tardif (forme sporadique)

1. Gène de l'Apolipoprotéine E (*APOE*)

C'est en 1993 qu'a été rapportée, pour la première fois, l'association du gène *APOE* avec la MA (Strittmatter et *al.*, 1993). Le gène *APOE* est situé sur le chromosome 19q13.2. Il présente trois allèles majeurs, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, et $\epsilon 4$. L'allèle $\epsilon 3$, le plus fréquent chez les caucasiens (80%), est caractérisé au niveau de la protéine par une arginine au codon 112 et une cystéine au codon 158. L'allèle $\epsilon 4$ (12%) diffère au niveau protéique par une

arginine au codon 158, et l'allèle $\epsilon 2$ (8%) par une cystéine au codon 112. Les isoformes correspondantes sont respectivement APOE2, APOE3 et APOE4.

L'allèle $\epsilon 3$ est considéré comme un allèle neutre, l'allèle $\epsilon 2$ comme un allèle protecteur et l'allèle $\epsilon 4$ comme un allèle à risque élevé. Par ailleurs, il existe une relation dose-effet d'une part, entre le nombre de copies de l'allèle $\epsilon 4$ chez un individu et le risque de développer l'affection (risque relatif = 3,2 et 14,9 pour $\epsilon 3 \epsilon 4$ et $\epsilon 4 \epsilon 4$, respectivement) (Farrer et *al.*, 1997) et d'autre part, avec l'âge du début de la maladie (Corder et *al.*, 1993). APOE est un régulateur du métabolisme des lipoprotéines (Mahley, 1988) qui joue plusieurs rôles dans le système nerveux central, tels que le transport du cholestérol, la neuroplasticité et l'inflammation (Kim et *al.*, 2009a).

Plusieurs hypothèses physiopathologiques ont été proposées quant à l'implication de l'APOE dans le processus physiopathologique de la MA.

Hypothèse de la cascade amyloïde :

L'existence d'une corrélation entre la présence de l'allèle $\epsilon 4$ et une augmentation des dépôts amyloïdes laisse penser que l'APOE est un déterminant essentiel de la formation des dépôts amyloïdes et qu'il faille intégrer l'APOE dans l'hypothèse de la cascade amyloïde. En effet, APOE influence de façon directe ou indirecte la formation des dépôts amyloïdes. Les arguments les plus forts ont été obtenus dans des modèles de souris transgéniques, où il a été démontré qu'un nombre croissant de copies du gène *APOE* humain faisait baisser la quantité de dépôts amyloïdes (Holtzman et *al.*, 1999, 2000 ; Fagan, 2002). Koistinaho et *al.* (2004) ont suggéré que l'APOE intervenait dans un premier temps dans la dégradation du peptide amyloïde. Cette hypothèse a été confortée par les travaux menés sur l'expression de l'APOE au niveau du tissu cérébral, où la quantité d'ARNm issus du gène *APOE* était inversement corrélée à la quantité de dépôts amyloïdes (Lambert et *al.*, 2005). De plus, des polymorphismes entraînant une diminution de l'expression de ce gène étaient associés à une augmentation de la quantité des dépôts amyloïdes et du risque de développer la MA (Lambert et *al.*, 2001, 2002, 2005).

Inversement, les études neuropathologiques et de neuro-imagerie ont démontré que la présence de l'allèle *APOE* $\epsilon 4$ était corrélée à une augmentation et à une accélération des dépôts amyloïdes, facilitant ainsi l'amyloïdogénèse (Morris et *al.*, 2010 ; Rebeck et *al.*, 1993 ; Reiman et *al.*, 2009). Par ailleurs, d'autres études ont montré une corrélation entre le génotype *APOE* et la quantité de peptides A β_{42} et de la protéine tau dans le LCR (Cruchaga et *al.*, 2013 ; Kauwe et *al.*, 2010 ; Morris et *al.*, 2010).

Enfin, toujours dans le cadre de l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'APOE pourrait jouer un rôle essentiel aussi bien au niveau du métabolisme de l'APP via son rôle majeur dans le transport du cholestérol (Koudinov et *al.*, 1998), qu'au niveau de la prise en charge de la toxicité du peptide amyloïde (Holtzman, 2001), notamment à travers ses interactions avec certains récepteurs comme LRP1 (Lipoprotein Receptor-related Protein 1) (Verghese et *al.*, 2013). En effet, APOE en se liant aux peptides A β neurotoxiques influencerait la clairance et, par conséquent, l'agrégation des peptides A β (Castellano et *al.*, 2011 ; Kim et *al.*, 2009).

Autres hypothèses :

Certains auteurs ont proposé que l'APOE4 pourrait favoriser ou provoquer une altération de la croissance de l'arborisation neuritique (Nathan et *al.*, 1994), augmenter le stress oxydant (Miyata et *al.*, 1996), favoriser l'hyperphosphorylation des protéines tau (Strittmatter et *al.*, 1994), exercer une toxicité propre via les produits de son métabolisme (Crutcher et *al.*, 1994), ou provoquer une altération des fonctions mitochondriales (Gibson et *al.*, 2000).

2. Gène de la clustérine (CLU)

Le gène *CLU* est situé sur le chromosome 8p21.1 et code la clustérine qui est une apolipoprotéine portant plusieurs noms : Dimeric Acid glycoprotein (DAG), Testosterone repressed prostate message-2 (TRPM-2), sulfated glycoprotein 2 (SGP-2), et complément lysis inhibitor (CLI). Il existe 2 isoformes (1 et 2) avec des actions antagonistes concernant l'apoptose. L'isoforme 2 est surexprimé dans des conditions de stress cellulaire et exerce un effet protecteur contre l'apoptose. La clustérine est également impliquée dans plusieurs processus biologiques tels que le transport lipidique, la protection membranaire, la régulation de la voie du complément, l'adhésion cellulaire et l'apoptose (Jones & Jomary, 2002). Elle est présente au niveau du plasma, des urines, du lait, du LCR, et du sperme.

Les études d'association pangénomiques (GWAS) ont permis de mettre en évidence des associations entre certains SNPs et la MA à début tardive. Tandis que les SNPs rs11136000, rs9331888, rs2279590, rs7982 et rs7012010 seraient associés à une diminution du risque (Harold et *al.*, 2009 ; Hollingworth et *al.*, 2011 ; Lambert et *al.*, 2009 ; Naj et *al.*, 2011), rs9331896 augmenterait le risque de MA à début tardif (Lambert et *al.*, 2013). Néanmoins, l'impact fonctionnel de ces polymorphismes reste mal compris. Le

SNP rs9331888 serait associé à l'expression d'un variant d'épissage alternatif (Castellano et al., 2011), tandis que rs11136000 et rs9331888 seraient associés à la concentration de clustérine plasmatique (Schurmann et al., 2011 ; Szymanski et al., 2011 ; Xing et al., 2012).

En effet, plusieurs études ont montré que des concentrations élevées de clustérine plasmatique étaient associées à une atrophie cérébrale, à la progression et à la sévérité de la maladie (Kiddle et al., 2014 ; Schrijvers et al., 2011 ; Thambisetty et al., 2010). Avant même l'identification du risque associant MA et clustérine par les GWAS, certaines études avaient montré une expression élevée de l'ARNm de la clustérine au niveau du cerveau de sujets atteints de MA (Allen et al., 2012 ; Karch et al., 2012), et la clustérine était détectée dans les plaques amyloïdes (Calero et al., 2000 ; May et al., 1990). Par ailleurs, il a été démontré in vitro que la clustérine purifiée interagissait avec le peptide A β et influençait la formation des fibrilles (Matsubara et al., 1995 ; Matsubara et al., 1996 ; Oda et al., 1995). Dans ce sens, une autre étude a montré que les souris transgéniques déficientes en clustérine présentaient moins de fibrilles, moins de dystrophie neuritique et des concentrations anormales de peptides A β solubles (Demattos et al., 2002). La clustérine serait donc susceptible d'influencer la clairance des peptides A β , les dépôts amyloïdes et la neurotoxicité.

Par ailleurs, la clustérine joue également un rôle dans la voie du complément. En effet, elle module le complexe d'attaque membranaire (MAC), où elle inhibe la réponse inflammatoire associée à l'activation du complément (Jones & Jomary, 2002). Comme la neuroinflammation est une des caractéristiques de la MA, les SNPs qui altèrent l'expression ou les fonctions de la clustérine comme agent de réponse amyloïde, pourraient affecter la pathogénèse de la MA et ses effets en aval (Karch & Goate, 2015).

3. Gène Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (*PICALM*)

Le gène *PICALM* est situé sur le chromosome 11q14 et code une protéine d'assemblage de la clathrine. Cette protéine recrute la clathrine et un complexe de protéines adaptatrices (AP2) vers les membranes cellulaires, où elle joue un rôle important dans la détermination de la quantité de membranes à recycler, via la régulation de la taille de la cage de clathrine (Baig et al., 2010). *PICALM* est exprimé majoritairement au niveau des neurones (Xiao et al., 2012) où il joue un rôle essentiel dans la fusion des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique, via le transport des protéines membranaires

associées aux vésicules VAMP2 (vesicle-associated membrane protein) (Harel et *al.*, 2008).

Les études d'association pangénomiques (GWAS) ont montré qu'il existait une association entre *PICALM* et MA à début tardif, notamment au niveau de 2 SNPs, rs3851179 et rs541458 (Harold et *al.*, 2009 ; Lambert et *al.*, 2009 ; Lambert et *al.*, 2013), en l'occurrence les effets de ces 2 SNPs restent à déterminer. Néanmoins, certaines études suggèrent que *PICALM*, de par son rôle essentiel dans l'endocytose et dans la fonction synaptique, interviendrait dans le processus physiopathologique de la MA. D'une part, l'endocytose serait essentielle dans le processus normal de l'APP qui est au cœur de la pathogénèse de la MA (Karch & Goate, 2015). D'autre part, l'activité synaptique et la libération des neurotransmetteurs seraient altérées dans la MA (Holtzman et *al.*, 2011). Dans ce sens, Xiao et *al.* (2012) ont montré qu'une perturbation de l'expression de *PICALM* *in vitro* altérerait le transport de l'APP, et qu'une surexpression de *PICALM* *in vivo* augmentait les dépôts de plaques amyloïdes chez la souris transgénique. Une autre étude suggère que *PICALM*, en se liant aux autophagosomes, jouerait également un rôle dans la clairance des peptides A β médiée par l'autophagie (Tian et *al.*, 2013).

4. Gène Bridging integrator (*BIN1*)

Le gène de *BIN1* est situé sur le chromosome 2q14.3 et code plusieurs isoformes d'une protéine adaptatrice nucléocytoplasmique (Ren et *al.*, 2006). Les isoformes exprimés au niveau du système nerveux central seraient impliqués dans la régulation de l'endocytose (vésicules synaptiques), la réponse immunitaire et l'homéostasie calcique. En effet, *BIN1* interagit avec la clathrine et AP2/ α -adaptine (complexe de protéines adaptatrices) et se lie aux membranes lipidiques, induisant une déformation membranaire (McMahon et *al.*, 1997 ; Ramjaun et *al.*, 1998 ; Tsutsui et *al.*, 1997). Les études d'association pangénomiques ont également montré une association entre *BIN1* et le risque de MA (Biffi et *al.*, 2010 ; Harold et *al.*, 2009 ; Lambert et *al.*, 2009 ; Naj et *al.*, 2011). Mais bien que *BIN1* ait des fonctions pertinentes à plusieurs niveaux de la pathogénèse de la MA, le rôle exact de *BIN1* et de sa variante fonctionnelle associée à la MA n'est pas résolu.

En effet, plusieurs hypothèses sont avancées : *BIN1* pourrait jouer un rôle dans le processus de tauopathie en interagissant avec d'autres protéines associées aux microtubules (CLIP-170) (Meunier et *al.*, 2009). D'autres études ont montré que *BIN1*

serait impliqué dans l'endocytose médiée par la clathrine et le transport endocellulaire des endosomes pouvant ainsi modifier le trafic de l'APP (routage) (Pant et *al.*, 2009 ; Thinakaran & Koo, 2008). Enfin, BIN1 serait impliqué dans la phagocytose par les macrophages et se lie aux α -intégrines, qui régulent la réponse immunitaire (Wixler et *al.*, 1999).

5. Gène Sortilin-related receptor L (*SORL1*)

Le gène *SORL1* (Sortilin-related receptor L) est situé sur le chromosome 11q23.2 et code une mosaïque de protéines qui appartiennent à au moins deux familles, VPS-10 (vacuolar protein sorting) et LDLR (Low Density lipoprotein receptor). Lambert et *al.* (2013) ont montré que le SNP rs11218343 situé à proximité de *SORL1* était associé au risque de MA.

Plusieurs hypothèses ont été formulées. D'une part, SORL1 dirige l'APP vers les voies d'endocytose en vue d'un recyclage (Rogaeva et *al.*, 2007), et jouerait un rôle important dans la génération des peptides A β (Offe et *al.*, 2006 ; Schmidt et *al.*, 2007 ; Spoelgen et *al.*, 2006). Dans ce sens, une étude réalisée chez des souris déficientes en *SORL1* retrouvait des concentrations élevées de peptides A β (Dodson et *al.*, 2008), tandis que d'autres études montraient que l'expression de l'ARNm SORL1 était diminuée dans le cerveau de sujets atteints de MA (Dodson et *al.*, 2006 ; Sager et *al.*, 2007 ; Scherzer et *al.*, 2004). D'autre part, SORL1 étant aussi un récepteur liant les lipoprotéines dont APOE, il intervient dans son absorption par les voies d'endocytose (Rogaeva et *al.*, 2007). De ce fait, le rôle de SORL1 dans le contrôle du clivage de l'APP et de l'absorption d'APOE semble critique pour le maintien des fonctions de signalisation au niveau cérébral.

6. Gène ATP-binding cassette, sub-family A transporter A7 (*ABCA7*)

Le gène *ABCA7* (ATP-binding cassette, sub-family A, transporter A7) est situé sur le chromosome 19q13.3, et peut subir un épissage alternatif pouvant générer deux produits de transcription qui sont tous les deux exprimés dans le cerveau (Ikeda et *al.*, 2003). Ce gène code une protéine faisant partie de la superfamille des transporteurs (ABC), jouant un rôle dans le transport des substrats à travers les membranes cellulaires (Kim et *al.*, 2008). Plusieurs SNPs situés à proximité du gène *ABCA7* ont été identifiés par les études d'association pangénomiques (GWAS) comme étant associés au risque de MA à début tardif (rs3764650, rs4147929) (Harold et *al.*, 2009 ; Hollingworth et *al.*, 2011 ; Lambert et

al., 2013 ; Liao et *al.*, 2014 ; Naj et *al.*, 2011). Cependant, l'impact de ces polymorphismes sur la fonction d'ABCA7 demeure inconnu (Karch et *al.*, 2012 ; Vasquez et *al.*, 2013), bien que plusieurs hypothèses aient été formulées à partir d'études montrant que *ABCA7* était exprimé au niveau de l'hippocampe et à des niveaux d'expression dix fois plus élevés au niveau des cellules microgliales d'une part (Kim et *al.*, 2006), et que l'expression de l'ARNm d'*ABCA7* dans les autopsies de cerveaux de sujets atteints de MA était associée à un déclin cognitif avancé d'autre part (Kiddle et *al.*, 2014 ; Vasquez et *al.*, 2013). Par ailleurs, des études ont montré qu'*ABCA7* stimulait la mobilisation du cholestérol et inhibait la sécrétion de peptides A β in vitro (Chan et *al.*, 2008) et que les souris déficientes en *ABCA7* présentaient des dépôts élevés de peptides A β (Kim et *al.*, 2013).

D'autres études ont montré qu'*ABCA7* jouait un rôle dans la régulation de la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages via le C1q de la voie du complément (Jehle et *al.*, 2006) et qu'une expression élevée d'*ABCA7* augmentait la phagocytose microgliale des cellules apoptotiques et des peptides A β (Jehle et *al.*, 2006 ; Kim et *al.*, 2013 ; Tanaka et *al.*, 2011a,b).

De ce fait, *ABCA7* pourrait influencer le risque de MA via le transport du cholestérol (transfert du cholestérol à l'APOE) ou via la clairance des peptides A β (Chan et *al.*, 2008 ; Kim et *al.*, 2013 ; Wildsmith et *al.*, 2013).

7. Gène récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes 2 (*TREM2*)

Le gène *TREM2* (Triggering Receptor Expressed on myeloid Cells 2) est situé sur le chromosome 6q21.1 et code une protéine membranaire qui forme un complexe de récepteurs de signalisation avec le TYROBP (Tyrosine Kinase binding Protein) (Colonna, 2003).

De rares mutations faux-sens dans le gène *TREM2* ont été rapportées comme augmentant le risque de MA à début tardif. La variante la plus commune décrite dans les populations d'origine européenne, R47H (rs75932628) augmenterait le risque de MA de deux fois (Benitez et *al.*, 2013 ; Bertram et *al.*, 2013 ; Giraldo et *al.*, 2013 ; Guerreiro et *al.*, 2013 ; Jonsson et *al.*, 2013). Cependant, il persiste un débat sur le risque conféré chez les sujets *TREM2* R47H (risque allant de 1,7 à 3,4) (Guerreiro & Hardy, 2013 ; Pottier et *al.*, 2013). Ces résultats impliquent fortement la variante *TREM2* dans la pathogénèse de la MA. Compte tenu du rôle anti-inflammatoire de *TREM2* dans le cerveau, la

substitution R47H pourrait conduire à une prédisposition accrue à la MA par l'altération des processus inflammatoires. Bien que ce variant se produise moins fréquemment que l'allèle *ApoEε4*, elle confère un risque de la MA similaire à celui de l'ApoE ε4 (Jiang et al., 2013b). Par ailleurs, TREM2 est fortement exprimé au niveau de la substance blanche, de l'hippocampe et du neocortex, ce qui est en partie compatible avec les caractéristiques neuropathologiques de la MA (Jiang et al., 2013b), indiquant l'implication possible de TREM2 dans la pathogénèse de la MA. En effet, compte tenu de l'implication de TREM2 dans le rôle phagocytaire des cellules microgliales sur les plaques amyloïdes, il est possible que la réduction de l'activité du TREM2 causée par la substitution R47H, puisse conduire à la MA, par l'incapacité du cerveau à éliminer les produits toxiques (clairance).

TREM2 pourrait donc avoir un rôle dans l'inflammation chronique et pourrait stimuler la production de chimiokines et cytokines (Jiang et al., 2013b). Elle aurait également un rôle dans le déclenchement de l'activation de la réponse immunitaire dans les macrophages et les cellules dendritiques.

8. Gène Siglec 3 (CD33)

Le gène Siglec 3 (CD33) est situé au niveau du chromosome 19q13.3 et code la protéine CD33 qui fait partie de la famille de récepteurs appelés « member of the sialic acid-binding Ig-like lectin family of receptors », protéine exprimée au niveau des cellules myéloïdes et des cellules microgliales (Crocker et al., 1997 ; Griciuc et al., 2013 ; Malik et al., 2013).

Dans la MA à début tardif, les études d'association pangénomiques ont identifié un SNP à proximité de *CD33*, rs3865444, comme réduisant le risque de la maladie (Bertram et al., 2008 ; Hollingworth et al., 2011 ; Naj et al., 2011). Ce SNP était associé à une augmentation de délétion de l'exon 2 de *CD33* (Malik et al., 2013). Par ailleurs, Malik et al. (2013) ont montré que rs12459419 régulait l'efficacité de l'épissage de l'exon 2 sur *CD33*, et que l'épissage de *CD33* influençait l'activation des cellules microgliales. Dans ce sens, CD33 pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de la MA via la clairance des peptides Aβ, ou les voies de la neuroinflammation médiées par les cellules microgliales. En effet, il a été démontré que l'expression de l'ARNm de *CD33* était augmentée dans les cellules microgliales et dans le cerveau proportionnellement au déclin cognitif d'une part (Griciuc et al., 2013 ; Karch et al., 2012), et que l'allèle mineur de rs3865444 était associé

à une diminution de l'expression de l'ARNm *CD33* et de la concentration d'Aβ42 insoluble dans le cerveau de sujets atteints de MA, d'autre part (Griciuc et *al.*, 2013).

9. *MS4A* (Membrane-Spanning 4-domains sub family A)

MS4A (Membrane spanning 4-domains subfamily A) est un locus contenant plusieurs gènes associés à la réponse inflammatoire : *MS4A4A* (Membrane-Spanning 4-domains sub family A, member 4A), *MS4A4E* (Membrane-Spanning 4-domains sub family A, member 4E), et *MS4A6E* (Membrane-Spanning 4-domains sub family A, member 4E), situés au niveau du chromosome 11. Ces gènes sont exprimés au niveau des cellules myéloïdes et des monocytes. Bien que cette famille de gènes reste mal caractérisée, *MS4A* est structurellement similaire à CD20 (Howie et *al.*, 2009).

Les études d'association pangénomiques ont montré que rs983392 situé à proximité de *MS4A6E* était associé à un risque diminué de MA, alors que rs670139 situé à proximité de *MS4A4E* était associé à un risque élevé (Hollingworth et *al.*, 2011 ; Lambert et *al.*, 2013 ; Naj et *al.*, 2011). Par ailleurs, une autre étude a montré que l'expression de l'ARNm *MS4A6E* et rs670139 était associée aux dépôts amyloïdes et à la dégénérescence neurofibrillaire (Karch et *al.*, 2012). Cependant, la signification fonctionnelle de ces SNPs n'est à ce jour pas élucidée, bien que la similitude structurelle avec CD20 suggère que *MS4A* interviendrait dans la pathogénèse de la MA via la réponse immunitaire.

10. Gène Ephrin type-A receptor 1 (*EPHA1*)

Le gène *EPHA1* (Ephrin Type-A receptor 1) est situé sur le chromosome 7q34 et fait partie de la sous-famille des récepteurs de l'ephrine et de la famille des récepteurs thyrosine kinase (Yamazaki et *al.*, 2009). Les études d'association pangénomiques ont montré une association entre *EPHA1* et la MA notamment au niveau de deux SNPs : rs11767557 situé à proximité d'*EPHA1* (Hollingworth et *al.*, 2011 ; Naj et *al.*, 2011) et rs11771145 (Lambert et *al.*, 2013). En l'occurrence, bien qu'aucune signification fonctionnelle de ces SNPs n'ait été démontrée à ce jour (Karch et *al.*, 2012), certains auteurs supposent que malgré le fait que le SNP le plus fortement associé à la MA soit proche d'*EPHA1*, il existe plusieurs autres gènes en déséquilibre de liaison dans la région définie par ce SNP, et de ce fait, que le SNP fonctionnel pourrait être dans *EPHA1* ou affecter l'expression d'un de ces gènes voisins (Karch & Goate, 2015).

Néanmoins, certaines études suggèrent que EPHA1 pourrait intervenir dans la pathogénèse de la MA notamment grâce à son rôle dans le guidage axonal et la plasticité synaptique (Lai & Ip, 2009 ; Martinez et *al.*, 2005) et par le fait qu'il soit exprimé par les lymphocytes T CD4+ et monocytes (Sakamoto et *al.*, 2011).

11. Gène CD2-Associated protein (*CD2AP*)

Le gène *CD2AP* (CD2-Associated protein) est situé sur le chromosome 12p12.3 et code une protéine de structure impliquée dans la réorganisation du cytosquelette et le transport intracellulaire (Dustin et *al.*, 1998). Trois SNPs, rs9296559, rs 9349407 et rs 10948363, ont été identifiés comme étant associés à la MA (Hollingworth et *al.*, 2011 ; Naj et *al.*, 2011). La signification fonctionnelle de ces SNPs n'est pas identifiée à ce jour, d'autant que l'expression de l'ARNm *CD2AP* n'est pas altérée dans le cerveau des sujets atteints de MA (Karch et *al.*, 2012). Cependant, certains auteurs supposent que *CD2AP* interviendrait dans la pathogénèse de la MA via l'endocytose (Karch & Goate, 2015). En effet, il a été démontré chez la souris transgénique déficiente en *CD2AP* que la fonction lysosomale était altérée, suggérant que *CD2AP* serait un régulateur essentiel du transport des vésicules au lysosome (Cormont et *al.*, 2003).

12. Gène Phospholipase D family, member 3 (*PLD3*)

Le gène *PLD3* (Phospholipase D family, member 3) est situé sur le chromosome 19q13.2 et son épissage alternatif conduit à la production de 25 transcripts. Bien que le gène *PLD*, code des protéines (enzymes) qui catalysent l'hydrolyse des phospholipides membranaires, le gène *PLD3* reste mal caractérisé et « non classique », sans activité catalytique (Munck et *al.*, 2005). Cruchaga et *al.* (2014), ont identifié un variant rare (*PLD3* V232M) comme associé à la MA, mais le mécanisme par lequel *PLD3* interviendrait dans la MA reste inconnu (Cruchaga et *al.*, 2014), néanmoins, il est proposé que comme les protéines *PLD* classiques catalysent l'hydrolyse de la phosphatidylcholine pour produire l'acide phosphatidique, qui agit comme un effecteur dans l'endocytose (McDermott et *al.*, 2004), *PLD3* pourrait de ce fait être impliqué dans la pathogénèse de la MA (Cai et *al.*, 2006a,b ; Jin et *al.*, 2007 ; Oliveira et *al.*, 2010).

13. Gène ADAM Metallopeptidase domain 10 (*ADAM10*)

Le gène *ADAM10* (A desintegrin and metallopeptidase domain 10) est situé sur le chromosome 15. Ce gène code une famille de protéines (ADAM) qui clivent de nombreuses protéines dont TNF- α et E-cadherine. Les membres de la famille ADAM sont des protéines de surface cellulaire, impliquées dans la régulation de fonctions cellulaires variées telles que l'adhérence, la migration, la fusion ou la prolifération cellulaire (Wolfsbergt et *al.*, 1993). Elles sont également liées à des processus fonctionnels tels que la différenciation des cellules nerveuses et le guidage axonal. Kim et *al.* (2009b) ont rapporté que deux mutations rares, Q170H et R181G, étaient associées à un risque élevé de MA. Dans ce sens, Suh et *al.* (2013) ont montré que ces deux mutations atténuent l'activité des α -sécrétases et transféraient le métabolisme de l'APP vers un clivage par les β -sécrétases, suggérant qu'*ADAM10* joue un rôle dans la pathogénèse de la MA, via une diminution de l'activité des α -sécrétases, et donc une augmentation de la production des peptides amyloïdes.

14. Autres gènes (*CASS4*, *HLA-DRB5-DRB1*, *INPP5D*, *PTK2B*, *MEF2C*, *CELF1*, *NME8*, *EXOC3L2*, *DSG2*, *FERMT2*, *SLC24H4-RIN3*, *ZCWPW1*)

De nombreux autres loci ont été identifiés comme étant associés à la MA dont *CASS4* (cas scaffolding protein family member 4), *HLA-DRB5-DRB1* (major histocompatibility complex class II bêta 5 and bêta 1), *INPP5D* (inositol polyphosphate-5-phosphatase), *PTK2B* (protein Thyrosine Kinase 2 beta), *MEF2C* (myocyte enhancer factor 2C) , *CELF1* (CUG triplet repeat, Elav-Like Family member 1), *NME8* (NME family, member 8), *EXOC3L2* (Exocyst Complex component 3-Like-2), *DSG2* (Desmoglein 2), *FERMT2* (Fermitin family 2), *SLC24H4-RIN3* (solute carrier family 24-Ras and rab Interactor 3), et *ZCWPW1* (Zinc finger, CW type, with PWWP domain 1) (Lambert et *al.*, 2013).

Cependant, le rôle de ces gènes dans la pathogénèse de la MA est moins bien connu car plusieurs de ces loci de susceptibilité se produisent dans des régions de gènes denses. De ce fait, il est difficile d'établir lequel de ces gènes est responsable de cette association.

Toutefois, ces gènes pourraient être impliqués via des voies connues comme perturbées au cours de la MA. En effet, *CASS4* (cas scaffolding protein family member 4) aurait un rôle dans le métabolisme de l'APP et de la protéine tau, le transport axonal et la fonction synaptique (Lambert et *al.*, 2013). *HLA-DRB5-DRB1* et *INPP5D* auraient un rôle dans la réponse immunitaire. *PTK2B* interviendrait dans la migration cellulaire et la

fonction synaptique. *MEF2C* serait impliqué dans la réponse immunitaire et la fonction synaptique. *CELF1* et *NME8* seraient impliqués dans la fonction cytosquelettique et le transport axonal.

Le Tableau 3 résume l'ensemble des gènes ou loci impliqués dans la MA à début tardif, ainsi que les hypothèses physiopathologiques.

15. Le gène *CR1*

Ce gène sera traité dans le prochain chapitre.

Tableau 3 Gènes/Loci impliqués dans la MA à début tardif et hypothèses physiopathologiques.

	Gènes/Loci	Chr	Principale altération	Hypothèses physiopathologiques
MA à début tardif	<i>APOE</i>	19	Variant commun	Métabolisme du cholestérol, clairance des peptides Aβ
	<i>CLU</i>	8	Variant commun	Métabolisme du cholestérol, clairance des peptides Aβ, neuroinflammation, voie du complément
	<i>PICALM</i>	11	Variant commun	Endocytose, clairance des peptides Aβ
	<i>CRI</i>	1	Variant commun	Clairance des peptides Aβ, neuroinflammation, voie du complément ?
	<i>BINI</i>	2	Variant commun	Endocytose, transport de l'APP
	<i>SORL1</i>	11	Variant rare	Endocytose, clivage de l'APP
	<i>ABCA7</i>	19	Variant commun	Métabolisme du chol, clairance des peptides Aβ, voie du complément ?
	<i>TREM2</i>	6	Variant rare	Clairance des peptides Aβ ?
	<i>CD33</i>	19	Variant commun	Réponse immunitaire, neuroinflammation, clairance des peptides Aβ ?
	<i>MS4A</i>	11	Variant commun	Réponse immunitaire ?
	<i>EPHA1</i>	7	Variant commun	Endocytose, métabolisme de l'APP, plasticité synaptique ?
	<i>CD2AP</i>	12	Variant rare	Endocytose, métabolisme de l'APP ?
	<i>PLD3</i>	19	Variant rare	Endocytose, transport du cholestérol ?
	<i>ADAM10</i>	15	Variant rare	Production accrue de peptides Aβ (↓ activité des α-sécrétases)
	<i>CASS4</i>	20	Variant rare	Réponse immunitaire ?
	<i>HLA-DRB5-DRB1</i>	6	Variant commun	Réponse immunitaire ?
	<i>INPP5D</i>	2	Variant commun	Réponse immunitaire, métabolisme de l'APP ?
	<i>CELF1</i>	11	Variant commun	Fonction cytosquelettique et transport axonal ?
	<i>DSG2</i>	18	Variant rare	Réponse immunitaire ?
	<i>FERMT2</i>	14	Variant rare	Réponse immunitaire, métabolisme de tau ?
	<i>MEF2C</i>	5	Variant commun	Endocytose ?
	<i>PTK2B</i>	8	Variant commun	Endocytose, fonction synaptique ?
	<i>SLC24H4</i>	9	Variant commun	Transport du cholestérol
	<i>RIN3</i>	14	Variant commun	Endocytose ?
	<i>ZCWPW1</i>	7	Variant commun	Epigénétique ?
	<i>EXOC3L2</i>	19	Variant commun	Endocytose ?
	<i>NME8</i>	7	Variant commun	Fonction cytosquelettique et transport axonal ?

Chapitre V – Le gène *CRI*

I. Localisation

Le gène de *CRI* (Complement component [3b, 4b] Receptor 1), également connu sous le nom de *CD35*, est situé sur le chromosome 1 en position 1q32 (Figure 12).

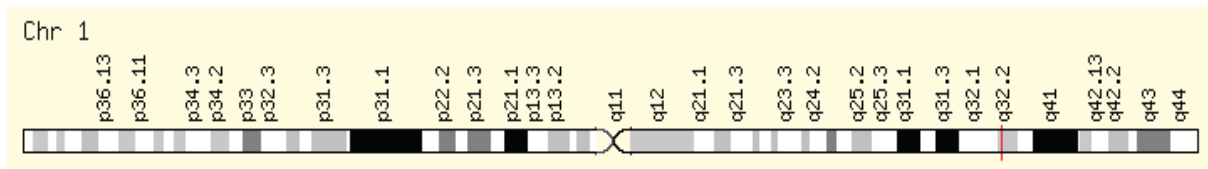


Figure 12 Localisation du gène *CRI*.

Cette région du chromosome 1 fait partie de la région RCA (Regulator of Complement Activation) (Weis et *al.*, 1987) qui code la protéine CR1 (récepteur du complément de type I) mais également d'autres protéines régulatrices du complément, à savoir C4bp (C4 binding protein ou protéine fixant le C4) (Rodriguez de Cordoba et *al.*, 1984), Facteur H (Rodriguez de Cordoba et *al.*, 1985), CR2 (Weis et *al.*, 1987), DAF (Decay Accelerating Factor ou CD55) (Rey-Campos et *al.*, 1987), MCP (Membrane Cofactor Protein ou CD46) (Liszewski et *al.*, 1991).

Les fonctions de la protéine CR1 seront détaillées dans le chapitre VII.

La carte physique de cette région RCA a été établie sans que la position du gène codant pour le facteur H puisse être déterminée (Rey-Campos et *al.*, 1988 ; Carroll et *al.*, 1988).

Ces molécules, de fonctions et de structure protéique proches, sont toutes constituées de séquences d'acides aminés répétitives SCR (Short Consensus Repeat) et seraient probablement le produit de duplications intragéniques à partir d'un gène ancestral (Hourcade et *al.*, 1988). Par ailleurs, il existe un pseudo-gène appelé *CR1-like*, présentant une homologie de 95% avec la région 5' de l'ADN de CR1, mais qui n'exprime pas de protéine.

II. Structure du gène *CRI*

Le gène *CRI* est constitué de 39 exons, d'environ 133 kilobases (Tableau 4).

Tableau 4 Les exons du gène *CRI* codant les SCR de la protéine CR1*1. D'après Vik et al. (1993).

LHR	SCR	Exon	Taille (pb)	Position sur ADNc	Taille des Introns (kb)
	Séquence signal	1	148	1-148	9,6
LHR-A	1	2	180	149-328	4
	2a	3	100	329-428	2,3
	2b	4	86	429-514	12,3
	3,4	5	399	515-913	3
	5	6	177	914-1090	0,091
	6a	7	103	1091-1193	1,7
	6b	8	86	1194-1279	3,9
	7	9	219	1280-1498	1,2
LHR-B	8	10	180	1499-1678	1
	9a	11	100	1679-1778	6,1
	9b	12	86	1779-1864	2,3
	10, 11	13	399	1865-2263	2,3
	12	14	177	2264-2440	2,5
	13a	15	103	2441-2543	0,091
	13b	16	86	2544-2629	0,65
	14	17	219	2630-2848	4,1
LHR-C	15	18	180	2849-3028	0,9
	16a	19	100	3029-3128	0,608
	16b	20	86	3129-3214	5,7
	17, 18	21	399	3215-3613	2,6
	19	22	177	3614-3790	0,094
	20a	23	103	3791-3893	1
	20b	24	86	3894-3979	2,2
	21	25	228	3980-4207	2,5
LHR-D	22	26	180	4208-4387	1,4
	23a	27	100	4388-4487	1,4
	23b	28	86	4488-4573	19,5
	24, 25	29	399	4574-4972	2,3
	26	30	177	4973-5149	0,082
	27a	31	103	5150-5252	2,4
	27b	32	86	5253-5338	3,4
	28	33	228	5339-5566	0,8
	29	34	177	5567-5743	2
	30	35	186	5744-5929	1,9
	Tma	36	24	5930-5953	1,1
	TMb	37	76	5954-6029	7,9
	Cyto	38	105	6030-6134	8,7
	3'non traduite	39	1245	6135-7379	

TM = transmembranaire, LHR = Long Homologous Repeat, SCR = Short Consensus Repeat.

Ce gène présente quatre polymorphismes qui ne s'expliquent pas par un épissage alternatif (Wong et *al.*, 1986, 1989), mais par l'existence de quatre allèles différents, *CR1* A/F, *CR1* B/S, *CR1* C/F', *CR1* D. La différence majeure entre ces quatre allèles de *CR1* se trouve au niveau des exons, et cette différence conduit à des isoformes différents au nombre de quatre. Un diagramme de la différence de structure au niveau des exons des allèles *CR1*-A/F et *CR1*-B/S est représenté dans la figure 13.

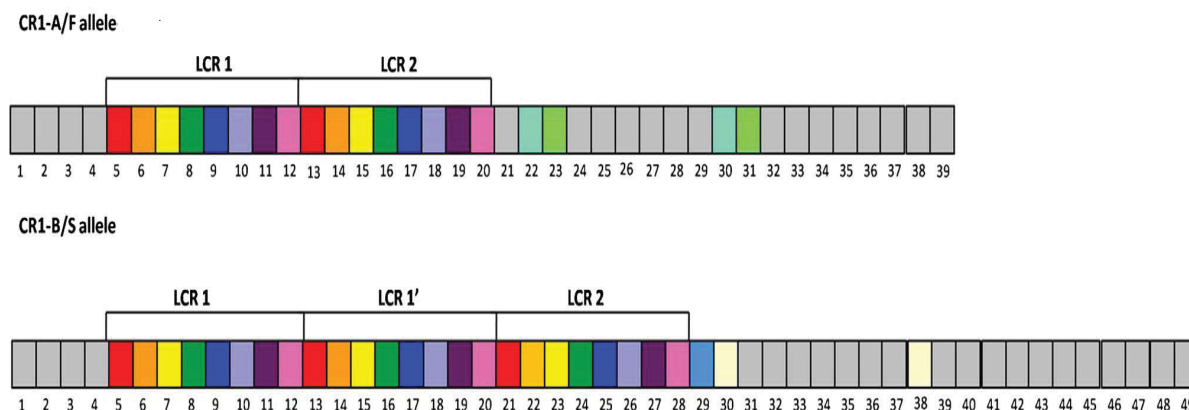


Figure 13 Différences de structure au niveau des exons entre l'allèle *CR1*-A et l'allèle *CR1*-B. La même couleur représente des exons analogues. Les exons de l'allèle *CR1*-A comprennent deux LCRs (Low-Copy Repeats). Les exons de l'allèle *CR1*-B comprennent 3 LCRs dont un additionnel (LCR1').

III. Gène *CR1* et maladie d'Alzheimer

Le gène *CR1* a été initialement considéré comme étant possiblement associé à un risque de MA dans l'étude GERAD1 (Risque Génétique et Environnemental dans la Maladie d'Alzheimer) (Harold et *al.*, 2009), mais ceci n'a pas été confirmé jusqu'aux études d'association pangénomiques (GWAS) réalisées par Lambert et *al.* (2009). En effet, ces GWAS réalisées pour tenter d'associer de nouveaux gènes à la MA, comprenant des centres français et d'autres européens (Belgique, Espagne, Finlande, Italie) ont consisté à comparer le génome entier de patients atteints de la MA et de sujets témoins. L'étude réalisée par Lambert et *al.* (2009) comprenait deux étapes. La première étape consistait en un génotypage de 2032 cas et 5328 témoins et a permis d'identifier des loci potentiellement associés à la MA. Lors de la deuxième étape (réplication), 11 SNPs ont été génotypés chez 3978 cas et 3297 témoins, à la recherche de réplication des résultats obtenus à la première étape. La comparaison a été réalisée grâce à la technologie des puces à ADN, ce qui a permis d'étudier la distribution de

610 000 mutations ponctuelles ou SNP (Single nucleotide polymorphism) réparties sur l'ensemble du génome. Des corrélations ont été établies lors de l'analyse des gènes des sujets atteints de MA par rapport aux témoins, soit un total de 6 010 patients MA et 8 625 sujets contrôles. Ainsi, 11 SNPs distribués très différemment entre les patients atteints de MA et les témoins ont été identifiés dont 2 situés dans le gène *CRI* (rs6656401 et rs3818361). Après combinaison des données des deux étapes, rs6656401 a montré l'association la plus forte avec la MA à début tardif (odds ratio : OR= 1,21, intervalle de confiance : 95% (IC) : 1,14–1,29, $p = 3,5 \times 10^{-9}$), alors que le second SNP (rs3818361) a un OR de 1,19, (IC 95% : 1,11–1,26, $p = 8,9 \times 10^{-8}$). Ces deux SNPs se trouvent dans une région d'environ 127-kb en déséquilibre de liaison, entièrement entourée par le gène *CRI* (Zhu et *al.*, 2015). Depuis, plusieurs études d'association pangénomiques, méta-analyses et études cas-témoins ont été publiées pour reproduire et confirmer l'association entre *CRI* et MA (Tableau 5). L'ensemble des résultats de ces études indiquent que *CRI* est un locus de susceptibilité pour la MA. En effet, à ce jour, 9 SNPs situés sur le gène *CR1*, rs6656401, rs3818361, rs6701713, rs1408077, rs6701710, rs116806486, rs6691117, rs4844610 et rs11803956, ont été rapportés comme étant associés au risque de MA dont 6 loci, rs6656401, rs3818361, rs6701713, rs1408077, rs4844610 et rs11803956, situés dans la région intronique de *CRI* et sont, de ce fait, des SNPs non codants. Cependant, des variants de régions introniques peuvent potentiellement intervenir dans la régulation de l'expression du gène et donc influencer la susceptibilité à la MA (Kim et *al.*, 1999).

Tableau 5 Principales études associant des variants du gène *CR1* et la maladie d'Alzheimer.

Année	Études	Partie	Design	Echantillon	Populations	Génotypage	CR1 SNPs	OR	p value
2009	Lambert et al.	Etape 1	GWAS	2032 cas	EADI1 : Français	537,029 SNPs	rs6656401	1,27	1.8x10 ⁻⁷
		Etape 2	Réplication	5328 témoins			rs3818361	1,28	8.5x10 ⁻⁸
				3978 cas	Belgique, Finlande, Italie, Espagne	11 SNPs	rs6656401	1,16	8.2x10 ⁻⁴
				3927 témoins			rs3818361	1,11	1.6x10 ⁻²
		Données combinées	Méta-analyse	≥5791 cas	Comme ci-dessus	Comme ci-dessus	rs6656401	1,21	3.5x10 ⁻⁹
2010	Corneveaux et al.	–	Cas-témoins	≥8420 témoins	Blanches : USA, Royaume-Unis, Pays-Bas	34 SNPs	rs3818361	1,19	8.9x10 ⁻⁸
				1019 cas			rs6656401	1,28	0.008
2010	Carrasquillo	–	Cas-témoins	591 témoins	Blanches : USA	3 SNPs	rs3818361	1,15	0.014
				1819 cas					
				2565 témoins					
2010	Jun et al.	Séries blanches	Méta-analyse	5935 cas	9 cohortes blanches du nord de l'Europe	17 SNPs	rs3818361	1,14	6.1x10 ⁻⁵
				7034 témoins			rs6701713	1,14	8.8x10 ⁻⁵
							rs1408077	1,14	0.0001
2010	Zhang et al.	–	Cas-témoins	254 cas	Chinois Han	2 SNPs	rs6656401	2,6	0.007 ^a
				357 témoins			rs3818361		0.072 ^a
2011	Wijdsman et al.	–	GWAS	1848 cas	Diverses ethnies	565,336 SNPs	rs3818361		0.0273
				1991 témoins			rs6701713		0.0263
							rs1408077		0.0478
2011	Schjeide et al.	Etape 1	Cas-témoins (famille)	2654 cas	Echantillons de familles américaines	5 SNPs	rs6656401	1,28	0.27
		Etape 2	Cas-témoins (sans lien)	1175 témoins					
				214 cas	Cas et témoins allemands sans lien	5 SNPs	rs6656401	1,49	<0.001
		Données combinées	Cas-témoins	211 témoins	Comme ci-dessus	Comme ci-dessus	rs6656401	1,33	0.001
		Méta-analyse	Méta-analyse	2868 cas					
				1396 témoins	Données publiques disponibles dans AlzGene	5 SNPs	rs6656401	1,2	4.1x10 ⁻⁷
				–					

Année	Etudes	Part	Design	Echantillon	Populations	Génotypage	CRI SNPs	OR	p value
2011	Naj et al.	Etape 1	GWAS	8390 cas 7366 témoins	Ancêtres européens : ADGC ; 9 cohortes	2,324,889 SNPs	rs6701713	1,18	1.4x10 ⁻⁸
		Etape 2	Réplication	3531 cas 3565 témoins	Ancêtres européens : ADGC ; 9 cohortes	9 Loci	rs6701713	1,13	0.004
		Données combinées	Réplication	11840 cas 10931 témoins	Etapes 1 et 2	9 Loci	rs6701713	1,16	4.6x10 ⁻¹⁰
2012	Chen et al.	–	Cas-témoins	462 cas 350 témoins	Chinois du sud	7 SNPs	rs6656401 rs3818361	1,67 1,33	0.048 0.047
2012	Jin et al.	–	Méta-analyse	1019 cas 1080 témoins	Chinois Han	1 SNPs	rs6656401	1,69	0.005
2012	Hazrati et al.	–	Cas-témoins	475 cas 284 témoins	Canadiens	1 SNPs	rs4844610	1,8	
2014	Ma et al.	Etape 1	GWAS	100 cas	Chinois Han	22 SNPs	P1726, P2157 rs116806486, rs3737002, rs2274567, rs6691117 rs116806486 rs6691117 rs11803956		
2014	Chung et al.	–	Réplication Cas-témoins	1133 cas 1159 témoins 211 cas	Chinois Han Corée du sud	6 SNPs 88 SNPs		3,214 1,257	0.001 0.007 0.002

ADCG = Alzheimer Disease Genetics Consortium, IC, EADI1 = European Alzheimer Disease Initiative 1 Consortium, GWAS = Genome Wide Association Studies, OR = Odds Ratio, SNP = Single-nucleotide polymorphism.

A ce jour, seuls les 2 SNPs rs6656401 et rs3818361, situés respectivement dans l'intron 4 et l'intron 29, ont été confirmés comme loci de susceptibilité à la MA dans différentes populations, ethniquement distinctes (Carrasquillo et *al.*, 2010 ; Chen et *al.*, 2012 ; Corneveaux et *al.*, 2010 ; Jin et *al.*, 2012 ; Jun et *al.*, 2010 ; Lambert et *al.*, 2009 ; Schjeide et *al.*, 2011 ; Weiner et *al.*, 2013 ; Wijsman et *al.*, 2011 ; Zhang et *al.*, 2010), alors que les 3 SNPs, rs6701713, rs 1408077 et rs 6701710, ont une meilleure association dans les populations européennes par rapport à d'autres ethnies (Hazrati et *al.*, 2012 ; Jun et *al.*, 2010 ; Naj et *al.*, 2011 ; Wijsman et *al.*, 2011). Par ailleurs, Ma et *al.* (2014), ont montré que les 2 SNPs, rs116806486 et rs 6691117, étaient associés à la MA chez des Chinois Han, mais que cette association n'était pas confirmée dans d'autres ethnies.

Bien que toutes ces études aient montré une association entre le gène *CRI* et la MA (Tableau 5), les études d'association pangénomiques (GWAS) sont informatives et les associations génétiques nécessitent une validation fonctionnelle. Les GWAS représentent un procédé de criblage du génome mais, d'une part, les limitations existent dans leur capacité à détecter de véritables associations, et d'autre part, les résultats de ces études peuvent être difficiles à reproduire si l'effet réel s'avère être plus petit que l'effet observé dans l'étude initiale. En outre, les GWAS peuvent ne pas détecter des associations avec de multiples variants rares sur un site unique (qui sont mieux détectés par des études de liaison) ou ne pas détecter des associations avec des variants rares (fréquence des allèles mineurs de 5%). Enfin, ces études seules ne peuvent pas prouver la causalité ou établir la signification biologique d'une association génétique observée.

IV. Implication du gène *CRI* dans la pathogénèse de la MA

Arvanitakis et *al.* (2011) ont montré que le SNP rs6656401 était associé à un risque élevé d'AAC (angiopathie amyloïde cérébrale) et à la sévérité des dépôts amyloïdes. Les auteurs de cette étude concluaient que *CRI* pouvait intervenir d'une manière indépendante dans les deux processus (MA et AAC). D'autres études ont montré que l'allèle *CRI* à risque, rs6656401, était associé à une augmentation du déclin cognitif (mémoire épisodique et sémantique, vitesse de perception, capacité visuo-spatiale) (Chibnik et *al.*, 2011), ce qui était en accord avec les travaux de Mengel-From et *al.* (2011) et de Chung et *al.* (2014). Par ailleurs, Thambisetty et *al.* (2013) ont montré que les sujets porteurs de l'allèle *CRI* à risque,

rs3818361, présentaient une charge amyloïde cérébrale plus faible comparée aux porteurs de l'allèle à risque de *CR1*, et que chez les non porteurs de l'allèle à risque de *CR1*, les sujets *APOE* $\epsilon 4+$ présentaient une charge amyloïde cérébrale plus élevée que les sujets *APOE* $\epsilon 4-$, suggérant l'existence de mécanismes complexes sous tendant des interactions entre *CR1*, *APOE* et la voie amyloïde cérébrale dans la MA. Une autre étude a montré une association entre le SNP rs1408077 et l'épaisseur du cortex entorhinal (Biffi et *al.*, 2010), mais non retrouvée par Furney et *al.* (2011). Ces résultats contradictoires soulignent la nécessité d'autres études pour identifier les aspects de la MA affectés par le génotype *CR1*.

Bien que ces études aient identifié le gène *CR1* comme gène de susceptibilité à la MA avec une crédibilité épidémiologique évidente, mettant le gène *CR1* dans les 10 premiers loci de la liste Alzgene (Bertam & Tanzi, 2010), la signification fonctionnelle des deux SNP rs6656401 et rs3818361 reste inconnue. Néanmoins, toutes ces études suggèrent un rôle du complément dans la physiopathologie de la MA.

Chapitre VI – Le système du complément

Le système du complément est un acteur important de l'immunité innée tout en intervenant dans l'initiation et la progression de la réponse immunitaire adaptative (Walport et *al.*, 2001a,b). Ce système est composé d'environ 35 protéines solubles et membranaires. L'activation de ses différents composants se fait en cascade. Certains composants doués d'activité enzymatique circulent sous forme inactive, n'acquérant leur activité protéolytique ou biologique qu'après protéolyse limitée, le substrat devenant l'activateur de la protéine suivante dans la cascade d'activation. Chaque enzyme peut activer de nombreuses molécules du précurseur suivant, amplifiant chaque étape. Outre cette amplification en cascade, la conséquence de l'activation est l'apparition de différents produits de clivage biologiquement actifs, capables d'interagir avec de nombreux types cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. A côté de ces molécules, existent d'autres protéines qui régulent l'activité du complément et empêchent son activité contre le « soi ».

L'activation du système du complément est rapide, localisée, en cascade et permet la formation du complexe d'attaque membranaire. Le système du complément participe à la réaction inflammatoire, permet la phagocytose des microorganismes, la neutralisation des virus, l'élimination des complexes immuns, la présentation des antigènes aux lymphocytes B et la régulation de la réponse immune. Ce système est contrôlé par plusieurs protéines dont le CR1, un des principaux acteurs de cette régulation.

L'activation du système du complément peut se faire par trois voies différentes aboutissant à une voie finale commune : (i) la voie classique, (ii) la voie alterne et (iii) la voie des lectines.

I. Les voies d'activation du complément

1. La voie classique

Cette voie est appelée classique car elle a été découverte la première. L'activation de cette voie est initiée par la fixation de la première protéine du complément, C1q, à un de ses ligands, anticorps de type IgG ou IgM après reconnaissance spécifique de l'antigène cible, notamment. C1q fait partie du complexe C1, composé d'1 molécule C1q qui est une protéine de reconnaissance, et de 2 molécules de C1r et C1s, qui sont des sérines estérases. La fixation de C1q entraîne l'autoactivation de C1r, qui clive et active ainsi C1s.

Le composant C1s activé clive alors le composant C4 présent dans le plasma en un petit fragment, C4a, libéré dans la phase liquide, et un fragment majeur, C4b, qui se fixe alors, de façon covalente, à la surface du complexe immun.

Le composant C2, circulant dans le plasma, peut alors s'associer au C4b et être clivé à son tour par C1s en un fragment C2a, qui reste associé à C4b, et un fragment C2b libéré dans la phase liquide. Ainsi se trouve formé à la surface activatrice, le complexe C4b2a, appelé C3 convertase classique, car ayant la capacité de cliver le composant C3. L'activité enzymatique étant portée par la sous unité C2a, le complexe C4b2a va ensuite cliver C3, dont la fraction C3b se fixe sur la surface activatrice (Figure 14).

2. La voie des lectines

Cette voie est activée par les structures carbohydrates des micro-organismes. Dernière voie du complément ayant été découverte, elle présente une similitude avec la voie classique. La protéine de reconnaissance est ici la protéine MBL (Mannan Binding Lectin) qui est associée à des sérines estérases appelées MASP 1, 2 (Mannan-Associated Serine Protease). MASP 1, 2 présentent une forte homologie avec C1r et C1s. Une fois MBL fixée à une surface, les MASP acquièrent la capacité de cliver les protéines C4 et C2 en C4a et C2b, et participent à la formation d'une C3 convertase (C4bC2a), identique à celle formée à l'issue de l'activation de la voie classique. Le reste de la cascade est similaire à celle de la voie classique.

3. La voie alterne

Cette voie est activée par des substances d'origine bactérienne, des virus, des cellules infectées ou transformées. Les interactions des protéines de la voie alterne aboutissent à la formation de la C3 convertase alterne dont l'assemblage commence avec l'association d'une molécule de C3b avec le facteur B. cette association permet au facteur B d'être clivé par une sérine protéase circulant sous forme active dans le plasma, le facteur D, produisant des fragments Ba et Bb. Le fragment Bb reste associé à C3b et acquiert une activité enzymatique. Le complexe C3bBb constitue la convertase de la voie alterne, capable de catalyser le clivage de C3 en C3b de manière complètement identique au clivage réalisé par le complexe C4b2a. Cette voie d'activation est capable d'une auto-amplification qui est très importante pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en l'absence d'anticorps spécifiques.

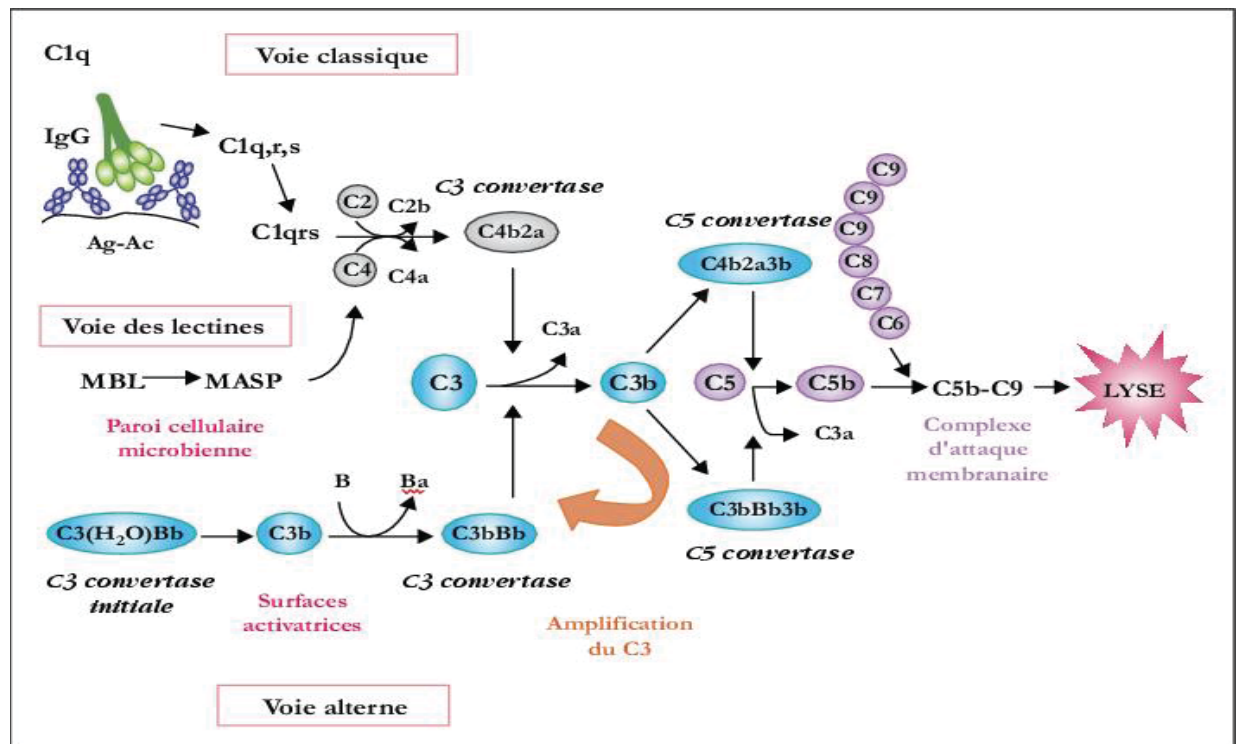


Figure 14 La voie du complément.
D'après Probst et *al.* (2006).

II. Les voies effectrices du système du complément

A l'issue des trois voies d'activation, deux convertases peuvent être formées. Ces deux complexes moléculaires ont une même activité enzymatique qui assure le clivage de la protéine C3 en C3a et C3b. C3a est une petite molécule libérée en phase liquide, possédant des activités biologiques importantes dans la réaction inflammatoire, et qui fait partie des anaphylatoxines. C3b, quant à lui, se fixe de façon covalente sur un résidu thioester de la surface activatrice, à proximité de la C3 convertase, et son devenir est multiple, déterminant les différentes voies effectrices du système du complément (Cesbron et *al.*, 2013).

1. La voie d'amplification

Une molécule de C3b nouvellement formée peut s'associer à une nouvelle molécule de facteur B pour former une nouvelle C3 convertase alterne qui clive de nouvelles molécules de C3 et ainsi participe à la boucle d'amplification de la voie alterne. La voie alterne peut également amplifier l'activation du complément initiée par les deux autres voies, classique et des lectines. Ceci permet l'opsonisation de la surface activatrice

(comme une bactérie), c'est-à-dire son recouvrement rapide par des molécules de C3b. Cette double fonction, reconnaissance et amplification, de la voie alterne souligne son rôle dans la défense de l'hôte contre les pathogènes.

2. La voie finale commune

L'association des C3 convertases avec des molécules supplémentaires de C3b peut changer leur affinité pour leur substrat et leur conférer une activité dite « C5 convertase ». En effet, la protéine C5 peut alors se lier aux complexes (C4b2a)C3b ou (C3bBb)C3b et être soumise à leur activité enzymatique. La protéolyse de C5 (par les sous unités C2a ou Bb des complexes), libère un petit peptide C5a, qui est une autre anaphylatoxine libérée en phase liquide. Le fragment restant, C5b, peut alors s'associer aux composants C6, C7, C8 et C9 pour former le complexe d'attaque membranaire (CAM) qui commencera un ancrage dans la membrane plasmique de la cellule cible. Plusieurs molécules de C9 polymérisent et forment un pore dans la membrane. Ce pore provoque la lyse de la cellule cible (Figure 15).

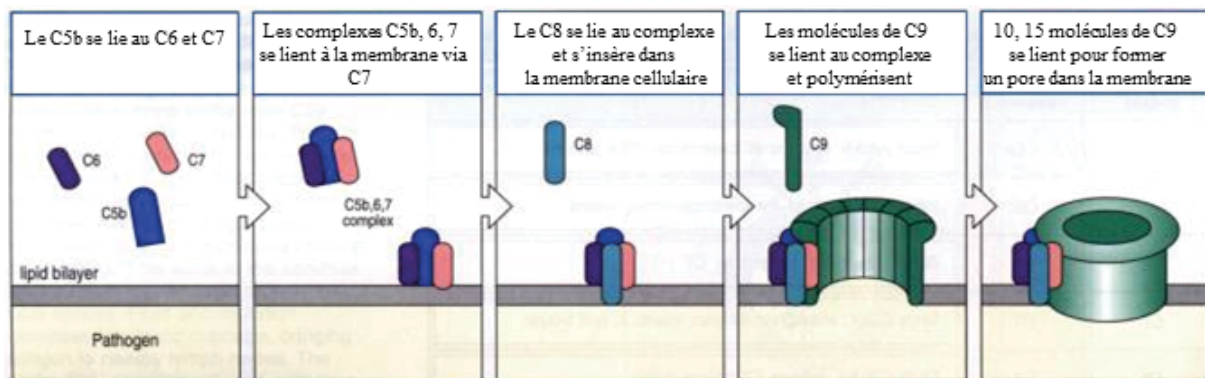


Figure 15 Formation du complexe d'attaque membranaire.

III. Régulation de la voie du complément

La voie classique est régulée par l'inhibiteur de la C1 estérase (C1inh) qui inactive C1r et C1s en s'y liant. Cette régulation peut se faire également au niveau de la C3 convertase qui peut être inactivée par des protéines plasmatiques, telles que le facteur I et la C4bp (C4 binding protein), mais également par des protéines membranaires comme DAF (Decay Accelerating Factor, CD55), le CR1 (récepteur du complément de type 1), ou MCP (Membrane Cofactor Protein). Ces inhibiteurs peuvent empêcher la fixation de C2 à

C4b (CR1, DAF), dissocier la C3 convertase (DAF, CR1) ou augmenter le clivage de C4b par le facteur I (MCP, CR1 et C4bp) (Cesbron et *al.*, 2013).

La régulation au niveau de l'initiation et de la dissociation de la C3 convertase alterne est assurée par le facteur H qui joue un rôle central pour discriminer les surfaces du soi et du non-soi. Il peut reconnaître les surfaces non activatrices riches en polyanions, comme l'acide sialique, l'héparane sulfate ou d'autres glycosaminoglycans. Il contrôle l'initiation de la C3 convertase alterne en entrant en compétition avec le facteur B pour la fixation de C3b. Le facteur H accélère également la dissociation de la C3 convertase alterne en déplaçant le fragment Bb de la C3 convertase active. Le facteur I et ses cofacteurs pour la dégradation de C3b (facteur H, CR1 et MCP) sont également considérés comme des régulateurs de la voie alterne. A noter que CR1 et MCP peuvent également servir de cofacteurs au facteur I pour la dégradation de C4b.

La protéine DAF ou CD55 est un régulateur négatif des C3 et C5 convertases, classiques ou alternes, qui accélère leur dissociation.

Enfin, le CAM est sous le contrôle de deux protéines, une plasmatique (protéine S) et une membranaire (CD59), qui empêchent la formation sur les membranes, respectivement des complexes C5b-7 et C5b-8 et la polymérisation de C9.

IV. Complément et inflammation

L'activation du complément joue un rôle important dans l'induction de lésions tissulaires. En effet, la formation des C3 et C5 convertases induit la libération des anaphylatoxines C3a et C5a qui possèdent d'importantes capacités chimiotactiques sur les cellules inflammatoires dont les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages, ainsi que les lymphocytes T et B activés. Via leurs récepteurs, C3aR et les C5aR (CD88 et C5L2), ces protéines C3a et C5a peuvent activer les cellules endothéliales et les plaquettes mais aussi induire la sécrétion des cytokines et de chimiokines à activité pro-inflammatoire. De plus, C3b, par l'intermédiaire des récepteurs CR1, CR3 et CR4, peut activer les leucocytes. Enfin, C5b9, y compris des complexes sub-lytiques C5b7 et C5b8 formés à la surface des cellules cibles, induisent l'hydrolyse des phospholipides membranaires et l'activation des protéines G. Ces complexes sont ainsi capables de transmettre un signal et de stimuler différentes fonctions cellulaires comme la synthèse de cytokines ou l'activation de proto-oncogènes intervenant dans le cycle cellulaire (Cesbron et *al.*, 2013).

Le dysfonctionnement du système du complément a été démontré dans de nombreuses situations pathologiques (maladies auto-immunes, choc septique...). Nous aborderons plus précisément le rôle de la protéine CR1, dans la pathogénèse de la MA, notamment à travers la régulation de la voie du complément dans le chapitre suivant.

Chapitre VII – La protéine CR1

I. Historique

CR1, également appelé CD35 ou récepteur pour le C3b-C4b, est une glycoprotéine transmembranaire de type I, d'un poids d'environ 200 kDa, isolée pour la première fois de la membrane des érythrocytes par Fearon en 1979 (Fearon, 1980).

II. Répartition cellulaire

CR1 est présent principalement à la surface des érythrocytes. Les molécules de CR1 sont regroupées en grappes ou bouquets (Fearon, 1980 ; Paccaud *et al.*, 1988) (Figure 16). Fishelson & Marikovsky (1993) ont montré que cette répartition en bouquets de CR1 n'était pas modifiée au cours du vieillissement. Les érythrocytes exprimant en moyenne 500 sites, ont à leur surface 8 à 20 bouquets constitués de 30 à 75 molécules de CR1 (Chevalier & Kazatchkine, 1989).

CR1 est également présent à la surface des lymphocytes B (Ross *et al.*, 1978), des cellules de la lignée monocyttaire, des lymphocytes T récemment activés (CD4 et CD8) (Cohen *et al.*, 1989 ; Rodgaard *et al.*, 1991), des cellules dendritiques folliculaires (Reynes *et al.*, 1985), des astrocytes fœtaux (Gasque *et al.*, 1996), des podocytes glomérulaires, et de certains thymocytes (Liu & Niu, 2009).

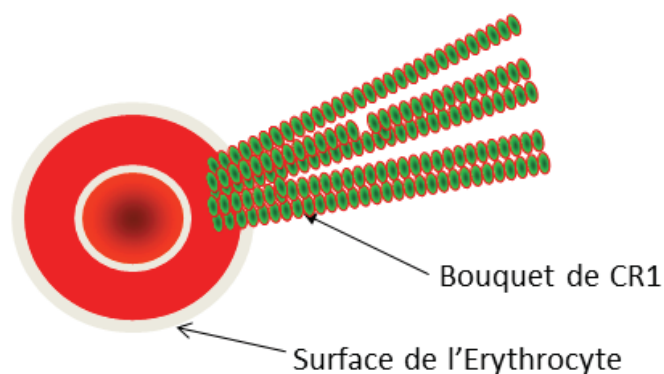


Figure 16 Représentation schématique de la répartition de CR1 à la surface des érythrocytes.

III. Structure protéique et polymorphismes de CR1

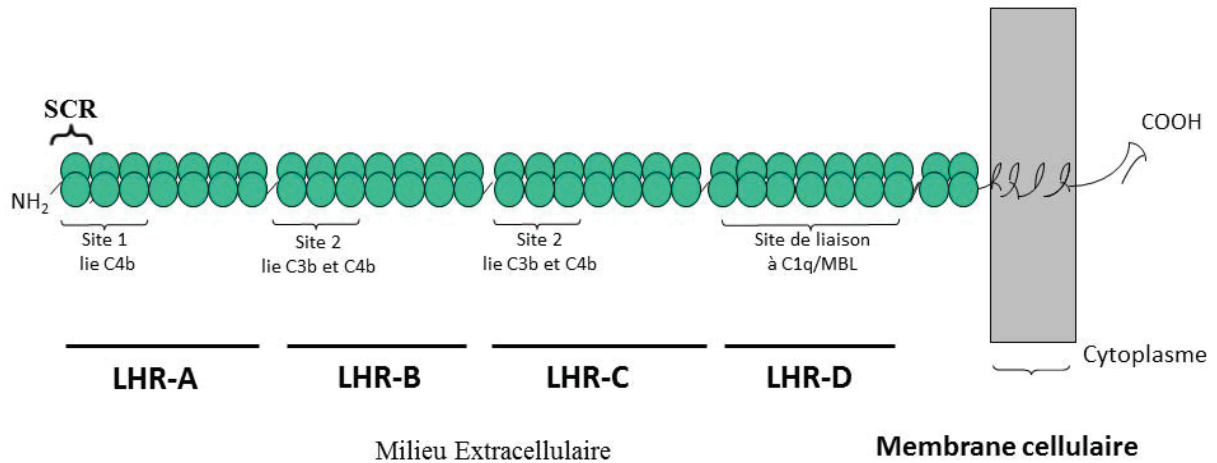
CR1 est une glycoprotéine transmembranaire de haut poids moléculaire, qui présente trois types de polymorphismes : (i) un polymorphisme de longueur (allotypique ou structural), (ii) un polymorphisme de densité, (iii) un polymorphisme du groupe sanguin Knops (KN).

1. Polymorphisme de longueur (polymorphisme allotypique ou de structure)

En effet, l'analyse d'extraits membranaires d'érythrocytes par PAGE-SDS, montre un polymorphisme allotypique de taille. Ainsi, quatre formes différentes de CR1, de poids moléculaire 160, 190, 220 et 250 kDa, ont été jusqu'à présent isolées (Dykman et *al.*, 1985 ; Fearon, 1980). Ce polymorphisme est héréditaire, autosomique et codominant. La nomenclature désignant ces différentes molécules a varié au fil des années. Les deux formes les plus communes ont d'abord été nommées F (*Fast*) et S (*Slow*) (190 kDa et 220 kDa, respectivement) en fonction de la rapidité de leur migration électrophorétique (Wong et *al.*, 1983). L'allotype de 160 kDa découvert ensuite a pris le nom de F'. Suite à l'isolement d'un quatrième allotype, la nomenclature a changé pour devenir A, B, C et D (190 kDa, 220 kDa, 160 kDa et 250 kDa, respectivement). L'ordre de ces différentes lettres est en accord avec la fréquence de chacun des allotypes. Récemment, une nouvelle nomenclature a été établie. Les allèles s'appellent officiellement CR1*1, CR1*2, CR1*3 et CR1*4.

La diversité observée n'est pas liée à des différences dans la glycosylation des allotypes. Tous les allotypes ont des formes non-glycosylées de poids moléculaires inférieurs de 25 kDa à la forme la plus fréquente. La N-glycosylation est nécessaire à l'insertion de CR1 dans la membrane et à son activité biologique. Par contre, le CR1 n'est pas O-glycosylé. Il existe également un écart de 5 kDa, due à une N-glycosylation différente entre le CR1 exprimé à la surface des érythrocytes et le CR1 exprimé à la surface des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes T (Lublin et *al.*, 1986). La différence entre les allotypes de CR1 se situe donc au niveau du polypeptide. Les études menées à partir de la séquence de l'ADNc codant pour la forme la plus fréquente de CR1, CR1*1, montrent que la protéine est constituée de 30 mini domaines élémentaires ou structures répétitives appelées SCR (*Short Consensus Repeat*) ou CCP (*Complement Control Protein*) (Klickstein et *al.*, 1987). Ces SCR sont regroupés en une structure

répétitive d'ordre supérieur nommée LHR (*Long Homologous Repeat*). Chaque LHR contient 7 SCR, les LHR sont nommés A, B, C, D (de la région N-terminale vers la région C-terminale) du milieu extracellulaire vers la membrane cytoplasmique (Figure 17).



Allotype CR1*1

Figure 17 Représentation schématique de l'allotype le plus fréquent (CR1*1).

Les allotypes diffèrent par le nombre de LHR qui les composent. On compte 4 LHR pour l'isoforme CR1*1, 6 LHR pour l'isoforme CR1*4, 3 LHR pour l'isoforme CR1*3 et 5 LHR pour l'isoforme CR1*2 (Holers et *al.*, 1987 ; Wong et *al.*, 1986). Ce nombre peut varier selon un processus de duplication génique et d'échange inégal conduisant à différents allèles. Les sites de liaisons de C3b se situent au niveau des trois SCR N-terminaux des LHR B et C. Le site de liaison de C4b se situe au niveau des trois SCR N-terminaux du LHR A (Crehan et *al.*, 2012 ; Liu & Niu, 2009 ; Wong et *al.*, 1989) (Figure 18).

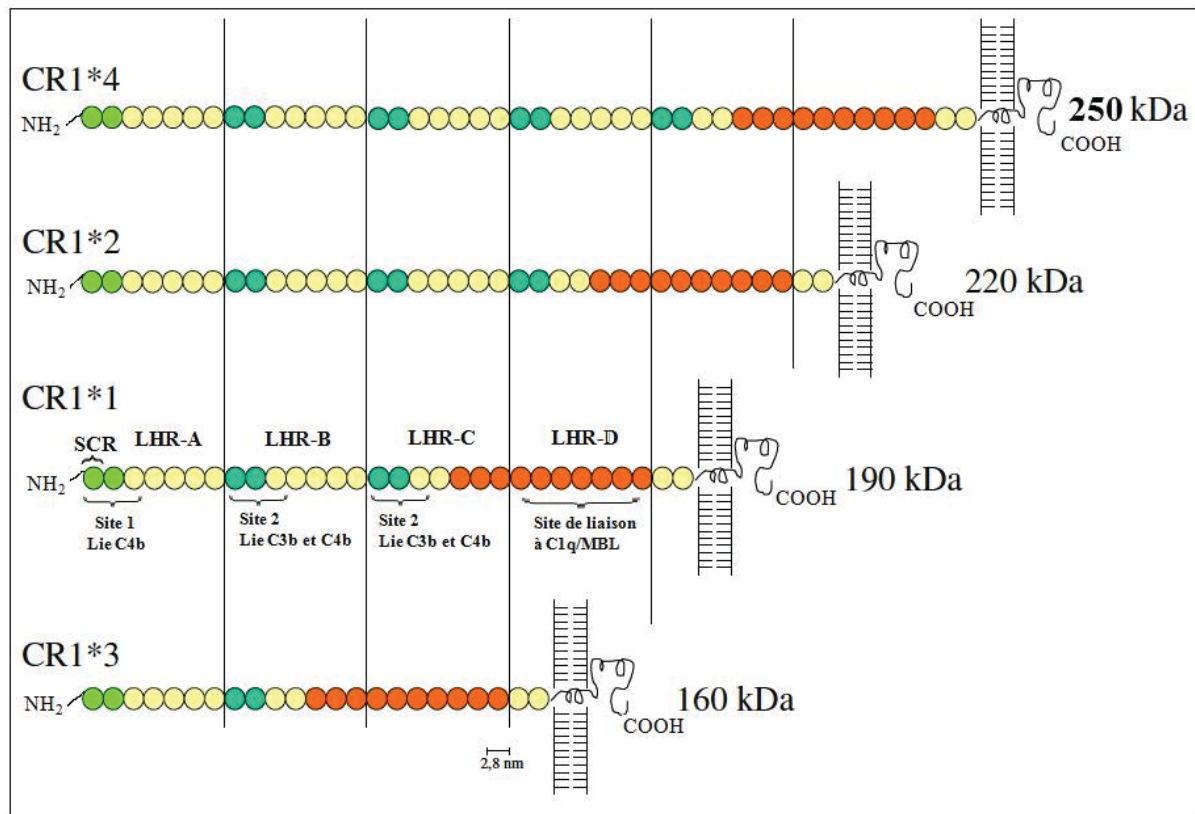


Figure 18 Représentation schématique des différents allotypes de CR1.

Les structures homologues sont coloriées de façon identique. D'après Crehan et *al.* (2012).

La fréquence de ces allotypes est différente selon les populations. Chez les caucasiens, CR1*1 est le plus fréquent et CR1*4 le moins fréquent (Birmingham et *al.*, 2003 ; Crehan et *al.*, 2012 ; Krych-Goldberg et *al.*, 2002 ; Wong et *al.*, 1983) (Tableau 6).

Tableau 6 Nomenclature, caractéristiques et fréquence des différents allotypes de CR1 chez différentes populations.

Allotypes	Poids moléculaire (kDa)	Nombre de SCR	Nombre de LHR	Fréquence					
				Caucasiens	Afro- américains	Mexicains	Asiatiques Indiens	Chinois/Taiwanais	Maliens
CR1*1 (A/F)	190	30	4	0.87	0.82	0.89	0.916	0.95	0.79
CR1*2 (B/S)	220	37	5	0.11	0.11	0.11	0.084	0.04	0.14
CR1*3 (C/F')	160	23	3	<0.01	0.03	0.01	-	0.01	0.05
CR1*4 (D)	250	44	6	<0.0001	0.003	0.005	-	0	0.02
SCR= Short Consensus Repeat, LHR = Long Homologous Repeat									

SCR= Short Consensus Repeat, LHR = Long Homologous Repeat

2. Polymorphisme de densité

Le second type de polymorphismes de CR1 est un polymorphisme de densité. En effet, la densité de CR1 Erythrocytaire (CR1E) (nombre de sites antigéniques de CR1 par Erythrocyte) est modulée par des facteurs génétiques et acquis.

a. Régulation génétique de la densité du CR1 Erythrocytaire

Ce polymorphisme de densité est gouverné par un système bi-allélique conduisant à une dispersion de 150 à 1500 sites antigéniques de CR1E, la valeur moyenne étant de 500 chez une population caucasienne (Cornillet et *al.*, 1991 ; Moulds et *al.*, 1991, 1992).

De façon génétique, la densité de CR1E est régulée par deux allèles autosomiques co-dominants liés à une mutation ponctuelle dans l'intron 27 du gène codant pour le CR1*1 (Rodriguez et *al.*, 1986 ; Wilson et *al.*, 1986). Cette mutation produit un site de restriction supplémentaire pour l'enzyme *Hind*III, les fragments de restriction obtenus après digestion par *Hind*III étant de 7.4 kb pour l'allèle lié à une expression élevée de CR1 (allèle H : High) et de 6.9 kb pour l'allèle lié à une faible expression de CR1 (allèle L : Low). Ce polymorphisme est retrouvé chez les caucasiens, les asiatiques, mais pas chez les personnes d'origine africaine (Birmingham et *al.*, 2003, Liu & Niu, 2009) (Figure 19).

Le niveau d'expression du CR1E est également corrélé à la présence de mutations nucléotidiques ponctuelles (Q981H) dans les exons codant les SCR 16. Il est élevé chez les individus homozygotes (QQ) et faible chez les individus homozygotes (HH) (Birmingham et *al.*, 2003; Liu & Niu, 2009) (Figure 19).

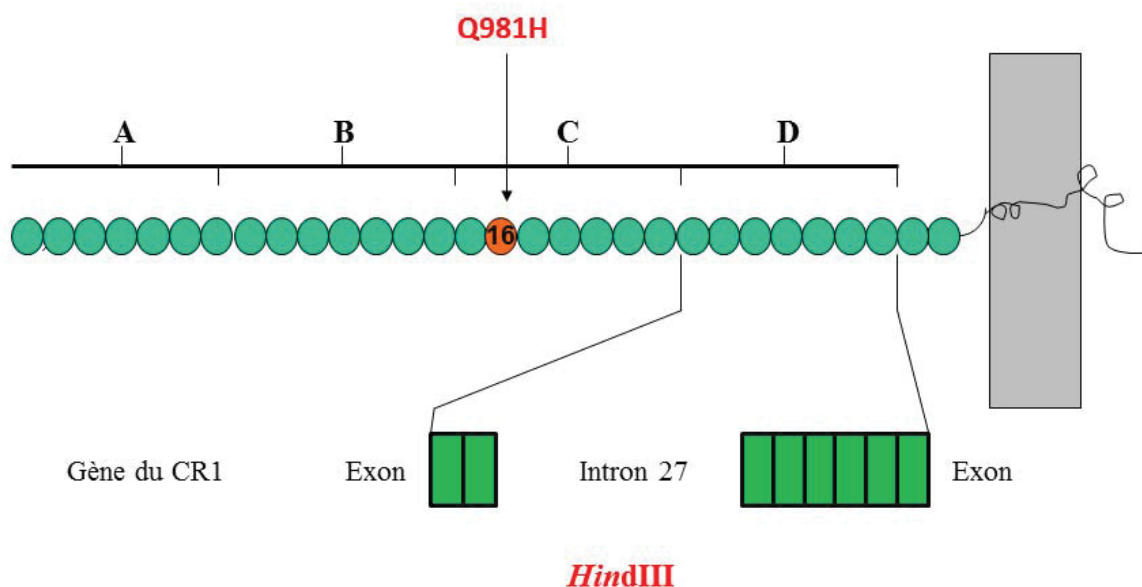


Figure 19 Localisation du site de restriction *HindIII*, dans le gène *CR1* et de la mutation nucléotidique Q981H sur la protéine CR1.

(D'après Birmingham et *al.*, 2003 ; Crehan et *al.*, 2012 ; Herrera et *al.*, 1998).

Ainsi, il existe trois populations d'individus de génotypes différents exprimant des densités distinctes de CR1E (**Tableau 7**).

Tableau 7 Les différents génotypes contrôlant la densité de CR1E chez les caucasiens. D'après Birmingham et *al.* (2003).

Génotype		
<i>HindIII</i>	Q981H	Densité (CR1E)
HH	QQ	911
HL	QH	455
LL	HH	156

CR1/E = nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes.

La mise en évidence de polymorphismes dans les éléments transcriptionnels de la région du promoteur et la région 3' non traduite du gène *CR1* n'ont pas permis d'expliquer les niveaux d'expression du CR1 érythrocytaires déterminés génétiquement par les allèles H et L (Cockburn et *al.*, 2006).

b. Régulation physiologique de la densité du CR1 Erythrocytaire

La densité de CR1E diminue au cours de la vie d'un érythrocyte, ce qui expliquerait son hétérogénéité chez un même individu (Ripoche & Sim, 1986). La demi-vie de CR1 à la surface de l'érythrocyte varie de 11 à 32 jours, mais sa répartition à la surface des érythrocytes en bouquets n'est pas modifiée pendant le vieillissement (Fishelson et *al.*, 1993). Cette densité peut être mesurée par cytométrie en flux, après marquage à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CR1 ne reconnaissant qu'un seul épitope dans les SCR 29 et 30. Ceci évite que les anticorps ne reconnaissent les multiples épitopes de CR1 (structure répétitive) (Cohen et *al.*, 1999).

Par ailleurs, et de façon acquise, la densité de CR1E est diminuée dans les maladies à complexes immuns telles que le lupus érythémateux systémique (LES) et cela d'une façon grossièrement parallèle aux poussées, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérodermie, ainsi que dans l'infection à VIH au stade de SIDA (Cohen et *al.*, 1992). Il en résulte une mauvaise clairance de ces complexes immuns par l'organisme, et leurs dépôts dans les tissus où ils provoquent des lésions inflammatoires.

3. Polymorphisme du groupe sanguin Knops

Le système Knops, ou KN selon la nomenclature internationale, est le 22^{ème} groupe sanguin répertorié par l'ISBT (International Society of Blood Transfusion). Il comporte 9 spécificités antigéniques exprimées par le CR1 au niveau des hématies. Il existe trois paires antigéniques antithétiques, KN1/KN2, KN3/KN6, et KN4/KN7, et 3 antigènes isolés, KN5, KN8, KN9. Les antigènes KN1, KN3, KN4, KN5 sont des antigènes de fréquence élevée du système KN, c'est-à-dire exprimés chez plus de 99% de population générale.

IV. Fonctions du CR1

CR1 a plusieurs fonctions : le contrôle de l'activation du complément (régulation), la fixation, le transport et la clairance des complexes immuns. Enfin, CR1 participe également à la réponse immunitaire humorale.

1. Inactivation des voies classique et alterne du complément

Le CR1 (récepteur du C3b et C4b), intervient à plusieurs niveaux :

Il permet l'inactivation du complément en liant les fragments C3b et C4b, dissocie les convertases classiques et alternes (dissociation de C2a du complexe C4b2a et dissociation de C3b du complexe C3bBb), augmente le clivage de C4b (Masaki et *al.*, 1992) et de C3b par le facteur I (Medof et *al.*, 1982). Il agit également comme cofacteur du facteur I qui arrête ainsi l'amplification par la boucle du C3 (Figure 20).

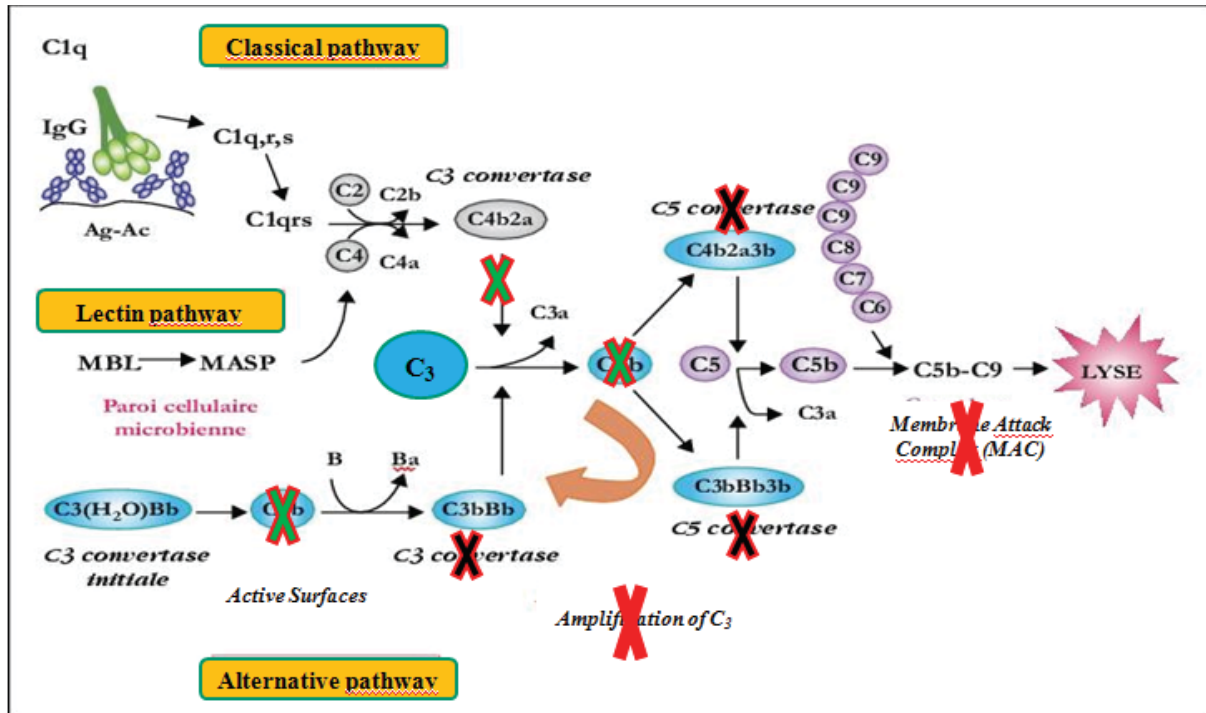


Figure 20 Rôle de CR1 dans la régulation de la voie du complément.

2. Capture et fixation des complexes immuns

CR1 joue également un rôle dans la capture des complexes immuns dans la circulation. En effet, cette capture dépend à la fois de la taille des complexes immuns qui doit être suffisante pour permettre l'incorporation d'une quantité importante de C3b (Lennek et *al.*, 1981), et du nombre de bouquets de CR1 à la surface de l'érythrocyte (Cosio et *al.*, 1990a). Dans ce sens, Madi et *al.* (1991) ont montré que le nombre de complexes immuns fixés par les érythrocytes était corrélé à la densité de CR1E. De plus, les différences d'affinité entre les érythrocytes exprimant l'allotype CR1*1 et érythrocytes exprimant l'allotype CR1*4 étaient minimes, voire inexistantes, malgré le fait que le nombre de sites de fixation de C3b variait avec la taille des allotypes. Par ailleurs, *in vitro*, Ng et *al.* (1988) ont même constaté un transfert de complexes immuns des érythrocytes ayant une faible densité de CR1 vers les érythrocytes à plus forte densité de CR1.

3. Transport et clairance des complexes immuns

Les complexes immuns fixés par CR1 sont transportés par les érythrocytes jusqu'aux organes d'épuration (rate et foie) où ils sont transférés aux cellules du système des phagocytes mononucléés (macrophages), sans dommage pour l'érythrocyte qui repart dans la circulation où il peut de nouveau fixer d'autres complexes immuns (Figure 21).

En l'occurrence, les complexes immuns non fixés aux érythrocytes via CR1, en raison de leurs petites tailles ou de leurs faibles opsonisation, sont éliminés dans la circulation et se déposent principalement dans les tissus des organes fortement vascularisés comme le rein, le poumon ou le cerveau (Schifferli et *al.*, 1989).

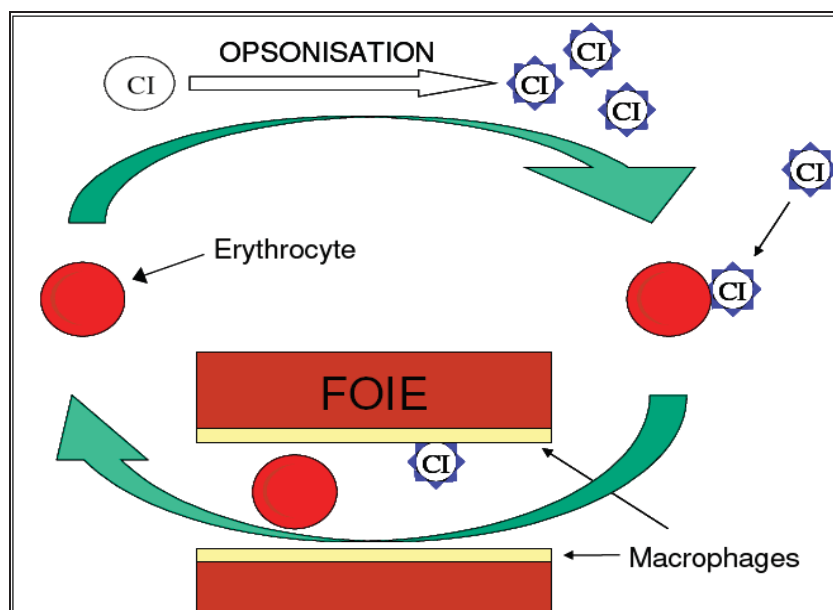


Figure 21 Capture et clairance des complexes immuns par CR1.

4. Rôle du CR1 dans l'immunité adaptative

CR1 intervient à plusieurs niveaux de l'immunité humorale : il joue un rôle dans les processus d'activation et d'anergie des lymphocytes B, et dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. En effet, Jozsi et *al.* (2002) ont montré qu'un agrégat de C3 mimant le C3b multimérique en se liant au CR1, inhibe fortement, et de façon dose dépendante, la prolifération des lymphocytes B induite par un anticorps anti-IgM, cela même en présence des cytokines costimulatrices IL-2 et IL-5. La libération de Ca^{2+} et la phosphorylation des résidus tyrosines des protéines cytoplasmiques sont aussi inhibées par le C3 multimérique. Ceci indique que le CR1 exprimé par les lymphocytes B humains

transmet un signal inhibiteur. Par ailleurs, CR1 joue un rôle dans l'activation du complément par les lymphocytes B via la voie classique. Il favorise le dépôt de fragment C3 et la formation du complexe d'attaque membranaire à la surface des lymphocytes B périphériques normaux. La formation du complexe d'attaque membranaire induit des modifications de la polarité membranaire, une libération de Ca^{2+} intracellulaire et conduit à l'activation des voies de transduction cellulaires (Krych *et al.*, 1994).

Les lymphocytes T expriment CR1 à leur surface. L'expression de CR1 serait plus importante au niveau des lymphocytes T CD4⁺ qu'au niveau des lymphocytes T CD8⁺. Cependant, la signification fonctionnelle n'est pas établie (Rodgaard *et al.*, 1991). Une augmentation de l'expression de CR1 sur les lymphocytes T activés a été démontrée, suggérant un rôle de CR1 dans la régulation de l'immunité cellulaire (Rodgaard *et al.*, 1995).

V. Le CR1 soluble (CR1S)

1. Historique et distribution

Yoon et Fearon (1985) ont rapporté qu'il existait une forme soluble de CR1 (CR1S) libre dans la circulation, présente dans le plasma (Yoon & Fearon, 1985), le liquide synovial (Sadallah *et al.*, 1997) et le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Vedeler *et al.*, 1996).

Cependant, d'après Pascual *et al.* (1993a), les concentrations plasmatiques physiologiques sont trop faibles pour avoir un rôle fonctionnel significatif. En effet, les concentrations de CR1S varient de 15 à 80 ng/mL, avec une moyenne de 30 ± 8 ng/mL. Ces concentrations représentent environ 7% de la quantité totale de CR1 présent à la surface des érythrocytes, et sont corrélées à la densité de CR1E. Par ailleurs, certains auteurs ont montré que la concentration de CR1S était augmentée chez les patients atteints de cirrhose hépatique et chez les patients dialysés (Pascual *et al.*, 1993a), et plus récemment dans certaines maladies autoimmunes comme le lupus érythémateux systémique (Kubiak-Wlekly *et al.*, 2009) mais pas chez les malades atteints de SIDA (Sadallah *et al.*, 1997 ; Yoon & Fearon, 1985). De plus, cette augmentation de la concentration de CR1S était réversible après une greffe rénale ou hépatique.

2. Origine

La protéolyse de la forme membranaire de CR1 reste l'explication la plus plausible de la présence du CR1S comme démontré pour de nombreuses molécules transmembranaires ayant une forme soluble (récepteur pour l'IL4, TNF...) (Ehlers et *al.*, 1991). En effet, Hamer et *al.* (1998) ont montré que le CR1S résultait du clivage protéolytique de la région C-terminale du CR1. Ce clivage a donc lieu dans un compartiment intra-cellulaire, probablement au niveau de la région trans de l'appareil de Golgi (Hamer et *al.*, 1998).

3. Fonctions

Bien que les concentrations plasmatiques physiologiques de CR1S soient trop faibles par rapport à d'autres inhibiteurs solubles de l'activation du complément (20 000 fois inférieures au facteur H), plusieurs auteurs considèrent le CR1S comme une molécule très active localement (Liu & Niu, 2009) et 100 fois plus active que le facteur H (Weisman et *al.*, 1990). En effet, certains auteurs rapportent que le CR1S a un rôle dans la régulation de la voie du complément et présente également une activité anti-inflammatoire (Hamer et *al.*, 1998). Le CR1S serait un inhibiteur puissant localement qui interviendrait aussi bien au niveau de la voie classique, que de la voie des lectines et de la voie alterne du système du complément (Ramaglia et *al.*, 2008 ; Jacquet et *al.*, 2013). En effet, le mécanisme d'action du CR1S semble double (Zhu et *al.*, 2015). D'une part, il facilite la dissociation des C3 convertases et d'autre part en fixant C3b et C4b, il inhibe une activation excessive du complément.

VI. Rôle potentiel de CR1 dans la pathogénèse de la maladie D'Alzheimer

Plusieurs études suggèrent l'implication de CR1 dans la pathogénèse de la MA, via plusieurs mécanismes : (i) la voie amyloïde, (ii) la neuroinflammation, (iii) la tauopathie.

1. Hypothèse de la voie amyloïde

Plusieurs auteurs supposent que ce n'est pas l'importance de l'accumulation des peptides A β qui serait responsable de la MA à début tardif, mais sa clairance (Mawuenyega et *al.*, 2010 ; Zhu et *al.*, 2015).

Dans ce sens, CR1 pourrait contribuer à la pathogénèse de la MA en modulant la clairance des peptides A β à travers deux voies. La première est périphérique via les érythrocytes, et la seconde est centrale directement dans le cerveau.

a. Au niveau périphérique

Les peptides A β (40-42), résultant du clivage de l'APP par les β et γ sécrétases, sont retrouvés aussi bien au niveau du cerveau qu'au niveau d'autres tissus périphériques tels que le foie, la rate, le pancréas, le cœur, la peau, les ganglions lymphatiques, le muscle squelettique, mais aussi au niveau du plasma, du LCR et des urines (Joachim et *al.*, 1989 ; Li et *al.*, 1998 ; Mayeux et *al.*, 1999). Bien que certaines études aient montré que les concentrations d'A β plasmatique ne différaient pas entre des sujets atteints de MA et des témoins (Scheuner et *al.*, 1996), d'autres ont montré que les concentrations d'A β plasmatique étaient plus élevées chez des sujets atteints du syndrome de Down (Matsubara et *al.*, 1999), et aussi que des concentrations élevées d'A β plasmatique étaient associées à un risque plus élevé de développer une MA (Mayeux et *al.*, 1999). Par ailleurs, dans le sérum, le peptide A β_{42} se lie à CR1 exprimé à la surface des érythrocytes, permettant ainsi son élimination par les érythrocytes. Ainsi, il a déjà été montré que les érythrocytes pouvaient séquestrer les peptides A β d'une manière anticorps-indépendante.

Au niveau périphérique, le système du complément peut être activé par le peptide A β . Ainsi, les fractions du complément opsonisées, telles que C3b, vont se lier au peptide A β . CR1, dont une des principales fonctions est le transport des complexes immuns opsonisés vers le foie (Ghiso et *al.*, 2004), permettrait l'élimination du peptide A β de la circulation périphérique en se liant aux fragments C3b liés à ce peptide A β , jouant alors un rôle dans la clairance du peptide A β (Rogers et *al.*, 2006).

b. Au niveau cérébral

Dans le cerveau des sujets atteints de MA, le système du complément peut être activé par les peptides A β , en particulier les formes oligomériques (Rogers et *al.*, 1992), et par les fractions du complément opsonisées, telles que C3b, liées au peptide A β d'une manière anticorps-indépendante (Rogers et *al.*, 2006), suggérant ainsi un rôle de CR1 dans la clairance du peptide A β .

Par ailleurs, certains auteurs suggèrent un rôle de CR1 au niveau des cellules microgliales. En effet, certains auteurs ont montré qu'au cours de la MA, les cellules microgliales exprimaient un phénotype précoce actif dans la réponse immunitaire, autre marqueur de risque de développer la MA (Jones et *al.*, 2010 ; Lautner et *al.*, 2011). En effet, en présence du peptide A β , le C3b se lie au peptide A β , et sous l'action de cofacteurs (B et D), aboutit à la formation du complexe C3 convertase (Tohyama & Yamamura, 2006). Ainsi, la présence des peptides A β entraînerait une activation de la C3 convertase, suivie d'un clivage de C3b en C3bi, qui va opsoniser les peptides A β et conduire à leur capture par les phagocytes exprimant CR3 (récepteur du C3bi). Ainsi, CR1 jouerait alors un rôle dans la clairance des peptides A β , via la modulation du clivage de C3b. Par ailleurs, Crehan et *al.* (2013) ont montré que le blocage de CR1 supprimait le clivage de C3b en C3bi, de manière à empêcher la phagocytose, chez le rongeur. Les auteurs suggèrent ainsi un rôle de CR1 dans la phagocytose par les cellules microgliales, qui pourrait également influencer la mort neuronale observée au cours de la MA.

2. Hypothèse de la neuroinflammation

La neuroinflammation joue un rôle sinistre (négatif) dans le processus physiopathologique de la MA, pouvant même être considérée par certains auteurs comme étant le mécanisme initiant la maladie (Sleegers et *al.*, 2010, Zhu et *al.*, 2015). Le système du complément étant un initiateur clé de l'inflammation (Song et *al.*, 2000), comme décrit dans les chapitres précédents (régulation de la voie du complément), CR1 pourrait jouer un rôle dans la neuroinflammation via la modulation de l'inflammation.

La majorité des protéines du complément sont synthétisées au niveau du foie et sont présentes à des concentrations élevées au niveau du sérum. Cependant, les cellules gliales et les neurones dans le système nerveux central peuvent produire plusieurs composants du système du complément, et cette production est élevée au cours de la MA. Dans ce sens, Akiyama et *al.* (2000) ont montré que les protéines du complément et du CAM (Complexe d'attaque membranaire) activés, étaient associées aux caractéristiques physiopathologiques de la MA, telles que les plaques amyloïdes et la mort neuronale, suggérant un effet néfaste de l'activation du complément sur le cerveau. Ainsi, il est possible que la réduction (ou l'inhibition) de l'activation du complément ait un effet

protecteur dans le cerveau. CR1, qui peut atténuer la réponse immunitaire, pourrait ainsi prévenir la survenue des lésions cérébrales observées au cours de la MA. Cependant, Wyss-Coray et *al.* (2002) ont montré dans un modèle de souris transgéniques que l'inhibition de l'activation du complément était associée à une augmentation des dépôts amyloïdes et de neurodégénérescence, alors que l'activation du complément (surexpression de C3) était associée à une diminution de la charge amyloïde, suggérant que la voie du complément ait un rôle de protection. Dans ce scénario, l'isoforme de CR1 le plus long, CR1*2, aurait une activité plus inhibitrice du complément, et donc supprimerait l'effet protecteur de la voie du complément (Brouwers et *al.*, 2012).

Bien que le rôle du système du complément dans la pathogénèse de la MA ait été souligné dans plusieurs études, le rôle cellulaire et moléculaire des protéines du complément n'est pas entièrement connu. Crehan et *al.* (2013) ont étudié le rôle du CR1 microglial dans la survenue de dommages neuronaux chez le rongeur, et ont montré que les cellules microgliales présentaient un phénotype activé associé à une augmentation de l'expression de CR1. Les auteurs ont également montré que l'activation du CR1 microglial était préjudiciable aux neurones, et ceci en corrélation avec une augmentation de la production de superoxyde microglial intra-cellulaire, TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et IL1- β (Interleukine 1- β). Ces résultats suggèrent un rôle du CR1 microglial dans la mort neuronale, observée au cours de la MA.

3. Hypothèse de la voie Tau

Bien que de nombreuses études aient exploré les liens possibles entre CR1 et la voie amyloïde, très peu d'études se sont intéressées au rôle potentiel de CR1 dans la voie Tau. D'après Gandy et *al.* (2013), et d'après une étude menée par Haroutunian et dont les données ne sont pas publiées, les concentrations d'ARNm de CR1 étaient en corrélation avec la densité de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) et la phosphorylation de tau. Néanmoins, lier l'expression de CR1 à la tauopathie nécessite plus d'études. Dans ce sens, Killick et *al.* (2013) ont mené une étude chez le rongeur pour explorer le lien potentiel entre CR1 et la tauopathie. Chez le rongeur, le gène orthologue le plus proche de *CR1* est *Crry* (CR1-lié à la protéine y). Les auteurs ont examiné, par immunoblotting, les lysats hippocampiques provenant de souris *Crry* $-/-$ et ceux de souris contrôles appariées sur l'âge. Le facteur H était considéré comme un biomarqueur de la progression de la

maladie, la phosphorylation de tau sur le site sérine 235 et les formes hyperphosphorylées de la protéine tau étaient considérées comme des caractéristiques neuropathologiques de la MA. Ces auteurs ont montré que le facteur H et la phosphorylation de tau sur le site sérine 235 étaient significativement réduits chez les souris *Crry* $-/-$ par rapport aux contrôles (Killick et *al.*, 2013). Ces résultats suggéraient que CR1 aurait un rôle dans la phosphorylation de tau. Cette étude constitue un point de départ pour de nouvelles tentatives pour montrer un rôle potentiel de CR1 dans la tauopathie.

DEUXIEME PARTIE – Projet de Recherche

Chapitre I – Hypothèses et objectifs

Le CR1 peut exister sous différentes formes structurales, ce qui pourrait induire des niveaux de risque différents, voire intervenir dans les mécanismes physiopathologiques de la MA. Certains phénotypes d'expression de CR1 pourraient protéger contre la MA tandis que d'autres pourraient augmenter le risque de développer la maladie. Plusieurs hypothèses concernant le rôle du CR1 dans le développement de la MA ont été proposées mais elles restent à démontrer. En effet, le CR1 pourrait avoir un effet protecteur en favorisant la clairance des peptides β -amyloïde dont l'accumulation, sous forme de plaques, est l'une des deux lésions caractéristiques de la MA (Sleegers et *al.*, 2010). Une autre hypothèse propose un rôle prépondérant de la réaction inflammatoire, et donc une implication de CR1 dans la modulation de la réponse immune, dans le développement de la maladie (Zetzsche et *al.*, 2010).

Enfin, le CR1 soluble (CR1S) pourrait jouer un rôle d'anti-inflammatoire (Sleegers et *al.*, 2010), mais la corrélation entre le taux de CR1S et l'apparition de la maladie reste à démontrer.

Si de nombreuses études génétiques semblent avoir montré un lien évident entre le gène *CRI* et la MA, aucune exploration d'un lien entre les polymorphismes de la protéine CR1 (longueur / densité) et la maladie n'a encore été réalisée.

L'objectif principal de cette étude était donc de rechercher si l'expression de CR1, étudiée à travers les polymorphismes de longueur, les polymorphismes de densité (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes), le taux de CR1 soluble sérique, déterminée de façon génétique ou acquise, serait un facteur de susceptibilité de la MA. Le second objectif était de lier les différences décelées chez les patients atteints de MA et les témoins à des éléments de physiopathologie.

Chapitre II – Méthodes

I. Population de l'étude

Il s'agit d'une étude cas-témoins, à inclusion prospective, unicentrique. Les sujets sont des patients caucasiens consultant ou hospitalisés dans le service de médecine interne et gériatrie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Reims et bénéficiant du bilan complet classiquement réalisé dans le cadre de la recherche d'une MA ou syndromes apparentés (examen clinique, tests psychométriques, tests neuropsychologiques, imagerie cérébrale, biologie standard et, le cas échéant, étude des biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien).

1. Critères d'inclusion

- Patients caucasiens âgés de 65 ans ou plus, consultant ou hospitalisés dans le service de médecine interne et gériatrie du CHU de Reims.
- Le groupe « cas » était constitué de patients chez qui le diagnostic de MA a été posé au terme de ce bilan complet selon les critères du DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000), du NINCDS-ADRDA (McKhann et *al.*, 1984) et/ou des nouveaux critères de Dubois (Dubois et *al.*, 2010).
- Le groupe « témoins » était constitué : (i) soit de patients consultant pour un motif autre que plainte mnésique ou hospitalisés pour un motif autre que troubles cognitifs, et chez qui le diagnostic de MA a été exclu au terme de ce bilan complet, (ii) soit de sujets volontaires ayant bénéficié d'un bilan complet permettant d'exclure une MA ou syndromes apparentés.

2. Critères de non inclusion

- Patients protégés par la loi (tutelle ou curatelle).
- Patients présentant une pathologie pouvant modifier la physiologie du CR1 telle que les anémies hémolytiques, une insuffisance rénale ou hépatique sévère, une maladie auto-immune (lupus) ou une infection à VIH.

Les modalités et objectifs de l'étude ont été exposés à tout patient éligible dans l'étude. Pour chaque patient ayant accepté de participer à l'étude, un formulaire de

consentement éclairé a été signé et un prélèvement sanguin réalisé. Ce prélèvement comportait deux tubes (un tube EDTA et un tube sec) afin de réaliser les analyses biologiques spécifiques à cette étude.

3. Variables recueillies

Pour chaque sujet inclus, ont été recueillis :

- les caractéristiques socio-démographiques : âge, sexe, lieu de vie, niveau d'étude,
- les caractéristiques cliniques : motif de consultation ou d'hospitalisation, antécédents médicaux, nombre de médicaments, score de comorbidités calculé par l'indice de Charlson (Charlson et al., 1987),
- l'état cognitif global évalué par le Mini Mental State Examination (MMSE) (Derouesné et al., 1999 ; Folstein et al., 1975 ; Kalafat et al., 2003) et le test du cadran de l'horloge (TCH) (Manos, 1998),
- les données de l'évaluation fonctionnelle : état d'autonomie évalué par l'échelle IADL de Lawton (Instrumental Activities of Daily Living) (Lawton & Brody, 1969) et l'échelle ADL de Katz (Activities of Daily Living) (Katz et al., 1963),
- l'état thymique évalué par l'échelle de Cornell ou la mini-GDS (Geriatric depression scale) selon le cas,
- l'état nutritionnel évalué par la MNA (Mini Nutritional Assessment) (Rubenstein et al., 2001),
- les tests neuropsychologiques : évaluent plusieurs grandes fonctions cognitives pertinentes pour la détection d'un déficit/déclin cognitif :
 - Le fonctionnement mnésique : Evaluation de la mémoire épisodique verbale réalisée grâce au test du rappel libre/rappel indicé en 16 items (Van Der Linden et al., 2004), et évaluation de la mémoire épisodique visuelle par le DMS 48 (Barbeau et al., 2004) et par les épreuves visuelles issues de la BEM 144 (Signoret, 1991).
 - Le fonctionnement exécutif : une évaluation de la mémoire de travail est effectuée en modalité verbale grâce à l'indice de mémoire de travail de la WAIS IV (Wechsler, 2008) et en modalité visuelle grâce aux cubes de Corsi (Corsi, 1972) ou aux cubes de la MEMIII (Wechsler,

2001). L'évaluation de la sensibilité à l'interférence est réalisée par le test de Stroop (Roussel & Godefroy, 2008). La vitesse de traitement de l'information est estimée grâce à l'indice de vitesse de traitement de la WAIS IV (Wechsler, 2008). Les capacités de flexibilité mentale sont explorées à l'aide du Trail Making Test, forme A et B (Tombaugh, 2004). Une évaluation des capacités d'abstraction verbale réalisée par le subtest Similitudes de la WAIS IV (Wechsler, 2008). Les capacités d'abstraction visuelle, l'identification de concepts, la résistance à l'interférence et la capacité à identifier et maintenir une règle sont évaluées par Le Modified Card Sorting Test (Nelson, 1976). Une évaluation des fluences littérales et sémantique (Cardebat et *al.*, 1990). Enfin, la programmation motrice et l'inhibition motrice sont évaluées par la BREF (Dubois et *al.*, 2000).

- Le fonctionnement langagier : L'accès au lexique est évalué par une épreuve de dénomination verbale (De Partz et *al.*, 2001). L'appariement sémantique est évalué par le Pyramid and Palm Tree Test (Howard et *al.*, 1992). Les connaissances sémantiques plus générales sont évaluées par la BECS-GRECO (Merck et *al.*, 2011). La compréhension verbale orale et écrite est évaluée par le MT86 (Nespoulous et *al.*, 1993). La production écrite et l'orthographe sont évaluées par une épreuve de dictée (Croisile, 1999).
- Les gnosies visuelles : une batterie est utilisée afin d'évaluer les traitements perceptifs (précoce, intermédiaire et tardif) et les traitements associatifs (structural et sémantique) : le Protocole d'Evaluation des Gnosies Visuelles (PEGV) (Agniel et *al.*, 1993).
- Les praxies gestuelles : deux batteries sont utilisées afin d'évaluer le versant moteur et le versant associatif ainsi que la reconnaissance des gestes significatifs ou non (Anicet et *al.*, 2007 ; Mahieux-Laurent et *al.*, 2009).
- Les données issues des examens complémentaires classiquement réalisés dans le cadre d'un bilan de troubles cognitifs : données biologiques (numération formule sanguine, plaquettes, ionogramme sanguin, glycémie, calcémie,

créatininémie, TSH, Vitamine B12, folates érythrocytaires et le cas échéant, une étude des biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien) et données de l'imagerie cérébrale.

- Les données biologiques spécifiques à l'étude : polymorphisme de longueur de CR1 érythrocytaire, étudié au niveau protéique et au niveau du gène, polymorphisme de densité de CR1 érythrocytaire ou CR1/E (nombre de sites antigéniques par érythrocytes = expression), étudié au niveau protéique et au niveau du gène (sites *HindIII* et Q981H), analyse des SNPs reliés à l'expression érythrocytaire du CR1 et enfin le taux sérique du CR1 soluble.

4. Plan d'investigation

- L'acheminement des prélèvements sanguins s'est fait immédiatement vers le laboratoire d'immunologie du CHU de Reims, sans condition particulière de transport. Ces prélèvements ont été conservés à 4°C.
- A partir du tube sec, les sérums ont été aliquotés dans les 24 heures et congelés à -20°C, ce qui a permis d'effectuer des analyses CR1S en technique ELISA en série.
- A partir du tube EDTA :
 - Techniques de marquage anti-CR1 et lecture en cytométrie en flux.
 - Extraction membranaire pour effectuer en série un Western-blot anti-CR1.
 - Extraction d'ADN pour effectuer en série les études de biologie moléculaire.
- La technique de marquage anti-CR1 et lecture en cytométrie en flux ainsi que l'extraction d'ADN et de protéines ont été réalisées chaque semaine. Le Western-blot anti-CR1, l'ELISA anti-CR1S et les techniques de biologie moléculaire ont été réalisés par regroupement en séries constituées au fil du temps de collection des échantillons, de nombre de sujets adapté à l'analyse concernée.
- La densité de CR1/E a été déterminée par cytométrie en flux. Le taux sérique de CR1S était déterminé par ELISA. Le polymorphisme de longueur de la molécule a été caractérisé par Western-blot et HRM (High Resolution Melting). Les SNPs reliés à l'expression érythrocytaire du CR1 ont été analysés par biologie moléculaire : amplification d'ADN suivie d'une technique de pyroséquençage.

5. Critères de jugement

Polymorphisme de longueur de la molécule (au niveau de la protéine et du gène), polymorphisme de densité de CR1 (au niveau de la protéine : densité de CR1/E correspondant au nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes), et au niveau du gène (site *HindIII* et Q981H), étude des SNPs reliés à l'expression érythrocytaire du CR1, et taux du CR1 sérique soluble.

6. Considérations éthiques

Cette étude relevant de la loi de recherche biomédicale a reçu l'aval du Comité de protection des personnes (CPP) et de l'Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) (Actuellement ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). Les modalités et objectifs de l'étude ont été exposés à tout patient éligible dans l'étude. Pour chaque patient ayant accepté de participer à l'étude, un formulaire de consentement éclairé a été signé et un prélèvement sanguin réalisé. Ce prélèvement comportait deux tubes (un tube EDTA et un tube sec) afin de réaliser les analyses biologiques spécifiques à cette étude.

II. Etude des SNPs

1. Amplification de rs6656401, rs113531714 et rs112003429

Les amorces utilisées étaient A661A 5'-GGCTTGTAGATGCATCATTTCC-3' et A661RE BIOT 5'-CAATCACGTTAATGATCTCGAGC-3' biotinylé en 5' afin de permettre l'immobilisation du produit de PCR sur les billes de streptavidine et la préparation d'un ADN simple brin. La PCR a été réalisée à l'aide de l'appareil « MyCycler » (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) dans les conditions suivantes : 100 µL de volume final contenant 1 µL d'ADN (entre 100 et 250 ng), les dNTP (déoxynucleotide triphosphates) utilisés à une concentration de 200 µmol/L pour chacun, les amorces à la concentration de 0,5 mmol/L chacune, 1,5 mmol/L de MgCl₂, et 2,5 U de Taq ADN polymérase (AmpliTaq, Applied Biosystems, Saint Aubin, France) dans le tampon fourni par le fabricant.

Les conditions d'amplifications étaient les suivantes : 1 cycle à 94°C pendant 10 minutes, puis 35 cycles à 94°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 30 secondes, et 72°C pendant 30 secondes, suivies d'1 cycle à 72°C pendant 10 minutes.

Tous les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium avant son isolement pour pyroséquençage.

2. Amplification de rs3818361

Les amorces utilisées étaient ALZ1 5'-TGTTAGATATGGGGCAATTTC-3' et ALZ1RE BIOT 5'-TGTGGCTACTGAACTACCAATCTT-3' biotinyllé en 5' afin de permettre l'immobilisation du produit de PCR sur les billes de streptavidine et la préparation d'un ADN simple brin.

La PCR a été réalisée à l'aide de l'appareil « MyCycler » (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) dans les conditions suivantes : 100 µL de volume final contenant 1 µL d'ADN (entre 100 et 250 ng), les dNTP (déoxynucleotide triphosphates) utilisés à une concentration de 200 µmol/L pour chacun, les amorces à la concentration de 0,5 mmol/L chacune, 2 mmol/L de MgCl₂, et 2.5 U de Taq ADN polymérase (AmpliTaq, Applied Biosystems, Saint Aubin, France) dans le tampon fourni par le fabricant.

Les conditions d'amplifications étaient les suivantes : 1 cycle à 94°C pendant 10 minutes, puis 35 Cycles à 94°C pendant 60 secondes, 58°C pendant 60 secondes, et 72°C pendant 60 secondes, suivies d'1 cycle à 72°C pendant 10 minutes.

Tous les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium avant son isolement pour pyroséquençage.

3. Amplification du SCR 24-25

Les amorces utilisées étaient SCR2425 5'-TAAAAAATAAGCTGTTTTACCATACTC-3' et SCR2425inv 5'-CCCTCACACCCAGCAAAGTC-3' afin de permettre l'immobilisation du produit de PCR sur les billes de streptavidine et la préparation d'un ADN simple brin. La PCR a été réalisée à l'aide de l'appareil « MyCycler » (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) dans les conditions suivantes : 100 µL de volume final contenant 1 µL d'ADN (entre 100 et 250 ng), chaque dNTP concentré à 200 µmol/L, chaque amorce concentrée à 0.5 mmol/L, 2.5 mmol/L de MgCl₂, et 2.5 U de Taq ADN Gold polymérase (AmpliTaq, Applied Biosystems, Saint Aubin, France) dans le tampon fourni par le fabricant.

Les conditions d'amplifications étaient les suivantes : 1 cycle à 94°C pendant 10 minutes, puis 35 Cycles à 94°C pendant 60 secondes, 58°C pendant 60 secondes, et 72°C pendant 60 secondes, suivies d'1 cycle à 72°C pendant 7 minutes.

Tous les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium avant purification sur colonne Qiaquick (Qiaquick PCR purification kit, Qiagen, Saint Aubin, France) et son isolement pour pyroséquençage.

4. Pyroséquençage

Les amorces ont été conçues pour s'hybrider à proximité des codons rs6656401 et rs3818361 du gène *CRI* : A66SEQ 5'-CCTTCTCTGTCTCCATCTT-3' et ALZ1SEQ 5'-ATGGGGCAATTCCT-3', respectivement. Le produit PCR biotinylé (40 µL) a été immobilisé sur des billes de Sepharose recouvertes de 4 µL de streptavidine (capacité de liaison > à 1,2 nmol; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) dans 40 µL de tampon de liaison (10 mmol/L Tris-HCl [pH 7,6], 2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0,1% Tween 20) sur un incubateur (1400 rpm) à température ambiante pendant 10 minutes. Les produits de PCR immobilisés sur les billes ont été ensuite transférés sur une plaque filtrante à 96 puits (Millipore, Molsheim, France) et séchés sous vide. L'ADN simple brin a été obtenu en ajoutant 50 µL de solution de dénaturation (0,2 mol/L de NaOH) pendant 1 minute. Le brin immobilisé a été lavé deux fois avec 150 µL de tampon de lavage (10 mmol/L Tris-acétate [pH 7,6]) puis remis en suspension dans 45 µL de tampon d'hybridation (20 mmol/L Tris-acétate [pH 7,6], 2 mmol/L acétate de magnésium) et transféré dans les puits contenant 15 pmol d'amorce de séquençage dans un volume de 1,5 µL de tampon d'hybridation. La plaque a été chauffée à 61°C pendant 5 minutes. Le pyroséquençage en temps réel (Real-time Pyrosequencing) a été réalisé à 28°C dans un automate de 96 puits, en utilisant le pyroséquenceur PSQ SNP 96 enzymes et substrat (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden) avec dispense cyclique de nucléotide.

Concernant le SCR 24-25, les produits d'amplification ont été séquençés en utilisant le pyroséquenceur Genetic Analyzers 3130 (Hitachi, Applied Biosystems, Saint Aubin, France).

L'analyse par ordinateur a été basée sur un algorithme comparant les hauteurs des différents pics et le nombre de bases du fragment polymorphique.

III. Etude des polymorphismes de longueur de CR1

Les polymorphismes de longueur de CR1 ont été étudiés aussi bien au niveau de la protéine qu'au niveau du gène.

1. Etude des polymorphismes de longueur au niveau de la protéine

a. Anticorps monoclonaux anti-CR1

Nous avons utilisé comme anticorps anti-CR1 l'anticorps J3D3. J3D3 est un anticorps appartenant à un groupe d'anticorps comme J8B10, TO5, 9H3, 7G9, et YZ-1 reconnaissant des épitopes localisés au niveau des trois derniers SCRs (Short Consensus Repeat) des trois premiers LHRs (Long Homologus Repeat) de la molécule CR1 : SCRs 5, 6, 7, 12, 13, 14, 19, 20 et 21 (Nickells et *al.*, 1998).

D'autres anticorps monoclonaux anti-CR1 J3B11, TO5 et E11 ont également été utilisés pour éviter un biais lié à l'anticorps (expériences témoins) (Tableau 8).

L'anticorps monoclonal anti-CR1 (J3D3biot) a été utilisé aussi bien pour la cytométrie en flux que pour le Western Blot.

L'anticorps monoclonal anti-CR1 (J3D3) obtenu à partir de cellules d'hybridomes (Cook et *al.*, 1985) a été cultivé dans un milieu RPMI 1640 (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 10% sérum de veau foetal inactivé par la chaleur, glutamine (2 mM), pénicilline/streptomycine/fungizone (1000 U/mL ; 1000 µg/mL ; 2,5 µg/mL ; Sigma, St Quentin Fallavier, France). L'anticorps monoclonal anti-CR1 (J3D3) a été purifié à partir d'ascite de souris en utilisant la méthode de contreprécipitation à l'acide octanoïque (Steinbuch & Audran, 1969).

Tableau 8 Réactivité des différents anticorps monoclonaux anti-CR1.

	Groupe 1		Groupe 2		Groupe 3		Groupe 4		Groupe 5		Groupe 6		Groupe 7	
			Ber-MAC-DRC											
	1B4	4D12.1	J3D3	YZ-1										
	3D9	4D12.1	J8B10	7G9	E11	KuN241					3C6.D11			
	4D6.1	9A3.1	To5	9H3	HB8592	1F14.G12	J3B11				6B1.H12		8C9.1	
1-30 (sCR1)	+		+		+	+	+				+		±*	
CCP repeats :														
1-7 (LHR A)	+		+		-**	+	-				-		-	
8-114 (LHR B)	+		+		-*	+	+				-		-	
15-21 (LHR C)	+		+		+	-	+				-		-	
22-30 (LHR D+)	-		-		+	-	-				+		-	
1-4	+		-		-	-	-				-		-	
1-3	+		-		-	-	-				-		-	
8-11	+		-		-	-	+				-		-	
8-10	+		-		-	-	+				-		-	
2-8 ½	+		+		-	+	+				-		-	
1+3-8 ½	+		+		-	+	+				-		-	
1-2+4-8 ½	-		+		-	+	+				-		-	
1-4+15-18	+		-		-	-	+				-		-	
8-11+15-18	+		-		-	-	+				-		-	
Localisation de l'épitope, CCP repeat(s) :	3. 10. 17		5-7. 12-14. 19-21		5-7.* 12-14.* 19-21.	5-7. 12-14	8-8 ½ 15-15 ½ 3. 10. 17				22-30		1	
Localisation la plus probable de l'épitope	3. 10. 17		5-6. 12-13. 19-20		5-6.* 12-13.* 19-20. 26-27	7. 14	8. 15 3. 10. 17				22-25 ou 29-30		1	

b. Extraction des protéines membranaires érythrocytaire et Western Blot

La technique d'extraction est effectuée à froid (dans un bac à glace) avec refroidissement de tous les réactifs. A partir d'un prélèvement sanguin effectué sur tube EDTA, 250 µl du prélèvement sanguin sont lavés trois fois dans le PBS 5mM EDTA par centrifugation à 4°C pendant 10 min à 430g. Puis 25µl du culot sont incubés 15 minutes dans des tubes Nalgène contenant de l'eau distillée, du PMSF 0,1M et des inhibiteurs de protéases 5X (Roche, Germany), afin de lyser les cellules. Les tubes sont centrifugés à 3000g pendant 5 min, puis à 10000g pendant 20 minutes afin de précipiter les membranes. Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension dans 20µl de tampon d'extraction (Tris HCl 20mM pH7.4, NaCl 150mM, EDTA 5mM, EGTA 5mM). Puis 20µl de tampon d'extraction avec 1% de NP40 sont ajoutés. Une dernière centrifugation à 12000g pendant 15 minutes est réalisée afin d'éliminer les particules insolubles. La phase liquide contenant les protéines est récupérée et congelée à -20°C. Vingt µL d'extraits protéiques sont mélangés à 5 µL de tampon de charge non réducteur puis séparés par électrophorèse en gel polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE-SDS) à 7,5%. Le transfert des protéines a lieu sur une membrane de PVDF (Amersham, Life Sciences, France) à partir d'un *Trans-Blot SD* (Biorad, USA) en milieu semi sec avec du tampon de transfert (Tris 25mM, glycine 192mM et 15% de méthanol).

Après le transfert, les sites de la membrane sont bloqués dans du tampon phosphate salin (PBS) contenant 0,5% de lait écrémé en poudre et 0,1% de Tween 20. Après 45 minutes d'incubation et trois lavages en PBS contenant 1% de lait et 0,1% de Tween 20, la membrane est incubée pendant une nuit à 4°C avec le premier anticorps anti-CR1 biotinylé, le J3D3 (0,4 mg/ml) dilué au 1/100. Après trois lavages en PBS avec 1% de lait, l'anticorps anti-anticorps de souris biotinylé (Amersham, Life Sciences, France) dilué au 1/400 est ajouté puis incubé 1h sous agitation à température ambiante. Après trois lavages effectués comme précédemment, la streptavidine biotinylée/peroxydase (Amersham, Life Sciences, France) diluée au 1/500 est ajoutée et incubée 1h sous agitation à température ambiante. Après chaque marquage, trois lavages au PBS avec 1% de lait sont effectués et à la fin du dernier a lieu un lavage en PBS seul.

La révélation a lieu en chambre noire grâce à un kit ECL chemiluminescence (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). Après le mélange des deux réactifs et dépôt de moins d'une minute sur la membrane, la lumière émise par la réaction d'oxydation du luminol contenu dans le kit ECL par la peroxydase, est imprégnée sur des films KODAK X-OMAT AR (KODAK, Rochester, EU).

L'analyse densitométrique des WBs a été réalisée grâce à un densitomètre (Bio-Rad model Chemidoc XRS) en utilisant le logiciel Quantity One 1-D, version 4.6.1 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

2. Etude des polymorphismes de longueur de CR1 au niveau du gène

Les polymorphismes de longueur de CR1 ont également été étudiés au niveau du gène grâce à une technique innovante l'HRM (High Resolution Melting ou fusion à haute résolution).

a. Détermination des polymorphismes de longueur de CR1 par HRM (High Resolution Melting ou fusion à haute résolution)

Les amorces sens et antisens, référencées CN3 et CN3re respectivement, ont été synthétisées par la société Eurogentec (Seraing, Belgique).

Ces amorces CN3 et CN3re, présentent plus particulièrement les séquences suivantes : SEQ ID NO 1 : 5'-GGCCTTAGACTTCTCCTGC-3' et SEQ ID NO : 2 5'-GTTGACAAATTGGCGGCTTCG-3' respectivement.

Le principe de ce mode de réalisation particulier de la méthode de détection des polymorphismes de longueur de CR1 est de tirer parti de l'existence de 5 changements de nucléotides dans un segment génomique du LHR B, représentant un variant caractéristique du LHR B (segment variant B), ce dernier étant un segment génomique homologue du LHR C (segment non variant).

Les amorces (CN3 et CN3re) permettent d'amplifier les segments génomiques correspondant au segment variant B et au segment non variant du domaine LHR C.

La réaction d'amplification de ces segments a été réalisée par PCR (Polymerase Chain reaction) dans un volume total de 20 µL, utilisant 10 µL de « LightCycler 480 High Resolution Melting Master Mix 2X concentré » (Roche, Meylan, France), 2 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL d'amorce CN3 de SEQ ID NO : 1 à une concentration de 300 nmol/L, 1 µL d'amorce CN3re de SEQ ID NO : 2 à une

concentration de 300 nmol/L, 5 µL d'eau et 10 ng d'ADN génomique. Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide de plaques de 96-puits « LightCycler 480 multiwell Plate 96, white » (Roche, Meylan, France) selon le protocole d'amplification suivant : 1 cycle à 95°C pendant 10 minutes, 45 cycles à 95°C pendant 10 secondes, à 62°C pendant 15 secondes, et à 72°C pendant 20 secondes.

La fusion à haute résolution (High Resolution Melting ou HRM) des amplicons obtenus lors de l'étape de PCR a été réalisée à l'aide de l'appareil « LightCycler 480 System » (Roche, Meylan, France) et permet de mettre en évidence des profils de courbe de fusion qui correspondent aux allotypes du polymorphisme de longueur de CR1 observés en WB.

IV. Etude des polymorphismes de densité de CR1

Les polymorphismes de densité de CR1 ont été étudiés aussi bien au niveau de la protéine (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes) qu'au niveau du gène (sites *HindIII* et Q981H).

1. Etude des polymorphismes de densité de CR1 au niveau de la protéine

a. Immunomarquage du CR1 érythrocytaire et lecture par cytométrie en flux

La détermination de la densité érythrocytaire de CR1 a été réalisée par immunomarquage des érythrocytes avec un anticorps anti-CR1 et lecture en cytométrie en flux.

La cytométrie en flux (CMF) permet le dénombrement et la caractérisation de cellules en suspension par l'analyse de la diffraction de la lumière lors d'un passage devant un faisceau laser et par la mesure de l'intensité de fluorescence après immunomarquage par exemple.

A partir d'un prélèvement sanguin sur tube EDTA, 250 µL de sang ont été prélevés et ajoutés dans 8 mL de PBS-BSA 1% puis centrifugés à 4°C pendant 5 min à 700g (centrifugeuse JOUAN GR 4-22). Ce lavage a été répété deux fois. Huit µL du culot globulaire ont été mis en suspension dans 3 mL de PBS-BSA 1%. Puis 100 µL de cette dilution ont été mis dans des tubes Micronics® avec 800 µL de PBS BSA 1%

puis centrifugés à 4°C pendant 4 min à 600g. Une fois le surnageant éliminé par aspiration, les globules rouges ont été marqués avec 20 µL d'anticorps J3D3 biotinylé (0,4 mg/mL) dilué au 1/100 en PBS-BSA 1%. Un témoin négatif est réalisé avec 20 µL de PBS-BSA 1%. Une incubation de 45 min à 4°C a été faite à l'abri de la lumière. Le culot cellulaire a été lavé deux fois avec 800 µL de PBS-BSA 1% avant une incubation de 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière, avec 20 µL de streptavidine marquée à la phycoérythrine (0,2 mg/mL, ref : 12-4317-87 eBioscience, France) diluée au 1/10 en PBS-BSA 1%. Après deux lavages, le culot a été incubé avec 20 µL d'anti streptavidine biotinylée (0,5 mg/mL, ref : BA-0500 Vector Laboratories Inc USA) diluée au 1/100, pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Après deux lavages en PBS-BSA 1%, une nouvelle incubation en présence de streptavidine phycoérythrine a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. Enfin le marquage cellulaire a été fixé par 200µL d'une solution de Formaldéhyde à 37% dilué au 1/100 (ref F8775-25mL Sigma Aldrich, France) sous agitation avant la lecture au cytomètre. Les cellules marquées ont été analysées avec le cytomètre FACStar plus® (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) et avec le cytomètre Guava EasyCyte plus (Millipore, France). Au moins 10000 événements sont enregistrés par échantillon.

A chaque série, trois témoins représentatifs des trois profils de densité de CR1 possibles avaient servis de témoins positifs. A partir de ces trois témoins de référence et des témoins négatifs (sans anticorps J3D3 biot) une droite d'étalonnage était réalisée (Figure 22), puis les moyennes de fluorescence (MFC ou *Mean Fluorescence Channel*) de chaque patient étaient reportées dans un tableau Excel afin de calculer le nombre de sites de CR1 par érythrocytes (Tableau 9).

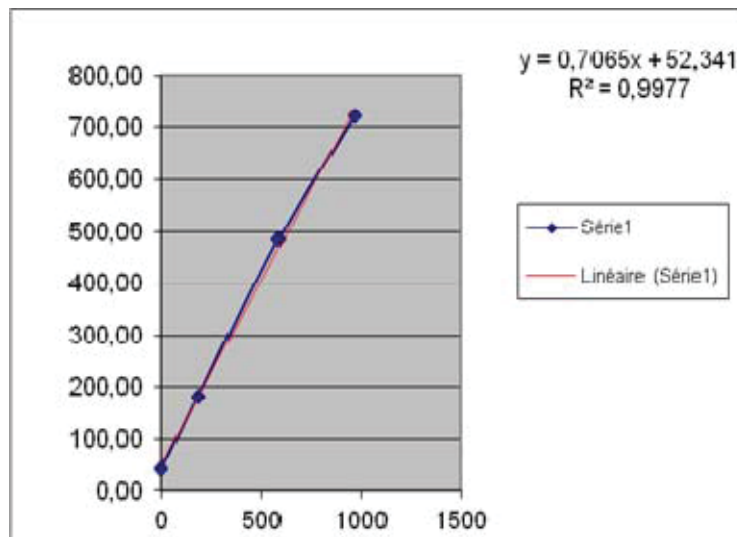


Figure 22 Droite d'étalonnage du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes obtenue suivant les références du laboratoire et les témoins négatifs.

Un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre CR1 est réalisé avant lecture sur le cytomètre en flux. Dans le cadre de cet exemple, le cytomètre en flux utilisé est le FACSGuava.

Tableau 9 Nombre de sites de CR1 par érythrocytes chez trois sujets.

	MFC	nbre de sites
Tem Neg	42,61	0
Témoin 1	181,97	180
Témoin 2	485,23	585
Témoin 3	722,48	966

Patient 1	291	338
Patient 2	469	590
Patient 3	706	925

y=mx+b	Guava
m	b
0,70648446	52,3413502
r2	0,99772212

Un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre le récepteur CR1 était réalisé avant lecture sur cytomètre en flux. Dans le cadre de cet exemple, le cytomètre en flux utilisé était

le FACSGuava. Après avoir calculé le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes pour le FACStar et le FACSGuava, nous réalisons la moyenne des deux cytomètres.

2. Etude des polymorphismes de densité de CR1 au niveau du gène

a. Extraction de l'ADN

A partir de 2 mL de prélèvement sanguin sur tube EDTA, l'extraction d'ADN s'effectue à partir du kit *QuickGene DNA whole blood* selon les instructions fournies par le fabricant (Life Science, FUJIFILM, Germany). Dans un tube Falcon de 15 mL tube EDTA, on ajoute successivement 300 µL de protéase EDB, 2 mL de sang, 2,5 mL de tampon de lyse (LDB). Ce mélange est vortexé 15 secondes puis incubé 5 minutes à 56°C. Après l'incubation, 2,5 mL d'éthanol absolu sont ajoutés. Le mélange est à nouveau vortexé 15 secondes puis transvasé dans une cartouche de l'automate. Trois étapes vont être réalisées par l'appareil : la fixation des acides nucléique par la membrane, le lavage et l'élution de l'ADN purifié. Après l'extraction, l'ADN est dosé au spectromètre à 260 nm.

b. Détermination du polymorphisme *HindIII* de l'intron 27 du gène CR1 par PCR RFLP

Dans chaque série ont été systématiquement inclus un témoin négatif sans ADN et trois témoins positifs représentatifs des trois génotypes.

Les primers de cette PCR sont PHD1 5' - CCT TCA ATG GAA TGG TGC AT - 3' et HK3, 5 AR 5' - CCC TTG TAA GGC AAG TCT GG - 3'.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume final de 50 µL contenant du tampon Taq 1X (Perkin Elmer, USA), 2 mM de MgCl₂ (Perkin Elmer, USA), 200 µM de dNTP (PHARMACIA, Sweden), 5 ng/µL de chaque primer (Eurogentec, Belgium), 1,25 U de l'AmpliTaq DNA polymérase (Roche, Germany) et 150 ng d'ADN.

Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 10 minutes à 94°C, suivies de 40 cycles d'1 minute à 94°C, d'1 minute à 58°C et d'1 minute à 72°C, pour terminer par 1 cycle de 7 minutes à 72°C. Un gel à 1% d'agarose en TBE 1X contenant du bromure d'éthidium (BET) était préparé afin de déposer les produits de

PCR. La migration a été effectuée dans du tampon TBE 1X à 100 V pendant 1h30. On attend une bande à 1700 pb.

La digestion enzymatique s'effectuait la nuit à 37°C sous un volume de 50 µL avec 15 µL d'eau distillée pour 20 µL de produits de PCR ou 5 µL d'eau distillée pour 30 µL de produits de PCR suivant l'intensité de la bande d'amplification observée précédemment puis 4 µL de tampon 10X B2 (Jena Bioscience, Germany) et 1 µL d'enzyme de restriction *HindIII* (Jena Bioscience, Germany).

Les échantillons ont été déposés sur un gel d'agarose à 2% en TBE 1X contenant du BET et la migration s'effectuait dans du tampon TBE 1X à 100 V pendant 1h30. Un produit d'amplification non digéré était systématiquement déposé à chaque série.

c. Détermination du polymorphisme Q981H de l'exon 19 du gène CR1 par pyroséquençage

Une amplification de la région à séquencer a été effectuée avec un primer biotinylé en 5'. Le mono brin d'ADN amplifié avec cette amorce a été récupéré par couplage des billes de sépharose recouvertes de streptavidine puis dénaturé.

Dans chaque série ont été systématiquement inclus un témoin négatif sans ADN et trois témoins positifs représentatifs des trois génotypes.

Les primers de la première PCR étaient 16aL 5'-GCT ACA TGC AGG TTG AGA CCT TAC-3' et PCRE111926RE 5'-CTG AGA TGT GGC TAG AAA GTA C-3'.

La PCR a été effectuée dans un volume final de 50 µL contenant du tampon Taq 1X (Promega, Madison, USA), 2 mM de MgCl₂ (Promega, Madison, USA), 200 µM de dNTP (PHARMACIA, Sweden), 5 ng/µL de chaque primer (Eurogentec, Belgium), 1,25 U de Taq DNA polymérase (Promega, Madison, USA) et environ 150 ng d'ADN.

Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 10 minutes à 94°C, suivies de 40 cycles d'une minute à 94°C, d'1 minute à 64°C et d'1 minute à 72°C, pour terminer par 1 cycle de 10 minutes à 72°C. Un gel à 2% d'agarose en TBE 1X contenant du BET était préparé afin de déposer les produits de PCR. La migration s'effectuait dans du tampon TBE 1X à 100 V pendant 1h30. La bande observée doit être située entre 200 et 500 pb. Puis une PCR nichée était effectuée afin d'obtenir une

amplification plus spécifique de l'exon 19 à partir des produits de la PCR précédente avec le primer PCRE111926RE et le primer PCRssCR1LikeBIOT 5'-CTG AGA TGT GGC TAG AAA GTA C-3'. Cette PCR était effectuée dans les mêmes conditions que la précédente avec 5 µL de produits de la première PCR diluée au 1/40 dans un volume final de 100 µL.

Comme précédemment, la taille des bandes d'ADN était vérifiée sur un gel d'agarose à 2%. En attendant le pyroséquençage, les produits de PCR étaient conservés soit à 4°C pendant une semaine, soit à -20°C au-delà d'une semaine.

Le kit utilisé est *Pyro Gold Reagents 96 MA* (QIAGEN, France). Les brins biotinylés étaient immobilisés sur billes de sépharose couplées à la streptavidine (PHARMACIA, Sweden). Dans un tube, les billes de streptavidine (4 µL par échantillon) étaient mélangées au tampon de fixation (30 µL) pour un même volume de PCR (30 µL). Dans une plaque 96 puits, les billes étaient mélangées au produit de PCR (un volume de PCR pour un volume de mélange billes-tampon de fixation). La plaque était recouverte d'un film plastique et agitée continuellement à 1400 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Tous les puits étaient aspirés à l'aide de *Vaccum Prep Tool* (QIAGEN, France) et lavés à l'éthanol 70% puis rincés à l'eau distillée. Les brins étaient ensuite dénaturés par une solution de NaOH. Sur les filtres il ne restait plus que les brins biotinylés couplés aux billes de streptavidine. La matrice immobilisée était ensuite resuspendue dans 45 µL de tampon d'hybridation puis la totalité de la plaque à filtre était transférée sur la plaque de pyroséquenceur contenant 1,5 µL de primer de séquençage PYRO2Q981H 5'-TGA TTC TGG ATC CAA C- 3' dilué au 1/10. La plaque était ensuite couverte d'un film plastique et incubée 2 minutes à 80°C. Puis elle était remise à température ambiante, pendant ce temps le pyroséquenceur *PSQ 96 MA Systems* (QIAGEN, France) était programmé. La cartouche était préparée par ajout des nucléotides A puis C, G et T, suivi du substrat et de l'enzyme. Enfin la plaque et la cartouche étaient insérées dans le pyroséquenceur et la réaction de séquençage était initiée.

V. Etude du CR1 soluble sérique par ELISA

Le tube sec était centrifugé à 1200g pendant 10 min. Les sérums étaient aliquotés puis congelés à -20°C. Le kit ELISA anti-CR1 soluble (*Uscn Life Science Inc.*, Huston, Texas, USA) a été utilisé selon les instructions données par le fabricant.

La figure 23 résume le schéma de notre étude.

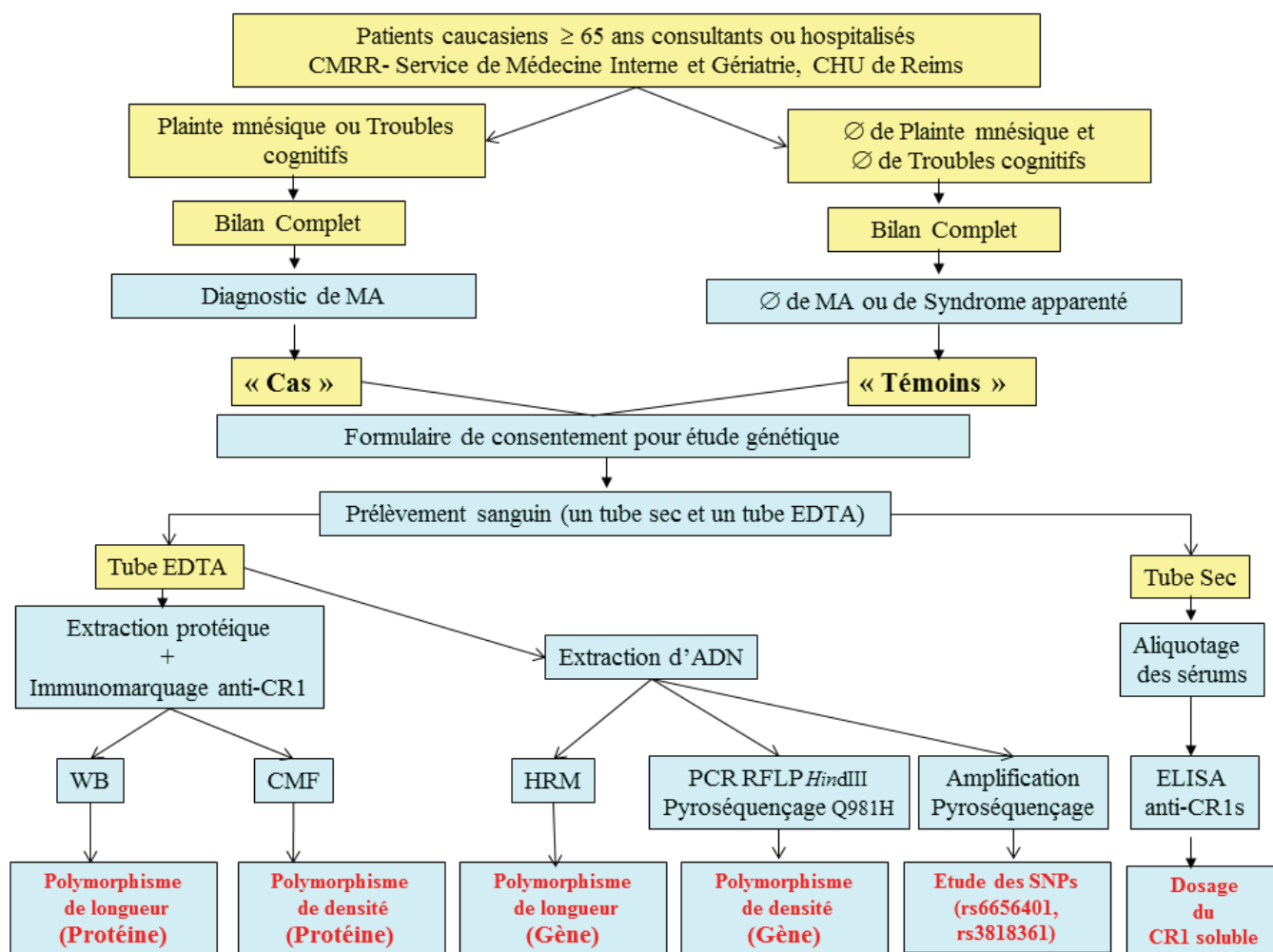


Figure 23 Schéma de l'étude.

(ADN = Acide désoxyribonucléique, CMF = Cytométrie en flux, EDTA = Ethylène diamine tétra acetic acid ou acide éthylène diamine tetraacétique, ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, HRM = High Resolution Melting ou fusion à haute résolution, MA = Maladie d'Alzheimer, PCR-RFLP = Polymérase chain reaction- Restriction fragment length polymorphism ou réaction de

polymérisation en chaîne- polymorphismes de longueur des fragments de restriction, WB = Western Blot).

VI. Analyses Statistiques

Dans un premier temps, nous avons réalisé des analyses descriptives. Les variables quantitatives ont été décrites sous forme de moyenne et écart type ($m \pm ET$) ; les variables qualitatives, sous forme d'effectif et de pourcentage.

Ensuite, nous avons réalisé des tris croisés et des analyses univariées en réalisant des comparaisons de moyennes, des comparaisons de pourcentages, ou des corrélations. Pour les comparaisons de moyennes, nous avons utilisé le test de student, le test de Mann-Withney, le test de Kruskal-Wallis, ou une analyse de variance, selon les conditions d'application. Pour les comparaisons de pourcentages, nous avons utilisé le test du χ^2 ou le test de fisher lorsqu'ils étaient appropriés. La recherche de corrélations entre variables quantitatives a été faite avec le coefficient de corrélation de Pearson et un test de la pente. Une analyse de concordance entre les génotypes *HindIII* et Q981H a été réalisée en utilisant le coefficient Kappa pondéré.

Enfin, pour identifier les facteurs associés de façon indépendante à la maladie d'Alzheimer, nous avons réalisé une analyse multivariée basée sur un modèle de régression logistique binaire, avec une méthode de sélection pas-à-pas des variables candidates. Les seuils d'entrée et de sortie étaient de 0,20. L'âge était une variable d'ajustement systématique pour le modèle multivarié. La qualité d'adéquation du modèle a été étudiée avec le test de Hosmer et Lemeshow. Les résultats sont présentés sous forme d'odds ratio (OR) avec leurs intervalles de confiance à 95 % (IC 95 %). Le seuil de signification retenu était de 0,05. En cas de test statistique non significatif un calcul de puissance a posteriori a été réalisé.

L'ensemble des analyses a été réalisé à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System) version 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Chapitre III – Résultats

I. Caractéristiques sociodémographiques et cliniques

Au total, 187 sujets âgés de $78,2 \pm 7,7$ ans (65 à 93 ans) ont été inclus dans cette étude. Il s'agissait principalement de femmes (62%). Le tableau 10 résume les caractéristiques sociodémographiques et cliniques de l'ensemble des sujets (cas et témoins).

Tableau 10 Caractéristiques socio-démographiques et cliniques de l'ensemble des sujets inclus (cas et témoins).

Variable	Cas + Témoins (n = 187)
Age (années)	$78,2 \pm 7,7$
Sexe (F)	116 (62,0%)
Lieu de Vie (domicile)	171 (91,4%)
Niveau de dépendance	
IADL	$6,2 \pm 2,5$
ADL	$5,6 \pm 0,8$
Comorbidités (CI)	$1,1 \pm 1,3$
Cognition	
MMSE	$23,6 \pm 6,2$
TCH (A)	$26,1 \pm 6,8$
TCH (B)	$3,1 \pm 1,5$
Malnutrition	64 (34%)

n = effectifs; IADL, Instrumental Activities of Daily Living: valeurs de 0 (complètement dépendant) à 8 (complètement indépendant) (Lawton & Brody, 1969); ADL, Activities of Daily Living: valeurs de 0 (complètement dépendant) à 6 (complètement indépendant) (Katz et al., 1963); CI, Charlson's index (Charlson et al., 1985); MMSE, Mini Mental State Examination: score de 0 à 30 (Folstein et al., 1975); TCH = Test du Cadran de l'Horloge); Malnutrition, évaluée par le MNA-SF (Mini Nutritional Assessment Short Form) et définie par un score < 12 (Rubenstein et al., 2001).

Dans cette étude, l'âge moyen était de $81,6 \pm 7,2$ ans (65 à 93 ans) pour les cas et $74,3 \pm 6,3$ ans (66 à 88 ans) pour les témoins.

Bien que la différence d'âge entre les cas et les témoins soit statistiquement significative ($p < 10^{-4}$), elle était de 7,3 années soit inférieure à 10 ans. Par ailleurs, il n'existait aucune corrélation entre densité de CR1 (nombre de sites antigéniques de CR1) et âge : Coefficient de corrélation de Pearson : $r = -0,1$, $p = 0,17$ chez tous les sujets (cas + témoins), $r = 0,03$, $p = 0,75$ chez les cas et $r = -0,07$, $p = 0,53$ chez les témoins. Il paraît donc très peu probable que la densité de CR1 soit âge dépendante.

Par ailleurs, il n'y avait pas de différence significative entre le groupe cas et le groupe témoin en fonction des autres caractéristiques sociodémographiques (sexe et lieu de vie) (Tableau 11).

Tableau 11 Caractéristiques socio-démographiques et cliniques des cas et des témoins.

Variable	Sujets		<i>p</i>
	Cas (n = 100)	Témoins (n = 87)	
Age (années)	$81,5 \pm 7,2$	$74,3 \pm 6,3$	$< 10^{-4}$
Sexe (F)	66 (66,0%)	50 (57,4%)	0,23
Lieu de vie (Domicile)	88 (88%)	83 (95,4%)	0,73
Niveau de dépendance			
IADL	$4,81 \pm 2,57$	$7,83 \pm 0,86$	$< 10^{-4}$
ADL	$5,38 \pm 1,0$	$5,95 \pm 0,25$	$< 10^{-4}$
Comorbidités (CI)	$1,31 \pm 1,26$	$0,86 \pm 1,31$	0,019
Cognition			
MMSE	$19,2 \pm 5,3$	$28,8 \pm 1,3$	$< 10^{-4}$
TCH (A)	$21,7 \pm 8,3$	$29,6 \pm 1,2$	$< 10^{-4}$
TCH (B)	$2,0 \pm 1,7$	$3,9 \pm 0,2$	$< 10^{-4}$
Malnutrition	52 (52,0%)	12 (13,7%)	$< 10^{-4}$

n = effectifs; IADL, Instrumental Activities of Daily Living: valeurs de 0 (complètement dépendant) à 8 (complètement indépendant) (Lawton & Brody, 1969); ADL, Activities of Daily Living: valeurs de 0 (complètement dépendant) à 6 (complètement indépendant) (Katz et al., 1963); CI, Charlson's index (Charlson et al., 1985); MMSE, Mini Mental State

Examination: score de 0 à 30 (Folstein et *al.*, 1975); TCH = Test du Cadran de l'Horloge; Malnutrition, évaluée par le MNA-SF (Mini Nutritional Assessment Short Form) et définie par un score < à 12 (Rubenstein et *al.*, 2001).

Concernant les caractéristiques cliniques, l'évaluation fonctionnelle selon les échelles IADL et ADL retrouvait un score moyen à $4,81 \pm 2,57$ et $5,38 \pm 1,0$ avec une médiane à 5,5 et 6 chez les cas, et respectivement $7,83 \pm 0,86$ et $5,95 \pm 0,25$ avec une médiane à 8 et 6 chez les témoins. Cette différence était significative ($p < 0,0001$ aussi bien pour le score aux IADL que pour les ADL).

Le score de comorbidités calculé par l'indice de Charlson montrait un score moyen à $1,31 \pm 1,26$ avec une médiane à 1 soit une comorbidité légère chez les cas et un score moyen à $0,86 \pm 1,31$ avec une médiane à 0 chez les témoins. Bien que la différence entre les cas et les témoins soit statistiquement significative ($p = 0,019$), la différence de score entre les deux groupes était de 0,45 point. D'un point de vue clinique, cette différence n'est pas significative. Sur le plan cognitif, le score moyen au MMSE était plus bas chez les cas ($19,2 \pm 5,3$ avec une médiane à 20) par rapport aux témoins ($28,8 \pm 1,3$ avec une médiane à 29). Il en était de même pour le TCH (score moyen à $21,7 \pm 8,3$ pour le score A et $2,0 \pm 1,7$ pour le score B chez les cas et respectivement $29,6 \pm 1,2$ et $3,9 \pm 0,2$ chez les témoins). Cette différence était significative ($p < 0,0001$ aussi bien pour le MMSE, le TCH au score A et le TCH au score B). Enfin, concernant l'état nutritionnel, 52 patients (52,0%) présentaient un risque de malnutrition dans le groupe cas, contre 12 (13,7%) chez les témoins. La différence était statistiquement significative ($p < 0,0001$).

II. Etude des polymorphismes de longueur de CR1

1. Etude des polymorphismes de longueur de CR1 au niveau de la protéine par Western blot (données phénotypiques)

La figure 24 présente des exemples de résultats obtenus par Western-blot chez cinq sujets CR1*1 CR1*3, CR1*1 CR1*1, CR1*2 CR1*2, CR1*1 CR1*2 et CR1*2 CR1*4.

Au niveau protéique, cinq polymorphismes de longueur de CR1 ont été identifiés en WB comme décrit dans la figure 24.

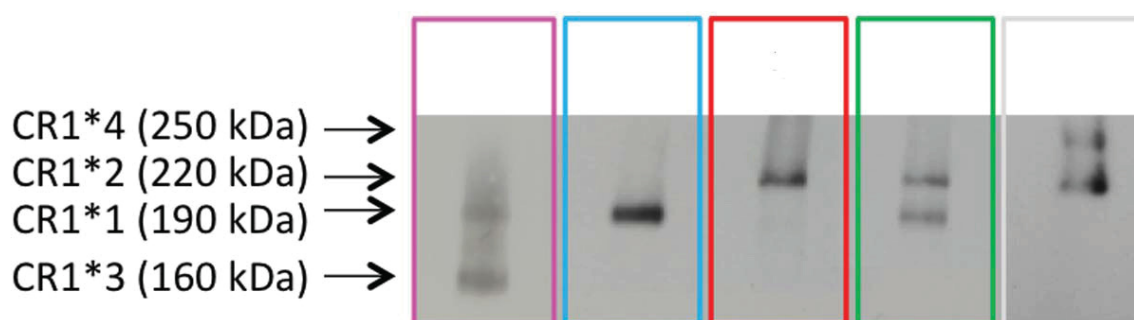


Figure 24 Analyse des polymorphismes de longueur de CR1 par WB en utilisant un anticorps monoclonal anti-CR1 (J3D3).

Cinq allotypes ont été mis en évidence : de gauche à droite : un sujet exprimant les isoformes CR1*3 (160 kDa) et CR1*1 (190 kDa) ; un sujet exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 (190 kDa) ; un sujet exprimant uniquement l'isoforme CR1*2 (220 kDa) ; un sujet exprimant les deux isoformes CR1*1 (190 kDa) et CR1*2 (220 kDa) ; et un sujet exprimant les deux isoformes CR1*2 (220 kDa) et CR1*4 (250 kDa).

Parmi les 187 sujets inclus, 128 exprimaient uniquement l'isoforme CR1*1 (CR1*1 CR1*1), 46 exprimaient les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 (CR1*1 CR1*2), 10 exprimaient uniquement l'isoforme CR1*2 (CR1*2 CR1*2), 2 exprimaient les deux isoformes CR1*1 et CR1*3 (CR1*1 CR1*3) et un seul sujet exprimait les deux isoformes CR1*2 et CR1*4 (CR1*2 CR1*4) (Tableau 12).

Le tableau 13 présente la distribution et la fréquence alléliques de CR1. Il n'existait pas de différence significative dans la répartition des allèles CR1*1 et CR1*2 entre les cas et les témoins même si la fréquence de l'allèle CR1*1 avait tendance à être plus élevée chez les témoins et celle de CR1*2 plus élevée chez les cas ($p = 0,21$).

L'absence de différence significative est probablement liée à l'absence de puissance (puissance = 23%). En effet, pour montrer une différence significative avec une puissance de 80%, il faudrait au minimum 556 sujets par groupe ou 1534 et 341 sujets respectivement en tenant compte de la répartition des deux allèles dans une population caucasienne.

Tableau 12 Distribution des différents polymorphismes de longueur de CR1 par WB chez les cas et/ou témoins.

Phénotypes (polymorphismes de longueur de CR1 par WB)	Sujets		
	Cas + Témoins (n=187)	Cas (n=100)	Témoins (n=87)
CR1*1 CR1*1 (n=128)	128 (68,45%)	64 (64,0%)	64 (73,56%)
CR1*1 CR1*2 (n=46)	46 (24,60%)	27 (27,0%)	19 (21,84%)
CR1*2 CR1*2 (n=10)	10 (5,35%)	6 (6,0%)	4 (4,60%)
CR1*1 CR1*3 (n=2)	2 (1,07%)	2 (2,0%)	0 (0%)
CR1*1 CR1*2 + CR1*2 CR1*2 (n=56)	56 (29,94%)	33 (33,0%)	23 (26,43%)
CR1*2 CR1*4 (n=1)	1 (0,53%)	1 (1,0%)	0 (0%)

n = effectifs; WB = Western Blot.

Tableau 13 Répartition des fréquences alléliques de CR1 chez les cas et les témoins.

Polymorphisme de longueur (fréquence allélique)	Cas (n=200)	Témoins (n=174)	<i>p</i>
CR1*1	159 (79,5%)	147 (84,5%)	0,21
CR1*2	41 (20,5%)	27 (15,5%)	

2. Etude des polymorphismes de longueur de CR1 au niveau du gène par HRM (données moléculaires)

Au niveau du gène *CR1*, cinq profils de polymorphismes de longueur de CR1 ont été identifiés en HRM comme décrit dans la figure 25.

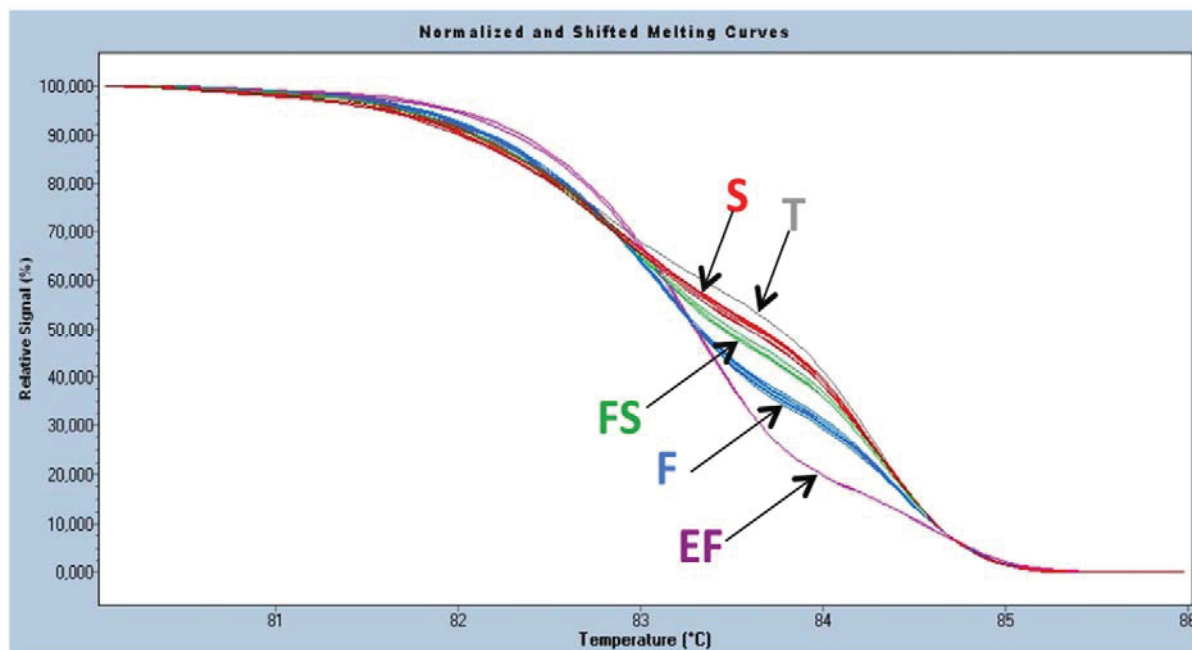


Figure 25 Détermination des polymorphismes de longueur de CR1 (génotype) par HRM.

Cinq profils ont été identifiés : profil T (gris), profil S (rouge), profil FS (vert), profil F (bleu) et profil EF (pourpre), correspondant aux allotypes déterminés par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium) : T (CR1*2 [220 kDa] et CR1*4 [250 kDa]), S (CR1*2 [220 kDa]), FS (CR1*1 [190 kDa] et CR1*2 [220 kDa]), F (CR1*1 [190 kDa]) et EF (CR1*3 [160 kDa] et CR1*1 [190 kDa]) respectivement.

Parmi les 187 sujets inclus, 126 présentaient le profil F, 48 présentaient le profil FS, 10 présentaient le profil S, 2 présentaient le profil EF et un seul sujet présentait le profil T. Le Tableau 14 présente la répartition des profils (polymorphismes de longueur) étudiés à partir du gène *CR1* chez les cas et chez les témoins.

Tableau 14 Distribution des différents polymorphismes de longueur de CR1 par HRM chez les cas et/ou témoins.

Sujets	Génotype (HRM)				
	F	FS	S	EF	T
Cas + Témoin (n=187)	126	48	10	2	1
Cas (n=100)	63	28	6	2	1
Témoin (n=87)	63	20	4	0	0

HRM = High Resolution Melting

3. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés au niveau du gène par HRM et au niveau de la protéine par WB

La Figure 26 présente les résultats obtenus chez cinq sujets au niveau du gène et de la protéine.

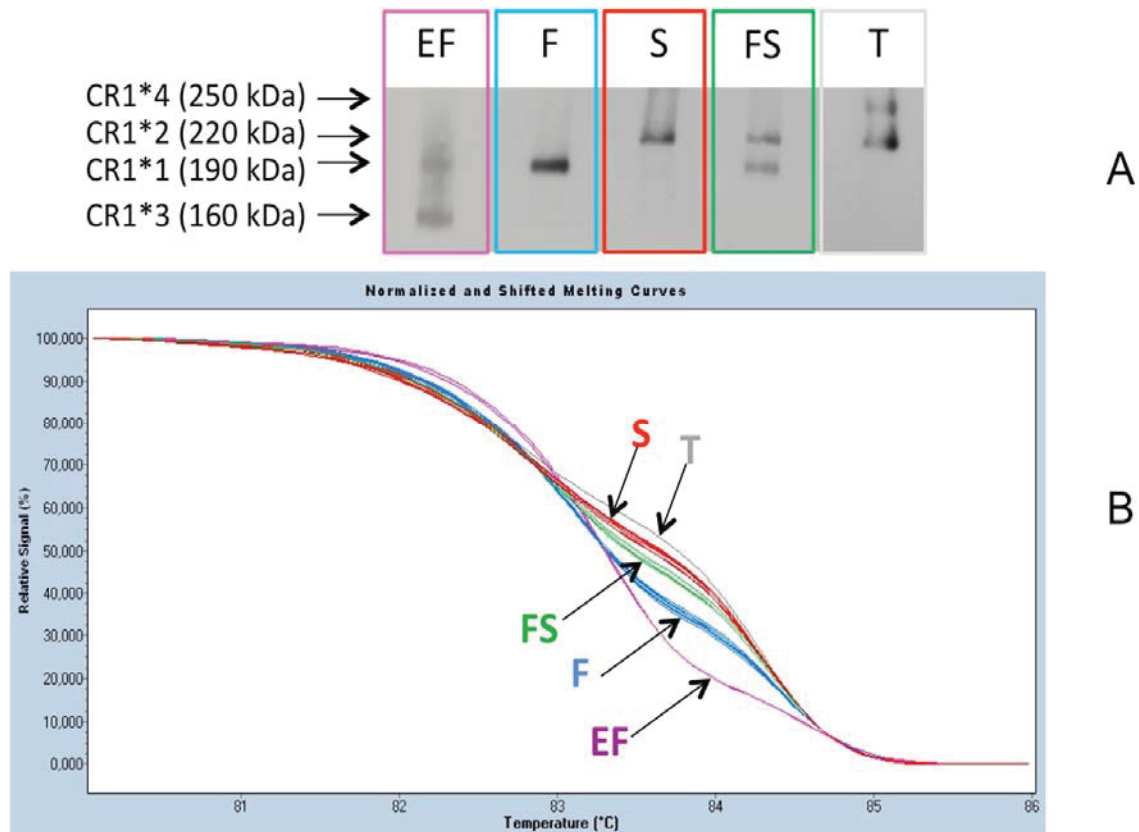


Figure 26 Analyse par WB et par HRM des polymorphismes de longueur de CR1 chez cinq sujets.

(A) Analyse des polymorphismes de longueur de CR1 par WB en utilisant un anticorps monoclonal anti-CR1 (J3D3). Cinq allotypes ont été mis en évidence : profil EF correspondant à l'expression de l'isoforme CR1*3 (160 kDa) et de l'isoforme CR1*1 (190 kDa) ; profil F correspondant à l'expression de l'isoforme CR1*1 (190 kDa) ; profil FS correspondant à l'expression de l'isoforme CR1*1 (190 kDa) et de l'isoforme CR1*2 (220 kDa) ; profil S correspondant à l'expression de l'isoforme CR1*2 (220 kDa) ; et profil T correspondant à l'expression de l'isoforme CR1*2 (220 kDa) et de l'isoforme CR1*4 (250 kDa). (B) Détermination des polymorphismes de longueur génotypique de CR1 par HRM. Cinq profils ont été identifiés : profil T (gris), profil S (rouge), profil FS (vert), profil F (bleu) et profil EF (pourpre), correspondant aux allotypes déterminés par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium) : T (CR1*2 [220 kDa] et CR1*4 [250 kDa]), S (CR1*2 [220 kDa]), FS (CR1*1 [190 kDa] et CR1*2 [220 kDa]), F (CR1*1 [190 kDa]) et EF (CR1*3 [160 kDa] et CR1*1 [190 kDa]) respectivement.

Il existait une association significative entre polymorphismes de longueur étudiés par WB (protéine) et polymorphismes de longueur étudiés par HRM (gène) chez 185 sujets sur 187 ($p < 0,0001$). Cette association était statistiquement significative aussi bien chez les cas (99 sujets sur 100) que chez les témoins (86 sujets sur 87) ($p < 0,0001$) (Tableau 15).

Tableau 15 Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par HRM (génotypes) et polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB (phénotypes) chez les cas et/ou les témoins.

Polymorphismes de longueur de CR1 Phénotypes	Génotypes HRM													
	Cas + Témoins (n=187)							Cas (n=100)						
	Témoins (n=87)													
	F	FS	S	EF	T	p		F	FS	S	EF	T	p	
CR1*1 CR1*1 (n128)	126	2	0	0	0	< 10 ⁻⁴	63	1	0	0	0	0	< 10 ⁻⁴	63
CR1*1 CR1*2 (n=46)	0	46	0	0	0		0	27	0	0	0	0		0
CR1*2 CR1*2 (n=10)	0	0	10	0	0		0	0	6	0	0	4		0
CR1*1 CR1*3 (n=2)	0	0	0	2	0		0	0	0	2	0	0		0
CR1*1CR1*2+CR1*2CR1*2 (n=56)	0	46	10	0	0		0	27	6	0	0	4		0
CR1*2 CR1*4 (n=1)	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	0		0

HRM = High Resolution Melting ; WB = Western Blot
P < 10⁻⁴ (association entre génotype par HRM et phénotype par WB)

Les deux résultats discordants obtenus lors de la comparaison des polymorphismes de longueur observés par WB (données phénotypiques) et des polymorphismes de longueur observés par HRM (gène ou données moléculaires) correspondaient à des sujets exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 à la surface de l'érythrocyte au WB, mais présentant un profil FS à l'HRM. L'absence d'expression de l'isoforme CR1*2 était reproductible quand le WB était réalisé après un temps d'exposition plus long. Ceci suggère la présence d'allèle *CR1* silencieux (Figure 27).

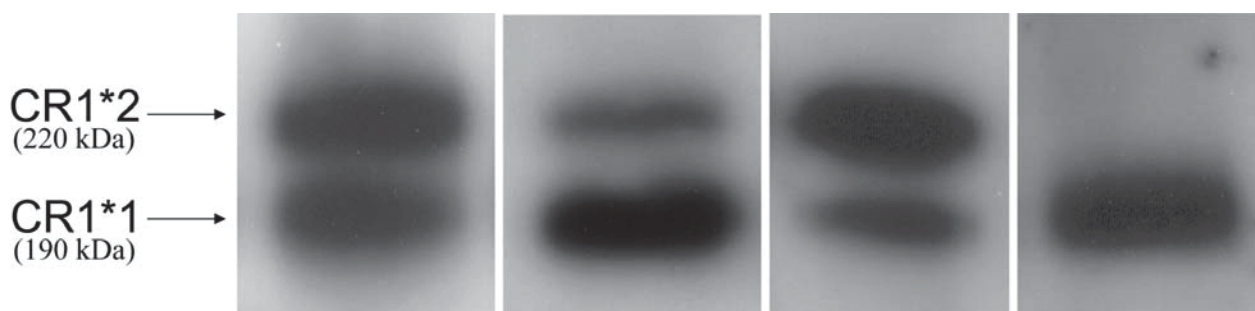


Figure 27 Variation d'expression de CR1*1 et CR1*2 chez quatre sujets.

Parmi les sujets génotypés FS à l'HRM, quatre profils d'expression de CR1 à la surface des érythrocytes ont été observés par WB. De gauche à droite : des sujets exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 au même niveau, des sujets exprimant l'isoforme CR1*1 à un niveau plus élevé que l'isoforme CR1*2, des sujets exprimant l'isoforme CR1*2 à un niveau plus élevé que l'isoforme CR1*1 et des sujets exprimant uniquement l'isoforme CR1*1.

4. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 et SNPs

a. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 et rs6656401

L'étude du SNP rs6656401 a montré une association significative avec les polymorphismes de longueur de CR1 au niveau de la protéine et au niveau du gène aussi bien chez les cas que chez les témoins ($p < 0,0001$). En effet, parmi les 127 sujets qui présentaient le génotype GG pour rs6656401, 96% exprimaient uniquement l'isoforme CR1*1 (CR1*1 CR1*1) et aucun sujet n'exprimait l'isoforme CR1*2 (CR1*2 CR1*2). Inversement, les 8 sujets qui présentaient le génotype AA pour rs6656401 exprimaient tous l'isoforme CR1*2. Par ailleurs, parmi les 52 sujets qui présentaient le génotype AG pour rs6656401, 82,7% exprimaient les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 (Tableau 16).

Chez les cas, parmi les 65 sujets qui présentaient le génotype GG pour rs6656401, 93,84% exprimaient uniquement l'isoforme CR1*1 (CR1*1 CR1*1) et aucun sujet n'exprimait l'isoforme CR1*2 (CR1*2 CR1*2). Inversement, les 6 sujets qui présentaient le génotype AA pour rs6656401, exprimaient tous l'isoforme CR1*2 (CR1*2 CR1*2). Par ailleurs, parmi les 29 sujets qui présentaient le génotype AG pour rs6656401, 86,2% exprimaient les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 (Tableau 17).

Chez les témoins, parmi les 62 sujets qui présentaient le génotype GG pour rs6656401, 98,38% exprimaient uniquement l'isoforme CR1*1 (CR1*1 CR1*1) et un seul sujet exprimait l'isoforme CR1*2 (CR1*1 CR1*2). Inversement, les 2 sujets qui présentaient le génotype AA pour rs6656401 exprimaient tous l'isoforme CR1*2. Par ailleurs, parmi les 23 sujets qui présentaient le génotype AG pour rs6656401, 78,26% exprimaient les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 (Tableau 18).

b. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 et rs3818361

L'étude du SNP rs3818361 a également montré une association significative avec les polymorphismes de longueur de CR1 au niveau protéique et au niveau du gène, aussi bien chez les cas que chez les témoins ($p < 0,0001$). En effet, parmi les 122 sujets qui présentaient le génotype CC pour rs3818361, 97,54% exprimaient uniquement l'isoforme CR1*1 (CR1*1 CR1*1) et aucun sujet n'exprimait l'isoforme CR1*2 (CR1*2 CR1*2). Inversement, les 8 sujets qui présentaient le génotype TT pour rs3818361 exprimaient tous l'isoforme CR1*2. Par ailleurs, parmi les 57 sujets qui présentaient le génotype CT pour rs3818361, 78,9% exprimaient les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 (Tableau 16).

Chez les cas, parmi les 62 sujets qui présentaient le génotype CC pour rs3818361, 93,54% exprimaient uniquement l'isoforme CR1*1 (CR1*1 CR1*1) et un seul sujet exprimait l'isoforme CR1*2 (CR1*1 CR1*2). Inversement, les 6 sujets qui présentaient le génotype TT pour rs3818361 exprimaient tous l'isoforme CR1*2. Par ailleurs, parmi les 33 sujets qui présentaient le génotype CT pour rs3818361, 78,78% exprimaient les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 (Tableau 17).

Chez les témoins, parmi les 61 sujets qui présentaient le génotype CC pour rs3818361, 100% exprimaient uniquement l'isoforme CR1*1 (CR1*1 CR1*1) et

aucun sujet n'exprimait l'isoforme CR1*2 (CR1*1 CR1*2). Inversement, les 2 sujets qui présentaient le génotype TT pour rs3818361 exprimaient tous l'isoforme CR1*2. Par ailleurs, parmi les 24 sujets qui présentaient le génotype CT pour rs3818361, 79,16% exprimaient les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 (Tableau 18).

c. Association entre polymorphismes de longueur et rs113531714, rs112003429, SCR24-25

Aucune association significative entre les trois SNPs suivants : rs113531714, rs112003429, SCR24-25 et polymorphismes de longueur de CR1 n'a été retrouvée ni au niveau protéique ni au niveau du gène, aussi bien chez les cas que chez les témoins (Tableaux 16, 17 et 18).

Tableau 16 Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par HRM (génotypes), polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB (phénotypes) et SNPs chez tous les sujets (cas et témoins).

Cas + Témoins (n = 187)		SNPs											
		rs6656401				rs381861				rs113531714			
		GG	AG	AA	CC	CT	TT	TT	CT	CC	CC	CT	TT
Génotype HRM	F	121	5	0	119	7	0	126	0	0	126	0	0
	FS	4	44	0	1	47	0	48	0	0	48	0	0
	S	0	3	7	0	3	7	10	0	0	10	0	0
	EF	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0
	T	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Phénotype WB	CR1*1	122	6	0	119	9	0	128	0	0	128	0	0
	CR1*1 CR1*2	3	43	0	1	45	0	46	0	0	46	0	0
	CR1*2 CR1*2	0	3	7	0	3	7	10	0	0	10	0	0
	CR1*1 CR1*3	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0
	CR1*2 CR1*4	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0

n = effectifs ; HRM, high resolution melting ; SNPs, single nucleotide polymorphisms ; WB, western blot.

$p < 10^{-4}$ pour rs6656401 et rs3818361.

Tableau 17 Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par HRM (génotypes), polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB (phénotypes) et SNPs chez les cas.

Cas (n = 100)		SNPs														
		rs6656401			rs381861			rs113531714			rs112003429			SCR24-25 4646*		
		GG	AG	AA	CC	CT	TT	TT	CT	CC	CC	CT	TT	A	A/G	G
Génotype HRM	F	61	2	0	59	4	0	63	0	0	63	0	0	52	10	1
	FS	2	26	0	1	27	0	28	0	0	28	0	0	25	3	0
	S	0	1	5	0	1	5	6	0	0	6	0	0	5	1	0
	EF	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0	1	1
	T	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Phénotype WB	CR1*1	61	3	0	58	6	0	64	0	0	64	0	0	52	10	1
	CR1*1 CR1*2	2	25	0	1	26	0	27	0	0	27	0	0	24	3	0
	CR1*2 CR1*2	0	1	5	0	1	5	6	0	0	6	0	0	5	1	0
	CR1*1 CR1*3	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0	1	1
	CR1*2 CR1*4	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0

n = effectifs ; HRM, high resolution melting ; SNPs, single nucleotide polymorphisms ; WB, western blot.
p < 10⁻⁴ pour rs6656401 et rs3818361.

Tableau 18 Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par HRM (génotypes), polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB (phénotypes) et SNPs chez les témoins.

Témoins (n = 87)		SNPs																			
		rs6656401				rs381861				rs113531714				rs112003429				SCR24-25 4646			
		GG	AG	AA		CC	CT	TT		TT	CT	CC		CC	CT	TT		A	A/G	G	
Génotype HRM	F	60	3	0		61	2	0		63	0	0		63	0	0		50	13	0	
	FS	2	18	0		0	20	0		20	0	0		20	0	0		17	3	0	
	S	0	2	2		0	2	2		4	0	0		4	0	0		4	0	0	
	EF	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0	
	T	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0	
Phénotype WB	CR1*1	61	3	0		61	3	0		64	0	0		64	0	0		50	14	0	
	CR1*1 CR1*2	1	18	0		0	19	0		19	0	0		19	0	0		17	2	0	
	CR1*2 CR1*2	0	2	2		0	2	2		4	0	0		4	0	0		4	0	0	
	CR1*1 CR1*3	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0	
	CR1*2 CR1*4	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0	

n = effectifs ; HRM, high resolution melting ; SNPs, single nucleotide polymorphisms ; WB, western blot.

$p < 10^{-4}$ pour rs6656401 et rs3818361.

III. Etude du polymorphisme de densité de CR1

1. Nombre de sites antigéniques (phénotype) par cytométrie en flux

Le nombre moyen de sites antigéniques de CR1 chez les sujets inclus dans cette étude était de 677 ± 288 [88-1512] avec une médiane à 642.

Chez les cas, la densité moyenne de CR1 était plus basse (626 ± 272 [88-1512] avec une médiane à 600) par rapport aux témoins (737 ± 297 [95-1460] avec une médiane à 726). Cette différence était statistiquement significative ($p = 0,009$) (Tableau 19).

Après ajustement sur l'âge, la densité moyenne de CR1 était statistiquement plus basse chez les cas par rapport aux témoins ($\beta = -106,6 \pm 47,4$; $p = 0,03$).

Tableau 19 Etude de la densité (nombre de sites antigéniques de CR1) chez les cas et les témoins.

Sujets	Cas (n=100)	Témoins (n=87)	<i>p</i>
CR1/E	626 ± 272	737 ± 297	0.009

n= effectifs ; CR1/E = nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes étudiés par cytométrie en flux.

La figure 28 présente la répartition du nombre de sites antigéniques de CR1 dans chaque groupe.

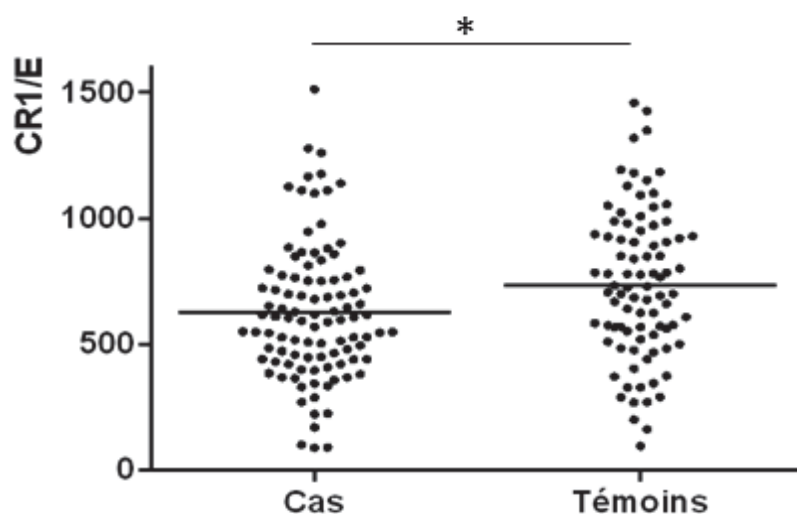


Figure 28 Répartition du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (CR1/E) dans chaque groupe.

2. Etude de la densité de CR1 selon les polymorphismes de longueur observés en WB

La densité de CR1/E a également été étudiée selon les polymorphismes de longueur observés par WB. En effet, chez les sujets exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 (sujets CR1*1 CR1*1), la densité moyenne (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes) n'était pas statistiquement différente entre les cas (682 ± 299) et les témoins (740 ± 323) ($p = 0,3$). En l'occurrence, chez les sujets exprimant uniquement l'isoforme CR1*2 (sujets CR1*2 CR1*2), la densité moyenne de CR1 était statistiquement plus basse chez les cas (518 ± 113) par rapport aux témoins (771 ± 203) ($p = 0,03$).

Ces résultats se confirment, chez les sujets exprimant les deux isoformes (sujets CR1*1 CR1*2), puisque la densité moyenne de CR1 était également statistiquement plus basse chez les cas (525 ± 196) par rapport aux témoins (719 ± 222) ($p = 0,003$).

Par ailleurs, quand on regroupe les sujets exprimant CR1*2 CR1*2 ou CR1*1 CR1*2, la densité moyenne de CR1 est statistiquement plus basse chez les cas (523 ± 182) par rapport aux témoins (728 ± 215) ($p = 0,0003$) (Tableau 20).

Tableau 20 Nombre de sites antigéniques de CR1 chez les cas et/ou les témoins selon les polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par Western Blot.

Polymorphismes de longueur de CR1 (Phénotypes)	CR1/E			<i>p</i>
	Cas + Témoins (n=187)	Cas (n=100)	Témoins (n=87)	
CR1*1 CR1*1 (n=128)	711 ± 311	682 ± 299	740 ± 323	0,3
CR1*1 CR1*2 (n=46)	605 ± 226	525 ± 196	719 ± 222	0,003
CR1*2 CR1*2 (n=10)	619 ± 195	518 ± 113	771 ± 203	0,03
CR1*1 CR1*3 (n=2)	615 ± 151	615 ± 151	—	—
CR1*1 CR1*2 + CR1*2 CR1*2 (n=56)	608 ± 220	523 ± 182	728 ± 215	0,0003
CR1*2 CR1*4 (n=1)	420	420	—	—

n= effectifs ; CR1/E = nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes.

D'autre part, la comparaison de la densité moyenne de CR1 entre les cas et les témoins, selon les polymorphismes de longueur observés en WB, montrait une densité plus basse chez les cas exprimant l'isoforme CR1*2 (Figures 29 et 30).

En l'occurrence, il n'existait pas de différence significative entre la densité moyenne de CR1 chez les cas exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 (682 ± 299) et les témoins exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 (740 ± 323) ; *p* = 0,3.

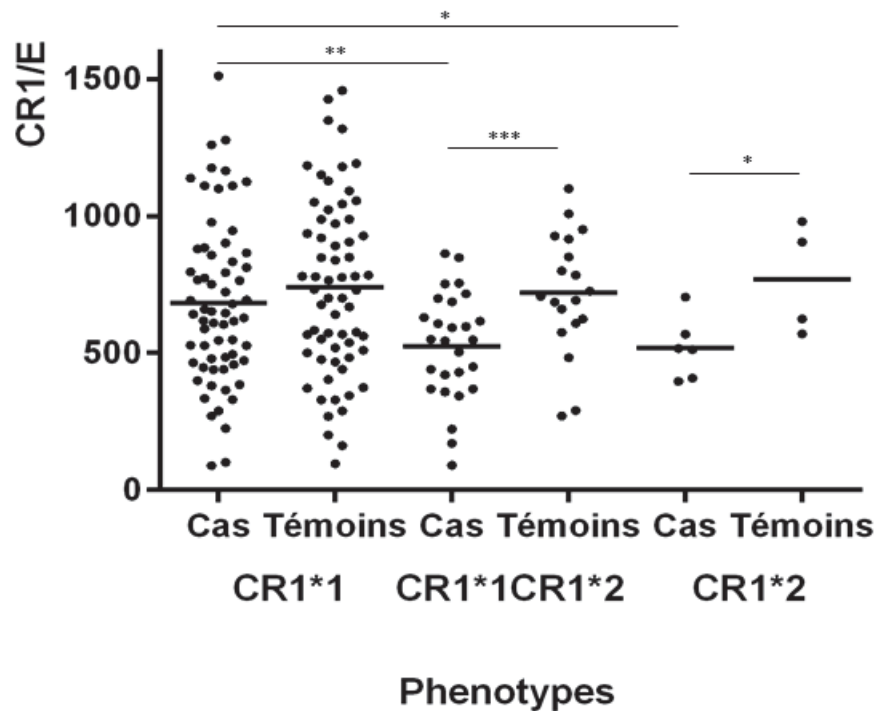


Figure 29 Comparaison entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB et nombre de sites antigéniques par érythrocytes (CR1/E) chez les cas et les témoins.

Comparaison entre cas exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 ou uniquement l'isoforme CR1*2 ($*p = 0,01$). Comparaison entre cas exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 et cas exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 ($**p = 0,004$). Comparaison entre cas et témoins exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 ($***p = 0,003$). Comparaison entre cas et témoins exprimant uniquement l'isoforme CR1*2 ($*p = 0,03$).

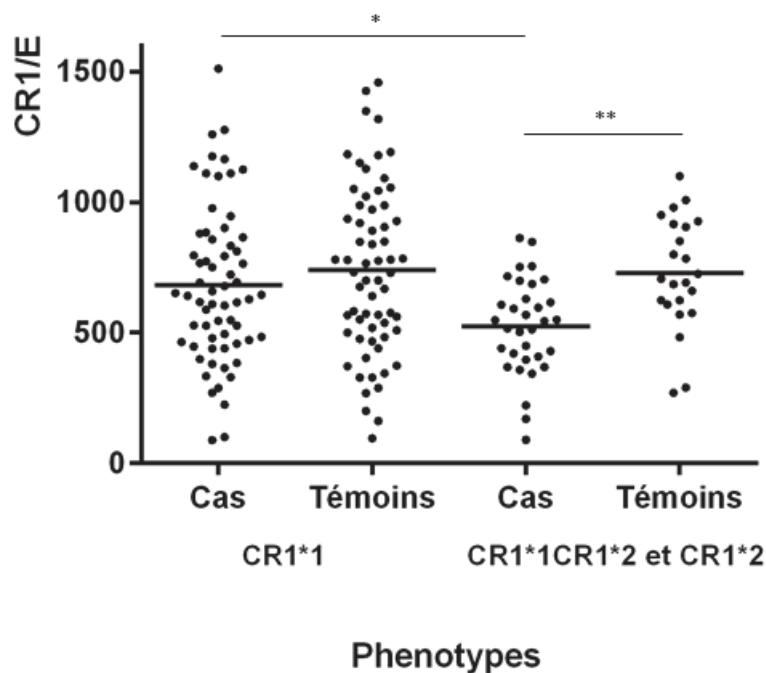


Figure 30 Comparaison entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB et nombre de sites antigéniques par érythrocytes (CR1/E) chez les cas et les témoins.

Comparaison entre cas exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 et cas exprimant l'isoforme CR1*2 (cas CR1*1 CR1*2 et cas CR1*2 CR1*2) (* $p = 0,001$). Comparaison entre cas et témoins exprimant uniquement l'isoforme CR1*2 (** $p = 0,0003$).

a. Etude de la densité de CR1 chez les sujets exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2

Afin de vérifier l'hypothèse où l'isoforme CR1*2 est exprimé à une densité plus basse que l'isoforme CR1*1, la densité de CR1 pour chaque isoforme a été mesurée chez les sujets exprimant les deux isoformes (sujets CR1*1 CR1*2).

Le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes était statistiquement plus bas pour l'isoforme CR1*2 comparé à celui de l'isoforme CR1*1. Ce résultat était confirmé aussi bien chez les cas que chez les témoins.

En effet, chez les cas, l'expression globale de CR1 pour l'isoforme CR1*1 était de $63,93\% \pm 19,35\%$ pour l'isoforme CR1*1 et $36,07\% \pm 19,35\%$ pour l'isoforme CR1*2. Le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes pour l'isoforme CR1*2 (183 ± 103) était

statistiquement plus bas que le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes pour l'isoforme CR1*1 (342 ± 177) ($p < 10^{-4}$).

Chez les témoins, l'expression globale de CR1 pour l'isoforme CR1*1 était de $61,24\% \pm 9,74\%$ pour l'isoforme CR1*1 et de $38,77\% \pm 9,74\%$ pour l'isoforme CR1*2. Le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes pour l'isoforme CR1*2 (269 ± 124) était statistiquement plus bas que le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes pour l'isoforme CR1*1 (426 ± 145) ($p = 0,0002$) (Tableau 21).

Tableau 21 Proportion des isoformes CR1*1 et CR1*2 selon la moyenne des mesures des intensités des bandes observées en Western Blot chez des sujets exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 : cas et/ou témoins.

Polymorphismes de longueur (phénotypes)					
Sujets	CR1*1		CR1*2		<i>p</i>
	Intensités des bandes* (%)	Nombre de CR1/E	Intensités des bandes* (%)	Nombre de CR1/E	
Cas + témoins (n = 46)	$62,89 \pm 16,23\%$	374 ± 168	$37,11 \pm 16,23\%$	216 ± 118	$< 10^{-4}$
Cas (n = 27)	$63,93 \pm 19,35\%$	342 ± 177	$36,07 \pm 19,35\%$	183 ± 103	$< 10^{-4}$
Témoins (n = 19)	$61,24 \pm 9,74\%$	426 ± 145	$38,77 \pm 9,74\%$	269 ± 124	0,0002

n = effectifs ; CR1/E = nombre de sites antigéniques du récepteur du complément de type 1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes.

* Les intensités de chaque bande observées en WB, correspondant à l'isoforme CR1*1 ou à l'isoforme CR1*2, ont été comparées sur la base du volume ajusté (densité optique moyenne X la zone en millimètres carrés), et transformées en nombre de sites antigéniques à partir de l'expression globale de CR1 à la surface des érythrocytes d'un sujet, expression mesurée par cytométrie en flux.

Enfin pour confirmer l'hypothèse que l'isoforme CR1*2 est exprimé à une densité plus basse que l'isoforme CR1*1, la densité de CR1 déduite de l'intensité des bandes a été comparée pour chaque isoforme entre les cas et les témoins. En effet, le

nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes était statistiquement plus bas chez les cas pour l'isoforme CR1*2 (183 ± 103) comparée à l'isoforme CR1*1 chez les témoins (269 ± 124) ($p = 0,02$) (Tableau 22, Figure 31).

Tableau 22 Comparaison des intensités de bandes observées par Wester Blot et du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes entre les cas et les témoins exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2.

		Sujets		
Polymorphismes		Cas	Témoins	<i>p</i>
de longueur de CR1		(n = 27)	(n = 19)	
CR1*1	Intensités des bandes* (%)	63,93 $\pm$ 19,35%	61,24 $\pm$ 9,74%	0,6
	Nombre de CR1/E	342 $\pm$ 177	426 $\pm$ 145	0,1
CR1*2	Intensités des bandes* (%)	36,07 $\pm$ 19,35%	38,77 $\pm$ 9,74%	0,6
	Nombre de CR1/E	183 $\pm$ 103	269 $\pm$ 124	0,02

n = effectifs ; CR1/E = nombre de sites antigéniques du récepteur du complément de type 1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes.

* Les intensités de chaque bande observées par WB correspondant à l'isoforme CR1*1 ou à l'isoforme CR1*2 ont été comparées sur la base du volume ajusté (densité optique moyenne X la zone en millimètres carrés), et transformées en nombre de sites antigéniques à partir de l'expression globale de CR1 à la surface des érythrocytes d'un sujet, expression mesurée par cytométrie en flux.

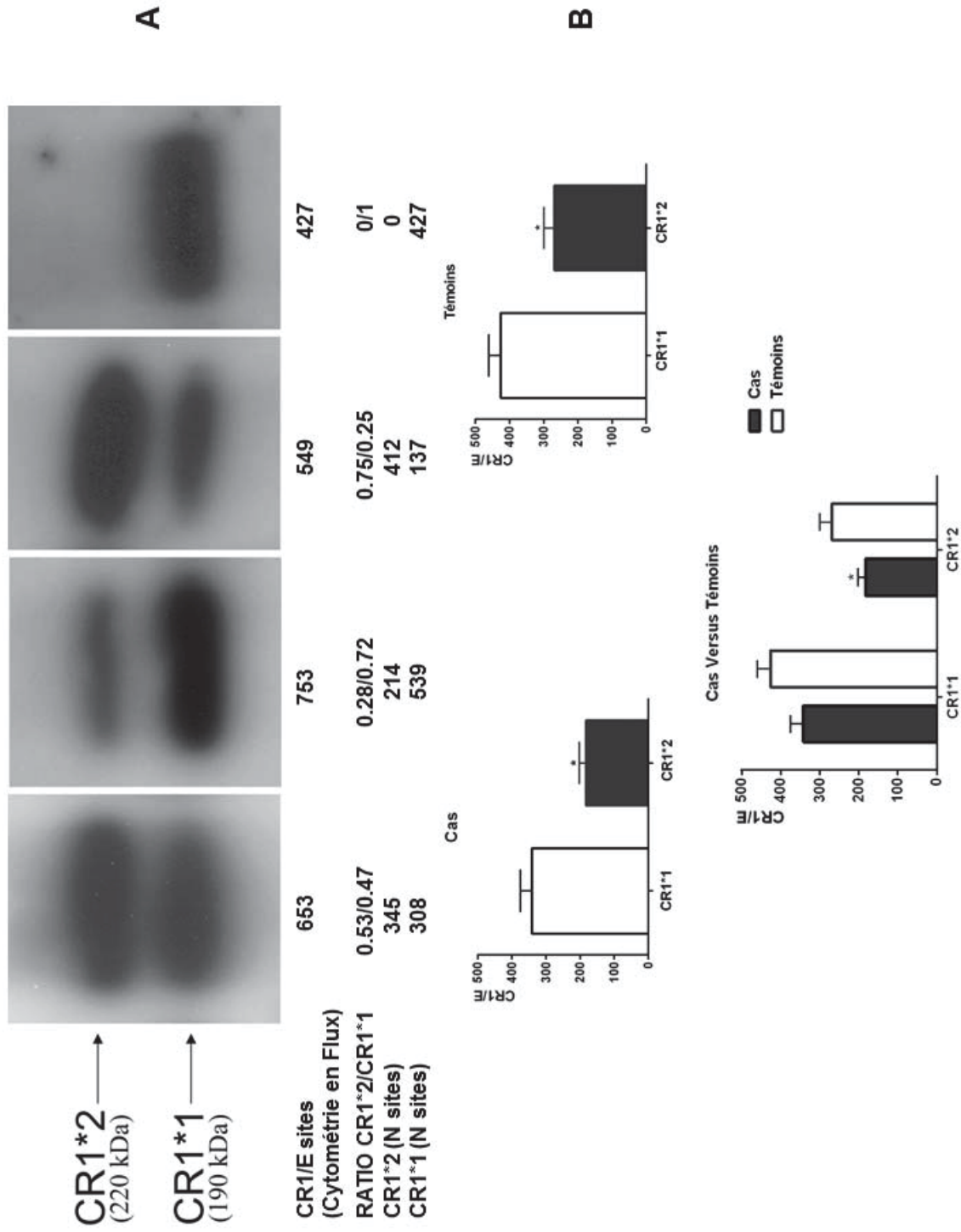


Figure 31 Variation d'expression de CR1* 1 et CR1* 2 chez quatre sujets en Western Blot et en cytométrie en flux.

(A) Gel illustratif des variations d'expression en Western Blot des deux isoformes CR1*1 et CR1*2. Le nombre de sites antigéniques par érythrocytes a été mesuré pour chaque sujet en cytométrie en flux en utilisant une courbe standard afin d'obtenir une valeur quantitative précise pour un sujet. Les intensités de chaque bande observées en WB correspondant à l'isoforme CR1*1 ou à l'isoforme CR1*2 ont été comparées sur la base du volume ajusté (densité optique moyenne X la zone en millimètres carrés), et transformées en nombre de sites antigéniques à partir de l'expression globale de CR1 à la surface des érythrocytes d'un sujet, expression mesurée par cytométrie en flux. **(B)** Quantification des taux d'expression de CR1*1 et CR1*2 chez des sujets exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2. Le niveau d'expression de l'isoforme CR1*2 est significativement plus bas que celui de l'isoforme CR1*1 pour toutes les comparaisons présentées. $P < 0,0001$ pour la comparaison du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes entre l'isoforme CR1*1 et l'isoforme CR1*2 chez les cas. $P = 0,0002$ pour la comparaison du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes entre l'isoforme CR1*1 et l'isoforme CR1*2 chez les témoins. $P = 0,02$ pour la comparaison entre les cas et les témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes déduit à partir de l'intensité des bandes pour l'isoforme CR1*2.

b. Etude de la densité de CR1 chez les sujets CR1*1 CR1*2 en utilisant d'autres anticorps

Afin d'exclure une réactivité différente ou sélective de l'anticorps monoclonale anti-CR1 utilisé dans notre étude (J3D3biot) sur les différents isoformes de longueur de CR1, nous avons réalisé une étude comparative du nombre de sites antigéniques de CR1 par cytométrie en flux en utilisant quatre anticorps monoclonaux anti-CR1 différents, à savoir J3D3, J3B11, TO5 et E11.

En effet, la quantification par cytométrie en flux du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes chez les sujets exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 en utilisant quatre anticorps monoclonaux anti-CR1 différents (J3D3, J3B11, TO5 et E11) a retrouvé des résultats très concordants, indiquant que

tous les anticorps monoclonaux anti-CR1 se comportaient comme reconnaissant fonctionnellement un épitope unique par molécule de CR1. Par conséquent, la faible densité de CR1 chez les sujets exprimant l'isoforme CR1*2 ne peut être liée à une moins bonne reconnaissance du CR1 par l'anticorps monoclonal anti-CR1 utilisé dans notre étude (J3D3biot) (Tableau 23).

Tableau 23 Nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes d'un sujet référence exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 en utilisant différents anticorps monoclonaux anti-CR1.

Anti-CR1 moAbs	CR1/E	Pourcentage de la valeur de référence (966 CR1 sites antigéniques /E)
J3D3biot	962	99,6%
J3D3	945	97,8%
J3B11	979	101,3%
TO5	936	96,9%
E11	954	98,8%

CR1/E = nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes ; moAbs = monoclonal antibodies.

Par ailleurs, un Western Blot a également été réalisé pour comparer la réactivité des différents profils en utilisant les anticorps anti-CR1 J3D3, TO5 et E11 (Figure 32).

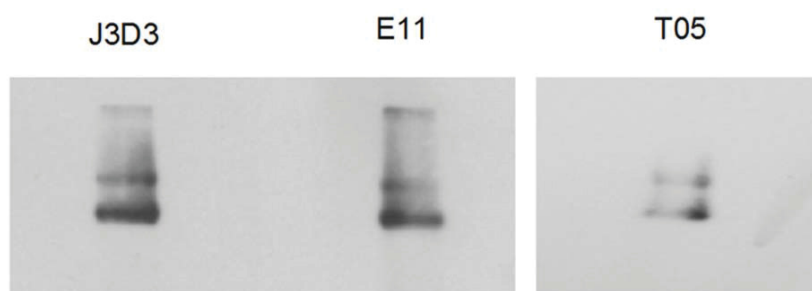


Figure 32 Détection comparative du phénotype CR1*1 CR1*2 par Western Blot en utilisant les anticorps monoclonaux anti-CR1 J3D3, E11 et TO5.

Cette figure montre que les intensités relatives des bandes CR1*1 (inférieure) et CR1*2 (supérieure) sont les mêmes pour chacun des anticorps monoclonaux anti-CR1 utilisés.

3. Etude des polymorphismes de densité de CR1 au niveau du gène (densité génotypique)

a. Etude de la densité génotypique pour *HindIII* et Q981H

Les polymorphismes de CR1 au niveau du gène ont été étudiés par PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) pour le site *HindIII* et par pyroséquençage pour le site Q981H.

La figure 33 présente des exemples de résultats de polymorphisme de densité génotypique de CR1 pour le site *HindIII* obtenus par PCR-RFLP chez des sujets HH, HL et LL.



Figure 33 Analyse par PCR-RFLP du polymorphisme de densité CR1/E au niveau du gène pour le site *HindIII*.

PM = Poids Moléculaire, ND = non digéré.

La figure 34 présente des exemples de résultats de polymorphisme de densité génotypique de CR1 pour le site Q981H obtenus par pyroséquençage chez des sujets QQ, QH et HH.

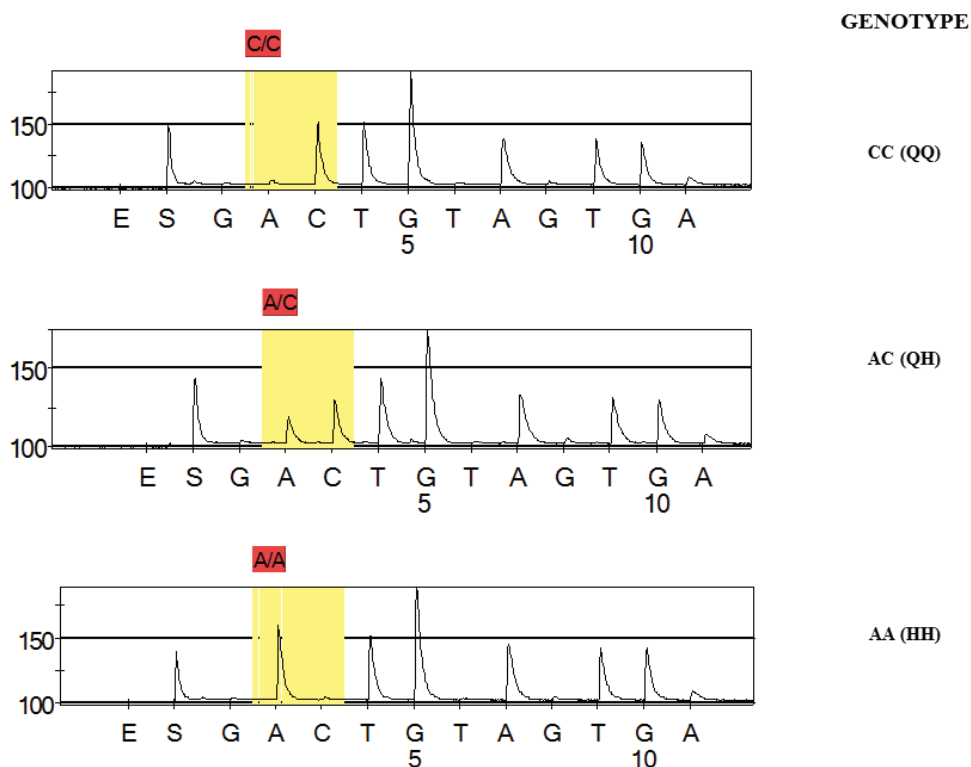


Figure 34 Exemples de résultats des analyses par pyroséquençage pour le site Q981H (C > A), chez un sujet CC (QQ), AC (QH), AA (HH).

Le tableau 24 présente respectivement la répartition des polymorphismes de densité de CR1 pour les sites *Hind*III et Q981H chez les cas et/ou les témoins.

Il n'existait pas de différence significative entre les cas et les témoins, même si la fréquence de l'allèle L pour le site *Hind*III et de l'allèle Q pour le site Q981H avait tendance à être plus élevée chez les cas par rapport aux témoins (Tableau 25).

L'absence de différence significative est probablement liée à l'absence de puissance (respectivement 6% pour le site *Hind*III et 3% pour le site Q981H). En effet, pour montrer une différence significative avec une puissance de 80%, il faudrait au minimum 16501 sujets pour le site *Hind*III et 81459 sujets pour le site Q981H.

Tableau 24 Répartition des polymorphismes de densité de CR1 pour les sites *HindIII* et Q981H chez les cas et/ou les témoins.

		Sujets		
Polymorphismes de densité		Cas + Témoins (n = 187)	Cas (n = 100)	Témoins (n = 87)
<i>HindIII</i>	HH (n = 114)	114 (60,96%)	59 (59%)	55 (63,22%)
	HL (n = 65)	65 (34,76%)	37 (37%)	28 (32,18%)
	LL (n = 8)	8 (4,28%)	4 (4%)	4 (4,6%)
Q981H	QQ (Gln/Gln) (n = 118)	118 (63,10%)	62 (62%)	56 (64,37%)
	QH (His/Gln) (n = 60)	60 (32,09%)	35 (35%)	25 (28,74%)
	HH (His/His) (n = 9)	9 (4,81%)	3 (3%)	6 (6,9%)

HH= densité haute pour le site *HindIII*, HL= densité intermédiaire, LL= densité basse, QQ = densité haute pour le site Q981H, QH= densité intermédiaire, HH= densité basse.

Tableau 25 Répartition des fréquences alléliques (H et L pour le site *HindIII*, Q et H pour le site Q981H) chez les cas et les témoins.

	Cas (n = 200)	Témoins (n = 174)	<i>p</i>
Site <i>Hind</i> III par PCR-RFLP			
H	155 (77,50%)	138 (79,31%)	0,74
L	45 (22,50%)	36 (20,68)%	
Site Q981 H par pyroséquençage			
Q	159 (79,50%)	137 (78,73%)	0,86
H	41 (20,50%)	37 (21,26%)	

b. Etude de la concordance entre polymorphismes de densité *HindIII* et Q981H (génotype)

Une analyse de la concordance entre les deux génotypes (génotype *HindIII* étudié par PCR-RFLP et génotype Q981H étudié par pyroséquençage) a été réalisée

et a montré des résultats excellents, aussi bien pour tous les sujets (cas + témoins) ; coefficient Kappa pondéré à 0.91 ; IC 95% = [0.85-0.97] (Tableau 26), que chez les cas ; coefficient Kappa pondéré à 0.93 ; IC 95% = [0.86-1] (Tableau 27), que pour les témoins; coefficient kappa pondéré à 0.90 ; IC 95% = [0.80-1] (Tableau 28).

Tableau 26 Concordance entre polymorphismes de densité *HindIII* et Q981H (génotype) chez tous les sujets (cas + témoins).

Génotype <i>HindIII</i>		Génotype Q981H			
		QQ	QH	HH	Total
	HH	113	0	1	114
	HL	5	59	1	64
	LL	0	1	7	8
	Total	118	60	9	187
Kappa pondéré= 0,91					

Pour le site *HindIII* : HH= Densité Haute, HL= Densité Intermédiaire, LL= Densité basse.
 Pour le site Q981H QQ= Densité Haute, QH= Densité Intermédiaire, HH= Densité basse.

Tableau 27 Concordance entre polymorphismes de densité *HindIII* et Q981H (génotype) chez les cas.

Génotype <i>HindIII</i>		Génotype Q981H			
		QQ	QH	HH	Total
	HH	59	0	0	59
	HL	3	34	0	37
	LL	0	1	3	4
	Total	62	35	3	100
Kappa pondéré= 0,93					

Pour le site *HindIII* : HH= Densité Haute, HL= Densité Intermédiaire, LL= Densité basse.
 Pour le site Q981H QQ= Densité Haute, QH= Densité Intermédiaire, HH= Densité basse.

Tableau 28 Concordance entre polymorphismes de densité *HindIII* et Q981H (génotype) chez les témoins.

Génotype <i>HindIII</i>		Génotype Q981H			
		QQ	QH	HH	Total
	HH	54	0	1	55
	HL	2	25	1	28
	LL	0	0	4	4
	Total	56	25	6	87
Kappa pondéré= 0,90					

Pour le site *HindIII* : HH= Densité Haute, HL= Densité Intermédiaire, LL= Densité basse.

Pour le site Q981H QQ= Densité Haute, QH= Densité Intermédiaire, HH= Densité basse.

4. Etude du nombre de sites antigéniques de CR1 (phénotype) selon les polymorphismes de densité (génotype)

Le nombre de sites antigéniques de CR1 (phénotype) selon les polymorphismes de densité *HindIII* et Q981H a été étudié.

a. Etude du nombre de sites antigéniques de CR1 (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site *HindIII* (génotype)

Le tableau 29 présente les résultats du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes selon le génotype pour le site *HindIII*. Les sujets (cas + témoins) génotypés HH présentaient une densité plus haute (801 ± 271) que les sujets génotypés HL (511 ± 186) ou les sujets génotypés LL (270 ± 137). La différence était statistiquement significative ($p < 0,0001$ pour les deux comparaisons). Par ailleurs le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocyte était statistiquement plus élevé chez les sujets porteurs de l'allèle H (sujets génotypés HL [511 ± 186], sujets génotypés HH ou HL [696 ± 280]) que les sujets porteurs de l'allèle L (sujets génotypés LL [270 ± 137], sujets génotypés HL ou LL [485 ± 195]). Ces données sont confirmées aussi bien chez les cas que chez les témoins et suggèrent d'une part que la présence de l'allèle H est associée à une densité plus élevée comparée à l'allèle L et que d'autre part les critères génétiques sont concordants avec les critères phénotypiques.

Tableau 29 Nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes selon le génotype pour le site *Hind*III chez les cas et/ou témoins.

Sujets	Polymorphismes de densité <i>Hind</i> III (génotype)														
	HH (n=114)	LL (n=8)	<i>p</i>	HH (n=114)	HL (n=65)	<i>p</i>	HL (n=65)	LL (n=8)	<i>p</i>	HH+HL (n=179)	LL (n=8)	<i>p</i>	HH (n=114)	HL+LL (n=73)	<i>p</i>
Cas + Témoins (n=187)	801 ± 271	270 ± 137	<10 ⁻⁴	801 ± 271	511 ± 186	< 10 ⁻⁴	511 ± 186	270 ± 137	0,0007	696 ± 280	270 ± 137	<10 ⁻⁴	801 ± 271	485 ± 195	<10 ⁻⁴
Cas (n=100)	742 ± 262	210 ± 142	0,0018	742 ± 262	486 ± 175	< 10 ⁻⁴	486 ± 175	210 ± 142	0,016	643 ± 263	210 ± 142	0,029	742 ± 262	460 ± 190	<10 ⁻⁴
Témoins (n=87)	864 ± 268	329 ± 118	0,003	864 ± 268	544 ± 197	< 10 ⁻⁴	544 ± 197	329 ± 118	0,04	756 ± 289	329 ± 118	0,006	864 ± 268	517 ± 201	<10 ⁻⁴

HH = sujets homozygotes pour l'allèle H de *Hind*III, HL = sujets hétérozygotes, LL = sujets homozygotes pour l'allèle L de *Hind*III.

b. Etude du nombre de sites antigéniques de CR1 (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype)

Le tableau 30 présente les résultats du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes selon le génotype pour le site Q981H. Les sujets (cas + témoins) génotypés QQ présentaient une densité plus haute (795 ± 269) que les sujets génotypés QH (496 ± 194) ou les sujets génotypés HH (350 ± 172). La différence était statistiquement significative ($p < 0,0001$ pour les deux comparaisons). Par ailleurs le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes était significativement plus élevé chez les sujets porteurs de l'allèle Q (sujets génotypés QH [496 ± 194], sujets génotypés QQ ou QH [694 ± 284] que les sujets porteurs de l'allèle H (sujets génotypés HH [350 ± 172], sujets génotypés QH ou HH [477 ± 197]). Ces données sont confirmées aussi bien chez les cas que chez les témoins et suggèrent d'une part que la présence de l'allèle Q est associée à une densité plus élevée comparée à l'allèle H et d'autre part que les critères génétiques sont également concordants pour le site Q981H avec les critères phénotypiques.

Tableau 30 Nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes selon le génotype pour le site Q981H chez les cas et/ou témoins.

Polymorphismes de densité Q981H (génotype)															
Sujets	QQ (n=118)	HH (n=9)	p	QQ (n=118)	QH (n=60)	p	QQ (n=118)	HH+QH (n=69)	p	HH (n=9)	QQ+QH (n=178)	p	QH (n=60)	HH (n=9)	p
Cas + Témoins (n=187)	795 ±	350 ±	<10 ⁻⁴	795 ±	496 ±	<10 ⁻⁴	795 ±	477 ±	10 ⁻⁴	350 ±	694 ±	0,0004	496 ±	350 ±	0,04
	269	172		269	194		269			172			194	172	
Cas (n=100)	730 ±	251 ±	0,006	730 ±	474 ±	<10 ⁻⁴	730 ±	456 ±	10 ⁻⁴	251 ±	638 ±	0,01	474 ±	251 ±	0,08
	262	143		262	189		262			143			189	143	
Témoins (n=87)	866 ±	399 ±	0,001	866 ±	528 ±	<10 ⁻⁴	866 ±	503 ±	10 ⁻⁴	399 ±	762 ±	0,005	528 ±	399 ±	0,16
	261	175		261	200		261			175			200	175	

QQ = sujets homozygotes pour l'allèle Q de Q981H, QH = sujets hétérozygotes, HH = sujets homozygotes pour l'allèle H de Q981H.

c. Comparaison entre cas et témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site *HindIII* (génotype)

La comparaison de la densité moyenne de CR1 (nombre de sites antigéniques par érythrocytes) selon les polymorphismes de densité pour le site *HindIII*, montrait une densité plus basse chez les cas homozygotes pour l'allèle H (742 ± 262) comparés aux témoins (864 ± 268) ($p = 0,006$).

Par ailleurs, la densité moyenne de CR1 était également statistiquement plus basse chez les cas comparés aux témoins quand on regroupait les sujets homozygotes pour l'allèle H et les sujets hétérozygotes (Sujets HH + HL), (643 ± 263 et 756 ± 289 respectivement) ($p = 0,003$) (Tableau 31, Figure 35).

Tableau 31 Comparaison entre cas et témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site *HindIII* (génotype).

Sujets		Cas (n = 100)	Témoins (n = 87)	p
Polymorphismes de densité <i>HindIII</i>	HH (n = 114)	742 ± 262	864 ± 268	0,006
	HL (n = 65)	486 ± 175	544 ± 197	0,21
	LL (n = 8)	210 ± 142	329 ± 118	0,31
	HL+LL (n = 73)	460 ± 190	517 ± 201	0,25
	HH+HL (n = 179)	643 ± 263	756 ± 289	0,003

HH = sujets homozygotes pour l'allèle H de *HindIII*, HL = sujets hétérozygotes, LL = sujets homozygotes pour l'allèle L.

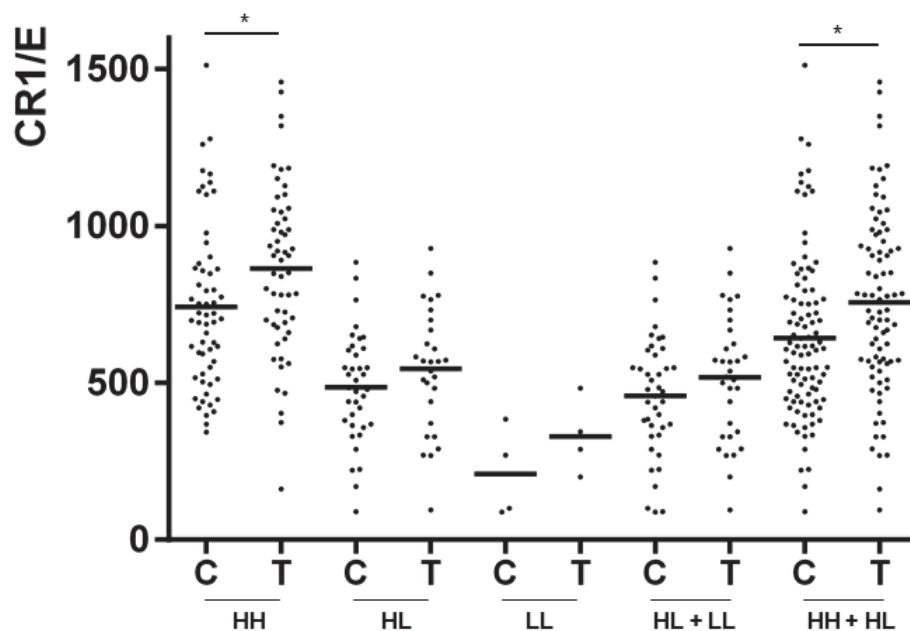


Figure 35 Comparaison entre cas et témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site *HindIII* (génotype).

d. Comparaison entre cas et témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype)

La comparaison de la densité moyenne de CR1 (nombre de sites antigéniques par érythrocytes) selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H, montrait une densité plus basse chez les cas homozygotes pour l'allèle Q (730 ± 262) comparés aux témoins (866 ± 261) ($p = 0,003$).

Par ailleurs, la densité moyenne de CR1 était également statistiquement plus basse chez les cas comparés aux témoins quand on regroupait les sujets homozygotes pour l'allèle Q et les sujets hétérozygotes (sujets QQ + QH), (638 ± 267 et 762 ± 289 respectivement) ($p = 0,002$) (Tableau 32, Figure 36).

Tableau 32 Comparaison entre cas et témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype).

Sujets		Cas (n = 100)	Témoins (n = 87)	<i>p</i>
Polymorphismes de densité Q981H	QQ (n = 118)	730 ± 262	866 ± 261	0,003
	QH (n = 60)	474 ± 189	528 ± 200	0,33
	HH (n = 9)	251 ± 143	399 ± 175	0,39
	QH+HH (n = 69)	456.47 ± 194.31	503 ± 200	0,42
	QQ+QH (n = 178)	637.50 ± 267.45	762 ± 289	0,002

QQ = sujets homozygotes pour l'allèle Q de Q981H, QH = sujets hétérozygotes, HH = sujets homozygotes pour l'allèle H.

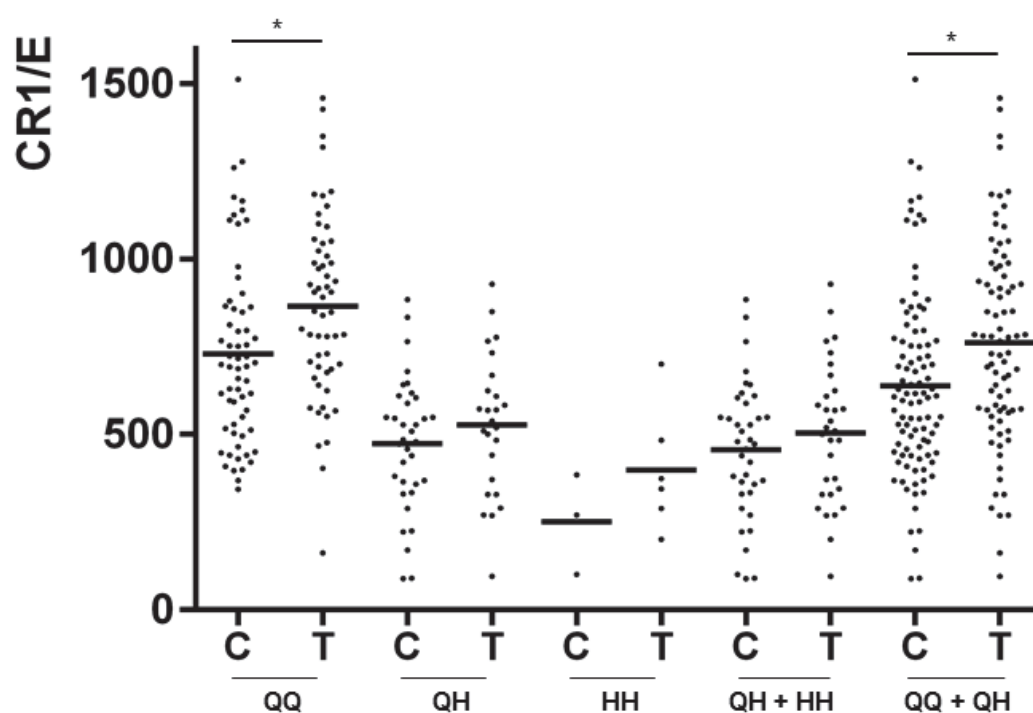


Figure 36 Comparaison entre cas et témoins du nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (phénotype) selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype).

IV. Association entre polymorphismes de longueur et polymorphismes de densité

1. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB (protéine) et polymorphismes de densité pour les sites *HindIII* et Q981H (gène)

Aucune association n'était statistiquement significative entre les polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB (protéine) et polymorphismes de densité ni pour le site *HindIII* ni pour Q981H aussi bien chez les cas que chez les témoins.

Le tableau 33 présente l'ensemble de résultats obtenus chez tous les sujets (cas + témoins), les cas et les témoins.

2. Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par HRM (gène) et polymorphismes de densité pour les sites *HindIII* et Q981H (gène)

Aucune association n'était statistiquement significative entre les polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par HRM (gène) et polymorphismes de densité ni pour le site *HindIII* ni pour Q981H aussi bien chez les cas que chez les témoins.

Le tableau 34 présente l'ensemble de résultats obtenus chez tous les sujets (cas + témoins), les cas et les témoins.

Tableau 33 Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par WB (protéine) et polymorphismes de densité pour les sites *HindIII* et Q981H (gène) chez les cas et/ou les témoins.

		Polymorphismes <i>HindIII</i>				Polymorphismes Q981H			
		HH	HL	LL	<i>p</i>	QQ	QH	HH	<i>p</i>
Polymorphismes de longueur (WB) Cas et témoins (n=187)	CR*1	70	50	8	0,09	74	45	9	0,16
	CR*1CR1*2	34	12	0		34	12	0	
	CR1*2	8	2	0		8	2	0	
	CR1*1CR1*3	1	1	0		1	1	0	
	CR1*2CR1*4	1	0	0		1	0	0	
Polymorphismes de longueur (WB) Cas (n=100)	CR*1	32	28	4	0,07	35	26	3	0,17
	CR*1CR1*2	19	8	0		19	8	0	
	CR1*2	6	0	0		6	0	0	
	CR1*1CR1*3	1	1	0		1	1	0	
	CR1*2CR1*4	1	0	0		1	0	0	
Polymorphismes de longueur (WB) Témoins n=87	CR*1	38	22	4	0,49	39	19	6	0,45
	CR*1CR1*2	15	4	0		15	4	0	
	CR1*2	2	2	0		2	2	0	
	CR1*1CR1*3	0	0	0		0	0	0	
	CR1*2CR1*4	0	0	0		0	0	0	

n = effectifs, WB = Western Blot, *p* correspondant à l'association entre polymorphismes de longueur étudiés par WB (protéine) et polymorphismes de densité pour les sites *HindIII* et Q981H (gène).

Tableau 34 Association entre polymorphismes de longueur de CR1 étudiés par HRM (gène) et polymorphismes de densité pour les sites *HindIII* et Q981H (gène) chez les cas et/ou les témoins.

		Polymorphismes <i>HindIII</i>				Polymorphismes Q981H			
		HH	HL	LL	<i>p</i>	QQ	QH	HH	<i>p</i>
Polymorphismes de longueur (HRM)	F	68	50	8	0,13	72	45	9	0,22
	FS	36	12	0		36	12	0	
	S	8	2	0		8	2	0	
Cas et témoins (n=187)	EF	1	1	0		1	1	0	
	T	1	0	0		1	0	0	
Polymorphismes de longueur (HRM)	F	31	28	4	0,14	34	26	3	0,27
	FS	20	8	0		20	8	0	
	S	6	0	0		6	0	0	
Cas (n=100)	EF	1	1	0		1	1	0	
	T	1	0	0		1	0	0	
Polymorphismes de longueur (HRM)	F	37	22	4	0,44	38	19	6	0,38
	FS	16	4	0		16	4	0	
	S	2	2	0		2	2	0	
Témoins (n=87)	EF	0	0	0		0	0	0	
	T	0	0	0		0	0	0	

n = effectifs, HRM = High Resolution Melting, *p* correspondant à l'association entre polymorphismes de longueur étudiés par HRM (gène) et polymorphismes de densité pour les sites *HindIII* et Q981H (gène).

V. Etude du CR1 soluble sérique par ELISA

Le taux du CR1 soluble sérique (CR1S) chez les sujets inclus dans cette étude était de 27.17 ± 21.55 ng/mL [1,57-116,90] avec une médiane à 18,8 ng/mL.

Chez les cas, les taux du CR1S étaient plus élevés ($31,60 \pm 22,86$ ng/mL [2,34-116,90] avec une médiane à 24,45 ng/mL) par rapport aux témoins ($21,96 \pm 18,71$ ng/mL [1,57-97,25] avec une médiane à 16,78 ng/mL). Cette différence était statistiquement significative ($p = 0,002$) (Tableau 35).

Après ajustement sur l'âge, cette différence était statistiquement significative : $\beta = 9,3 \pm 3,53$; $p = 0,009$.

Tableau 35 Etude du CR1 soluble sérique chez les cas et les témoins.

Sujets	Cas (n = 100)	Témoins (n= 85)	<i>p</i>
Taux du CR1S (ng/mL)	$31,60 \pm 22,86$	$21,96 \pm 18,71$	0,002

n= effectifs, CR1S = taux du CR1 soluble sérique étudié par ELISA.

La figure 37 présente la répartition des taux du CR1S dans chaque groupe.

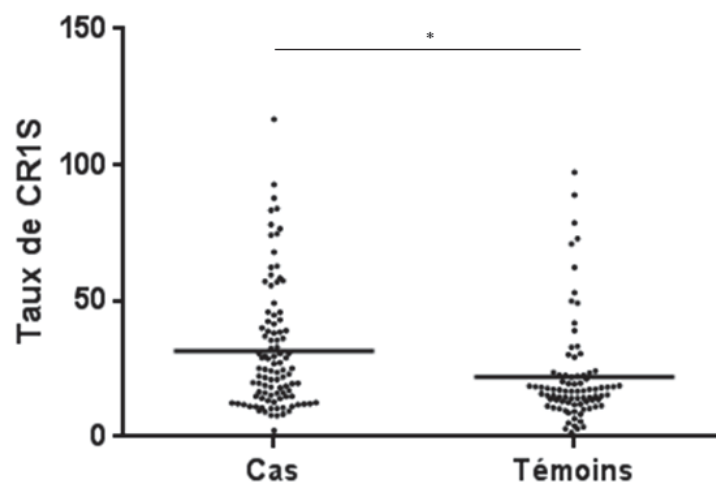


Figure 37 Répartition des taux du CR1 soluble sérique chez les cas et les témoins.

Par ailleurs, il n'existait aucune corrélation entre le taux du CR1 soluble sérique et l'âge : Coefficient de corrélation de Pearson : $r = 0,11$, $p = 0,10$ chez tous les sujets (cas + témoins), $r = -0,001$, $p = 0,99$ chez les cas et $r = 0,04$, $p = 0,70$ chez les témoins. Il paraît donc très peu probable que le taux du CR1 soluble sérique soit âge-dépendant.

1. Taux du CR1 soluble sérique selon les polymorphismes de longueur de CR1

Chez les sujets exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 (sujets CR1*1 CR1*1), le taux du CR1S était statistiquement plus élevé chez les cas ($31,70 \pm 25,04$ ng/mL) par rapport aux témoins ($23,49 \pm 20,91$ ng/mL) ($p = 0,048$), mais cette différence n'était plus significative en regroupant les sujets exprimant les isoformes longs (sujets CR1*1 CR1*1 et sujets CR1*1 CR1*3). En l'occurrence, chez les sujets exprimant l'isoforme CR1*2 (sujets CR1*1 CR1*2 et sujets CR*2 CR1*2), le taux du CR1S était statistiquement plus élevé chez les cas ($31,03 \pm 18,89$ ng/mL) par rapport aux témoins ($17,82 \pm 10,02$ ng/mL) ($p = 0,009$). Ces résultats se confirment, chez les sujets exprimant les deux isoformes (sujets CR1*1 CR1*2), puisque le taux du CR1S était également plus élevé chez les cas ($30,34 \pm 18,71$ ng/mL) par rapport aux témoins ($18,41 \pm 10,68$ ng/mL) ($p = 0,03$) (Tableau 36).

Tableau 36 Taux du CR1S chez les cas et/ou les témoins selon les polymorphismes de longueur de CR1.

Polymorphismes de longueur de CR1 (Phénotypes)	Taux du CR1S (ng/mL)			
	Cas + Témoins (n = 185)	Cas (n = 100)	Témoins (n = 85)	<i>p</i>
CR1*1 CR1*1 (n = 126)	27,66 ± 23,37	31,70 ± 25,04	23,49 ± 20,91	0,048
CR1*1 CR1*1 + CR1*1CR1*3 (n = 128)	27,62 ± 23,20	31,50 ± 24,69	23,49 ± 20,91	0,05
CR1*1 CR1*2 (n = 46)	25,41 ± 16,83	30,34 ± 18,71	18,41 ± 10,68	0,03
CR1*2 CR1*2 (n = 10)	26,48 ± 18,97	34,11 ± 21,19	15,02 ± 6,26	0,14
CR1*1 CR1*3 (n = 2)	24,82 ± 6,85	24,82 ± 6,85	—	—
CR1*1 CR1*2 + CR1*2 CR1*2 (n = 56)	25,60 ± 17,05	31,03 ± 18,89	17,82 ± 10,02	0,009
CR1*2 CR1*4 (n = 1)	57,42	57,42	—	—
CR1*1 CR1*2 + CR1*2 CR1*2 + CR1*2 CR1*4 (n = 57)	26,16 ± 17,42	31,80 ± 19,14	17,82 ± 10,02	0,006
CR1*2 CR1*2 + CR1*2 CR1*4 (n = 11)	29,29 ± 20,27	37,44 ± 21,26	15,02 ± 6,26	0,10

Par ailleurs, il n'existait pas de différence du taux de CR1S entre les cas ou entre les témoins selon les polymorphismes de longueur de CR1 (Figure 38).

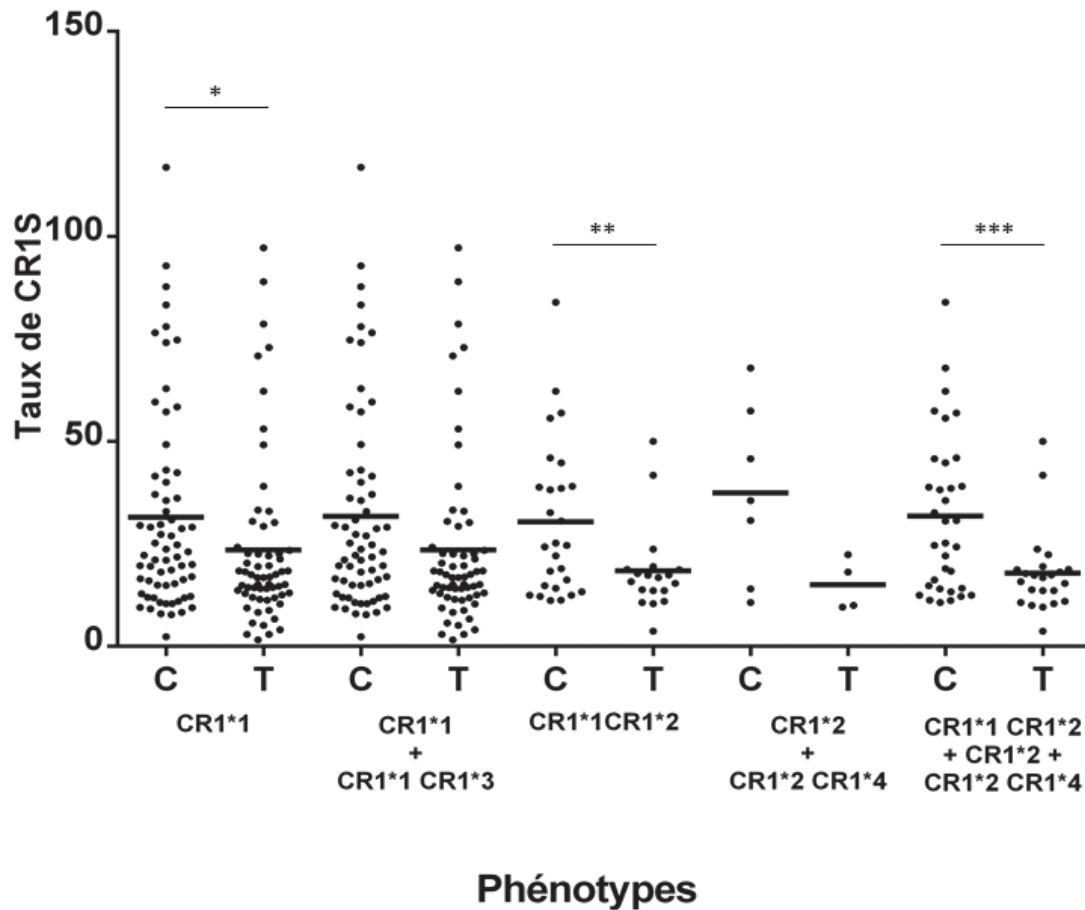


Figure 38 Comparaison des taux du CR1 soluble (ng/mL) selon les polymorphismes de longueur de CR1 chez les cas et les témoins. Comparaison entre cas et témoins exprimant l'isoforme CR1*1 (* $p = 0,04$). Comparaison entre cas et témoins exprimant les deux isoformes CR1*1 et CR1*2 (** $p = 0,03$). Comparaison entre cas et témoins exprimant l'isoforme CR1*2 (***) $p = 0,006$). Aucune comparaison entre cas ou entre témoins n'est statistiquement significative.

2. Taux du CR1 soluble sérique selon les polymorphismes de densité de CR1

a. Etude du CR1 soluble sérique selon les polymorphismes de densité pour le site *HindIII* et Q981H (génotype)

Les tableaux 37 et 38 présentent les résultats des taux du CR1 soluble selon le génotype pour le site *HindIII* et Q981H respectivement. Il n'existait aucune différence statistiquement significative quand on comparait les taux du CR1 soluble selon les

génotypes, aussi bien chez tous les sujets, chez les cas et chez les témoins. Ces résultats suggèrent que le taux du CR1 soluble n'est pas génétiquement déterminé.

Tableau 37 Taux du CR1 soluble selon le génotype pour le site *HindIII* chez les cas et/ou témoins.

Taux du CR1 soluble selon les polymorphismes de densité pour <i>HindIII</i>										
Sujets	HH (n=112)		p	HH (n=112)		p	HL (n=65)		p	P
	LL (n=8)	LL (n=8)		HL (n=65)	HL (n=65)		LL (n=8)	LL (n=8)		
Cas + Témoins (n=185)	26,4 ± 20,5	38,9 ± 36,5	0,41	26,9 ± 20,8	26,9 ± 20,8	0,88	26,9 ± 20,8	38,9 ± 36,5	0,48	26,4 ± 20,5
										0,58
Cas (n=100)	31,6 ± 22,2	51,5 ± 45,8	0,31	29,3 ± 20,4	29,3 ± 20,4	0,61	29,3 ± 20,4	51,5 ± 45,8	0,29	31,6 ± 22,2
										0,97
Témoins (n=85)	20,6 ± 16,9	26,3 ± 24,1	0,88	23,8 ± 21,4	23,8 ± 21,4	0,68	23,8 ± 21,4	26,3 ± 24,1	0,99	20,6 ± 16,9
										0,92
										24,1 ± 21,3

HH = sujets homozygotes pour l'allèle H de *HindIII*, HL = sujets hétérozygotes, LL = sujets homozygotes pour l'allèle L de *HindIII*.

Tableau 38 Taux du CR1 soluble selon le génotype pour le site Q981H chez les cas et/ou témoins.

Taux du CR1 soluble (ng/mL) selon les polymorphismes de densité pour Q981H																
Sujets	QQ		HH	p	QQ		QH	p	HH+QH		HH	QQ+QH	p	QH	HH	p
	(n=116)		(n=9)		(n=116)		(n=60)		(n=69)	(n=9)	(n=176)					
Cas + Témoins (n=185)	26,4 ± 20,2	37,0 ± 34,6	0,40	0,83	26,4 ± 20,2	27,1 ± 21,6	28,4 ± 23,6	37,0 ± 34,6	26,6 ± 20,6	27,1 ± 21,6	37,0 ± 34,6	0,39	0,41			
Cas (n=100)	31,4 ± 21,7	63,7 ± 47,5	0,12	0,61	31,4 ± 21,7	29,1 ± 21,1	31,8 ± 24,9	63,7 ± 47,5	30,6 ± 21,4	29,1 ± 21,1	63,7 ± 47,5	0,09	0,09			
Témoins (n=85)	20,6 ± 16,8	23,7 ± 19,2	0,75	0,87	20,6 ± 16,8	24,3 ± 22,6	24,2 ± 21,7	23,7 ± 19,2	21,8 ± 18,7	24,3 ± 22,6	23,7 ± 19,2	0,76	0,82			
QQ = sujets homozygotes pour l'allèle Q de Q981H, QH = sujets hétérozygotes, HH = sujets homozygotes pour l'allèle H de Q981H.																

b. Comparaison entre cas et témoins du taux du CR1 soluble selon les polymorphismes de densité pour le site *HindIII* (génotype)

La comparaison des taux du CR1 soluble selon le génotype *HindIII* retrouvait des taux plus élevés chez les cas homozygotes pour l'allèle H ($31,67 \pm 22,23$ ng/mL) comparés aux témoins ($20,65 \pm 16,99$) ($p = 0,004$).

Par ailleurs, les taux du CR1S étaient également statistiquement plus élevés chez les cas comparés aux témoins quand on regroupait les sujets homozygotes pour l'allèle H et les sujets hétérozygotes (sujets HH+HL), ($30,77 \pm 21,46$ et $21,74 \pm 18,57$ respectivement) ($p = 0,003$) (Tableau 39).

Tableau 39 Comparaison entre cas et témoins du taux du CR1 soluble selon les polymorphismes de densité pour le site *HindIII* (génotype).

Sujets		Taux du CR1 soluble (ng/mL)		<i>P</i>
		Cas (n=100)	Témoins (n=85)	
Polymorphismes de densité <i>HindIII</i>	HH (n=112)	$31,67 \pm 22,23$	$20,65 \pm 16,99$	0,004
	HL (n=65)	$29,34 \pm 20,40$	$23,80 \pm 21,43$	0,14
	LL (n=8)	$51,56 \pm 45,84$	$26,30 \pm 24,16$	0,49
	HL+LL (n=73)	$31,50 \pm 24,02$	$24,12 \pm 21,38$	0,18
	HH+HL (n=177)	$30,77 \pm 21,46$	$21,74 \pm 18,57$	0,0035

HH = sujets homozygotes pour l'allèle H de *HindIII*, HL = sujets hétérozygotes, LL = sujets homozygotes pour l'allèle L.

c. Comparaison entre cas et témoins du taux de CR1 soluble selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype)

La comparaison des taux du CR1 soluble selon le génotype Q981H retrouvait des taux plus élevés chez les cas homozygotes pour l'allèle Q ($31,44 \pm 21,71$ ng/mL) comparés aux témoins ($20,65 \pm 16,83$ ng/mL) ($p = 0,0038$).

Par ailleurs, les taux du CR1S étaient également statistiquement plus élevés chez les cas comparés aux témoins quand on regroupait les sujets homozygotes pour l'allèle Q et les sujets hétérozygotes (sujets QQ+QH), ($30,61 \pm 21,41$ ng/mL et $21,82 \pm 18,79$ respectivement) ($p = 0,0048$) (Tableau 40).

Tableau 40 Comparaison entre cas et témoins du taux de CR1 soluble selon les polymorphismes de densité pour le site Q981H (génotype).

Sujets		Taux du CR1 soluble (ng/mL)		
		Cas (n=100)	Témoins (n=85)	<i>P</i>
Polymorphismes de densité Q981H	QQ (n=116)	31,44 ± 21,71	20,65 ± 16,83	0,0038
	QH (n=60)	29,13 ± 21,10	24,35 ± 22,63	0,22
	HH (n=9)	63,76 ± 47,53	23,75 ± 19,29	0,13
	QH+HH (n=69)	31,86 ± 24,92	24,23 ± 21,72	0,19
	QQ+QH (n=176)	30,61 ± 21,41	21,82 ± 18,79	0,0048

3. Corrélation entre taux du CR1 soluble et nombre de sites antigéniques de CR1 (densité)

Il n'existait pas de corrélation significative entre taux du CR1 soluble et nombre de sites antigéniques de CR1 (densité) ni chez tous les sujets (cas + témoins) (coefficient de corrélation de Pearson : $r = -0,06$, $p = 0,4$), ni chez les cas ($r = 0,06$, $p = 0,55$), ni chez les témoins ($r = -0,13$, $p = 0,23$).

4. Corrélation entre taux du CR1 soluble et score au MMSE

Il n'existait pas de corrélation entre taux du CR1 soluble sérique et score au MMSE chez les cas : Coefficient de corrélation de Pearson : $r = 0,009$, $p = 0,93$. A l'inverse, il existait une corrélation négative entre taux du CR1 soluble et score au MMSE aussi bien chez tous les sujets (cas + témoins), que chez les témoins ($r = -0,20$, $p = 0,008$ et $r = -0,32$, $p = 0,002$ respectivement) (Figure 39).

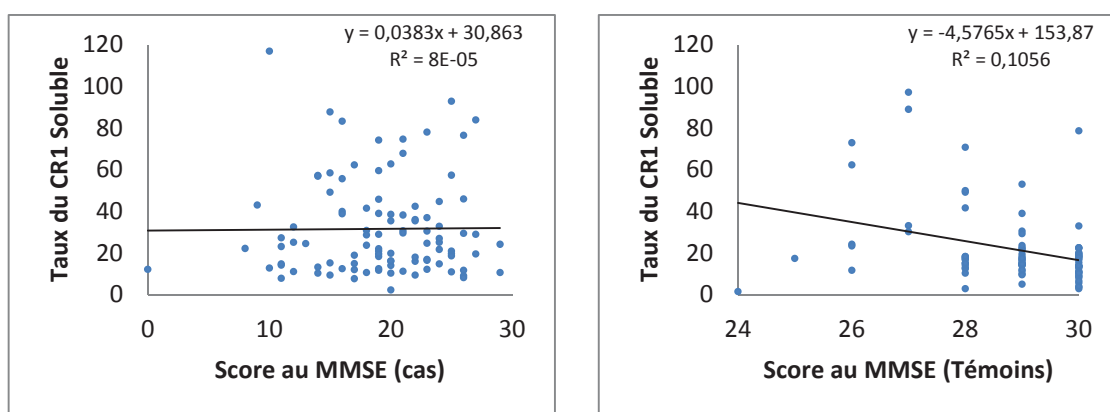


Figure 39 Corrélation entre taux du CR1 soluble et score au MMSE.

VII. Etude des facteurs associés à la MA (analyse multivariée)

L'analyse multivariée réalisée a permis d'identifier cinq facteurs indépendamment associés à la maladie d'Alzheimer : le sexe féminin, l'âge, le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocyte (densité), le taux du CR1 soluble sérique et le polymorphisme de densité Q981H (Tableau 41).

Tableau 41 Analyse multivariée des facteurs associés à la maladie d'Alzheimer.

Variables	Unité	OR	IC 95 %		<i>p</i>
Sexe (Femme vs Homme)	1	2,100	1,012	4,366	0,0465
Âge en années	1	1,163	1,103	1,227	< 0,0001
Densité (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocyte)	30	0,948	0,912	0,986	0,0084
Taux du CR1 soluble sérique (ng/mL)	1	1,026	1,008	1,044	0,0045
Polymorphisme de densité Q981H (Q vs HH)	1	10,59	1,416	79,342	0,0215

OR = Odds Ratio, IC 95% = Intervalle de confiance à 95% de l'OR.

Afin d'explorer le risque lié à des variations quantitatives différentes pour nos variables explicatives, nous avons modélisé dans le tableau 42 notre analyse multivariée avec des risques ajustés pour des variations unitaires différentes des trois variables quantitatives (âge, densité, taux du CR1 soluble). Ceci permet d'explorer des variations pouvant avoir une pertinence clinique, en l'absence de données dans la littérature. Ainsi, pour la variable densité, le seuil de détection biologique étant de 30 sites, la moyenne dans la population étant de 500

(150-1500), une variation de 30 sites est associée selon notre modèle, à une baisse du risque de développer la MA de 5.2%, cependant cette variation de 30 unités n'est pas nécessairement ni cliniquement ni biologiquement pertinente. Ainsi, si l'on retient une variation de 200 sites antigéniques, ce qui est biologiquement plus discriminant, on peut constater, selon notre modèle, une diminution du risque de développer la MA de 29.8%, ce qui apparaît également plus pertinent sur le plan clinique. Par ailleurs, une augmentation du taux du CR1 sérique soluble de 20 ng/mL serait associé selon notre modèle à une augmentation du risque de MA de 1.6 (IC 95% [1.17- 2.38]).

Tableau 42 Analyse multivariée des facteurs associés à la maladie d'Alzheimer avec variations quantitatives des variables explicatives.

Variables	Unité	OR	IC 95 %		p
Sexe (Femme vs Homme)	1	2,100	1,012	4,366	0,0465
Âge en années	1	1,163	1,103	1,227	< 0,0001
Âge en années	5	2,131	1,633	2,781	< 0,0001
Âge en années	10	4,541	2,667	7,732	< 0,0001
Densité (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocyte)	30	0,948	0,912	0,986	0,0084
Densité (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocyte)	100	0,838	0,734	0,956	0,0084
Densité (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocyte)	200	0,702	0,539	0,913	0,0084
Densité (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocyte)	400	0,492	0,291	0,834	0,0084
Densité (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocyte)	500	0,413	0,214	0,797	0,0084
Taux du CR1 soluble sérique (ng/mL)	1	1,026	1,008	1,044	0,0045
Taux du CR1 soluble sérique (ng/mL)	10	1,294	1,083	1,545	0,0045
Taux du CR1 soluble sérique (ng/mL)	20	1,674	1,174	2,387	0,0045
Taux du CR1 soluble sérique (ng/mL)	30	2,165	1,271	3,688	0,0045
Taux du CR1 soluble sérique (ng/mL)	40	2,801	1,377	5,698	0,0045
Taux du CR1 soluble sérique (ng/mL)	50	3,624	1,492	8,804	0,0045
Polymorphisme de densité Q981H (Q vs HH)	1	10,59	1,416	79,342	0,0215

OR = Odds Ratio, IC 95% = Intervalle de confiance à 95% de l'OR.

En l'occurrence, la présence de l'allèle Q pour Q981H augmenterait le risque de la maladie d'Alzheimer et la présence de l'allèle H serait associé à une baisse du risque de 90.6% (Figure 40).

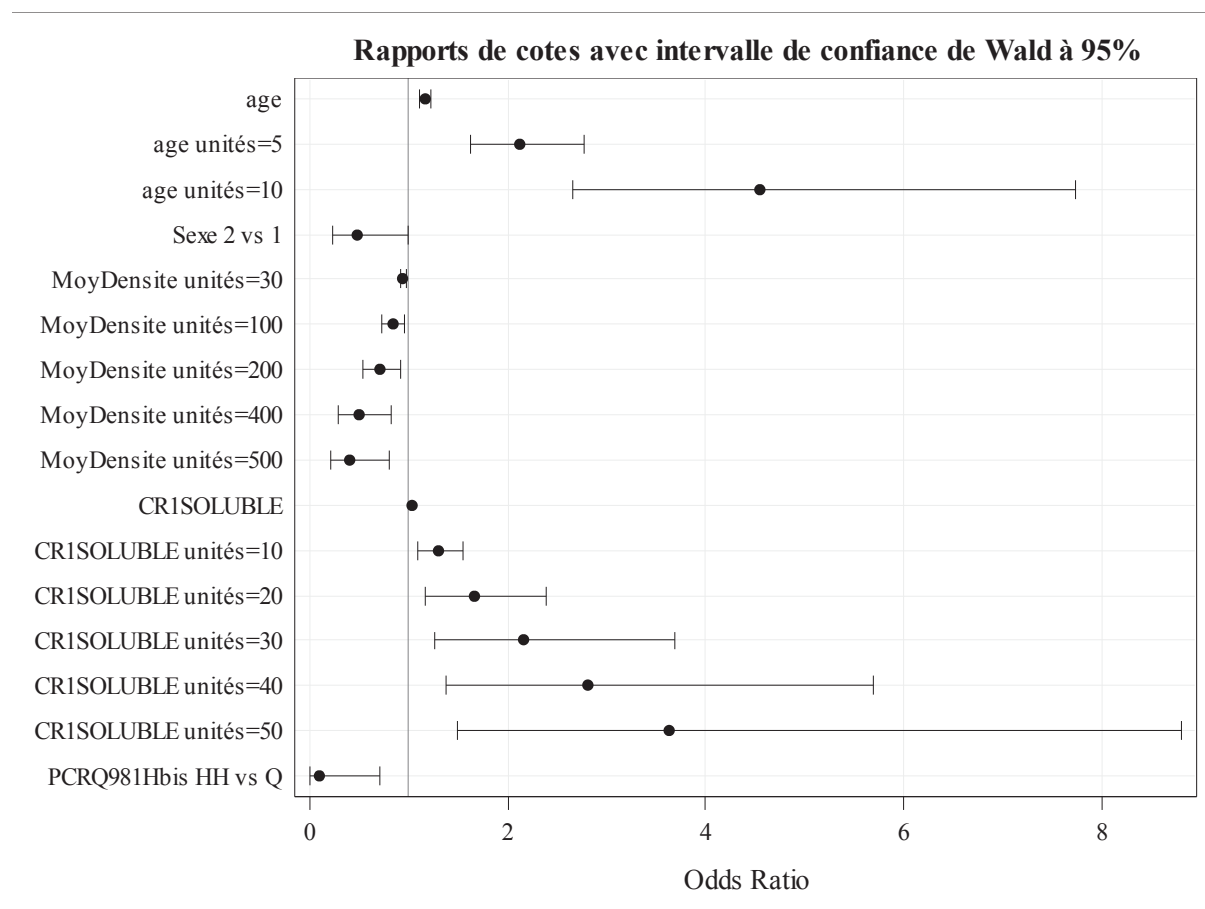


Figure 40 Facteurs indépendemment associés à la maladie d'Alzheimer avec variations quantitatives des variables explicatives de la maladie.

Article 1

R Mahmoudi, A Kisserli, JL Novella, B Donvito, M Dramé, B Réveil, V Duret, D Jolly, BN Pham, J H Cohen. Alzheimer's disease is associated with low density of the long complement receptor type 1 isoform. *Neurobiol of Aging* 2015. DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.006

Titre de l'article : La Maladie d'Alzheimer est associée à une densité basse de l'isoforme long de CR1.

Auteurs : R Mahmoudi, A Kisserli, JL Novella, B Donvito, M Dramé, B Réveil, V Duret, D Jolly, BN Pham, J H Cohen.

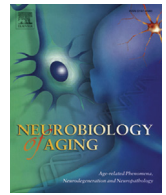
Revue : *Neurobiology of Aging*.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative évolutive, résultant de l'interaction entre un terrain génétique et des facteurs environnementaux. Récemment, les études d'association pangénomiques ont permis d'identifier plus de 20 loci potentiellement impliqués dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer à début tardif, dont le gène *CR1*, (Récepteur du complément de type 1), notamment au niveau de deux SNPs (rs6656401 et rs3818361). Bien que ces études aient identifié le gène *CR1* comme gène de susceptibilité à la MA, la signification fonctionnelle des deux SNPs, rs6656401 et rs3818361, reste inconnue. Néanmoins, toutes ces études suggèrent un rôle du système du complément dans la physiopathologie de la MA.

L'objectif de cet article était de corréliser aux données génotypiques (SNPs, polymorphismes de longueur) étudiés respectivement par pyroséquençage et HRM (High Resolution Melting ou fusion à haute résolution), des éléments phénotypiques (polymorphismes de longueur, densité ou nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes), étudiés respectivement par Western Blot et cytométrie en flux.

Nous avons montré par deux méthodes différentes dont une innovante (HRM), que d'une part, la densité de l'isoforme long de CR1 (CR1*2 [S]) était plus basse chez les sujets atteints de MA à début tardif, comparée à celle de sujets contrôles, et que d'autre part, l'isoforme CR1*2 (S) était exprimé à une densité plus basse que l'isoforme CR1*1 (F). Ces données suggèrent l'existence d'allèles silencieux de *CR1*. Enfin, les deux SNPs, rs6656401 et rs3818361, étaient fortement associés à l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]) aussi bien au niveau du gène qu'au niveau de la protéine. Ces résultats montrent que le polymorphisme de longueur de CR1 (isoforme CR1*2 [S]) est le phénotype le plus probable de l'association entre le gène *CR1* et la MA, établie par les études d'association pangénomiques.

Nos résultats suggèrent que la maladie d'Alzheimer résulterait plus d'une insuffisance d'épuration des plaques amyloïdes que d'une augmentation des dépôts amyloïdes.



Alzheimer's disease is associated with low density of the long CR1 isoform



Rachid Mahmoudi^{a,b,c,*}, Aymric Kisserli^{d,e}, Jean-Luc Novella^{a,b,c}, Béatrice Donvito^{d,e}, Moustapha Dramé^{c,f}, Brigitte Réveil^{d,e}, Valérie Duret^{d,e}, Damien Jolly^{c,f}, Bach-Nga Pham^{d,e}, Jacques H. Cohen^{d,e}

^a Champagne-Ardenne Resource and Research Memory Center (CMRR), Maison Blanche Hospital, Reims University Hospitals, Reims, France

^b Department of Internal Medicine and Geriatrics, Maison Blanche Hospital, Reims University Hospitals, Reims, France

^c Faculty of Medicine, University of Reims Champagne-Ardenne, EA 3797, Reims, France

^d Department of Immunology, Robert Debré Hospital, Reims University Hospitals, Reims, France

^e Faculty of Medicine, University of Reims Champagne-Ardenne, LRN EA 4682, Reims, France

^f Department of Research and Innovation, Robert Debré Hospital, Reims University Hospitals, Reims, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2014

Received in revised form 31 October 2014

Accepted 5 January 2015

Available online 9 January 2015

Keywords:

Alzheimer's disease

CR1

CR1 length polymorphism

Complement

Genetic risk

Single-nucleotide polymorphism

ABSTRACT

The long complement receptor type 1 (CR1) isoform, CR1*2 (S), has been identified as being associated with Alzheimer's disease (AD) risk. We aimed to analyze the phenotypic structural and expression aspects (length and density) of CR1 in erythrocytes of 135 Caucasian subjects (100 AD and 35 controls). CR1 length polymorphism was assessed at protein and gene levels using Western blot and high-resolution melting, respectively. CR1 sites on erythrocytes were enumerated by flow cytometry. CR1 gene analysis, spotting the rs6656401 and rs3818361 polymorphisms, was performed by pyrosequencing. The CR1 density was significantly lower in AD patients expressing the CR1*2 isoform compared with the controls ($p = 0.001$), demonstrating lower expression of CR1 in CR1*2 carriers. Our data suggested the existence of silent CR1 alleles. Finally, rs6656401 and rs3818361 were strongly associated with CR1 length polymorphism ($p < 0.0001$). These observations indicate that AD susceptibility is associated with the long CR1 isoform (CR1*2), albeit at a lower density, suggesting that AD results from insufficient clearance of plaque deposits rather than increased inflammation.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that is characterized mainly by memory impairment and/or a deficit in other cognitive functions. Neuropathologically, AD is characterized by the presence of both extracellular deposits of amyloid- β (A β) peptides and intracellular neurofibrillary tangles containing the hyperphosphorylated Tau protein (Avramopoulos, 2009). Inflammation with activation of the complement system has also been described as a prominent feature of AD neuropathology (Eikelenboom et al., 2006). The amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PSEN1), presenilin 2 (PSEN2), apolipoprotein E (APOE), and triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) have been implicated in the etiology of AD (Bekris et al., 2010;

Campion et al., 1999; Guerreiro et al., 2013; Hardy and Selkoe, 2002; Jonsson et al., 2013). In addition, recent large genome-wide association studies (GWASs) have identified close to 20 loci associated with AD, including CR1 (Harold et al., 2009; Hollingworth et al., 2011; Lambert et al., 2009, 2013; Naj et al., 2011; Seshadri et al., 2010). Two noncoding single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CR1 gene, rs6656401 and rs3818361, have been associated with AD (Lambert et al., 2009). The CR1 gene encodes the complement receptor type 1 (CR1), which is a component of the regulators of complement activity.

CR1 (the C3b/C4b receptor, CD35) is a membrane-bound glycoprotein that binds to the complement proteins C3b, C4b, C3bi, and C1q and to ficolins (Jacquet et al., 2013). It is a highly polymorphic glycoprotein that exhibits 3 types of polymorphisms: density, structural, and Knops blood group (Cohen et al., 1999). Density polymorphism is a stable phenotype that accounts for the constitutive expression level of CR1 on erythrocytes, although acquired deficiency may also occur in some diseases (such as AIDS or systemic lupus erythematosus [SLE]). In Caucasians, erythrocytes

* Corresponding author at: Champagne-Ardenne Resource and Research Memory Center (CMRR), Maison Blanche Hospital, Reims University Hospitals, 45 Rue Cognac Jay, F-51092 Reims Cedex, France. Tel.: +33 3 26 83 23 41; fax: +33 3 26 78 42 28.

E-mail address: rmahmoudi@chu-reims.fr (R. Mahmoudi).

from different healthy subjects show up to a 10-fold variation in the number of CR1 molecules per erythrocyte (range, 150–1200 molecules per cell) (Cornillet et al., 1991; Moulds et al., 1991, 1992). Structural polymorphism is reflected by the existence of 4 CR1 isoforms of different lengths. In the increasing order of molecular weight, these isoforms are CR1*3 or CR1-F' (160 kDa), CR1*1 or CR1-F (190 kDa), CR1*2 or CR1-S (220 kDa), and CR1*4 or CR1-D (250 kDa) (Birmingham et al., 2003; Krych-Goldbergh et al., 2002; Wong et al., 1983). The most common isoform of CR1, which is found in about 87% of Caucasians, is CR1*1, the extracellular domain of which is arranged in 4 long homologous regions (LHRs) designated LHR-A, -B, -C, and -D (Hourcade et al., 1988; Klickstein et al., 1987). LHR-A exhibits a C4b binding site, whereas LHR-B and LHR-C exhibit a C3b/C4b binding site. The other CR1 isoforms are related to a variation of LHR number. The second most common isoform of CR1, which is found in about 11% of Caucasians, CR1*2, presents an additional (fifth) LHR, termed LHR-S; thus, this isoform contains an additional C3b/C4b binding site. The other 2 (and rarer) CR1 isoforms, CR1*3 and CR1*4, exhibit a deletion of 1 LHR or 2 additional LHRs, respectively.

The role of complement in AD pathogenesis has been highlighted by different studies suggesting that AD is associated with increased complement activation. The aim of this study was to analyze the phenotypic structural and expression aspects of CR1 on erythrocytes of AD patients (length and density polymorphisms), as most CR1 is found in erythrocytes in the circulatory system. A comparison between the phenotypic CR1 length polymorphism (LP) and the CR1 LP deduced from *CR1* gene analysis was performed. Finally, a molecular analysis of the *CR1* gene to type the rs6656401 and rs3818361 polymorphisms was performed.

2. Methods

2.1. Patients

A total of 135 Caucasian subjects (100 AD patients and 35 controls) were investigated in this prospective study, which was approved by the regional ethics committee. Written informed consent was obtained from each individual. All AD patients met the diagnostic criteria of probable AD according to the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition* (American Psychiatric Association, 1994) and the criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (McKhann et al., 1984). The control subjects were without any organic brain or cognitive disorders. Subjects with manifest depressive psychotic episodes or diseases likely to affect the physiology of CR1, such as hemolytic anemia, terminal renal or liver failure, or SLE, were excluded from the study. Blood samples were drawn into Vacutainer tubes containing 0.12 mL of 0.15% EDTA.

2.2. Protein analysis

2.2.1. Anti-CR1 monoclonal antibodies

A J3D3 monoclonal antibody (moAb) (Cook et al., 1985) was used for flow cytometry and Western blot (WB) (Supplementary Methods). Other anti-CR1 moAbs J3B11, TO5, and E11 were also used in flow cytometry or WB for the control experiments (Supplementary Table 1).

2.2.2. Determination of CR1 LP on erythrocytes using WB

Detergent-solubilized membrane proteins from erythrocytes were electrophoresed on 7.5% sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gels under nonreducing conditions. Separated proteins were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes

(Poly Labo/Paul Block, Strasbourg, France), and the CR1 molecules recognized by the anti-human CR1 reactive moAb were visualized by ECL chemiluminescence (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) after sequential incubation with biotinylated sheep anti-mouse IgG and a streptavidin-biotin horseradish peroxidase complex (Amersham). Densitometric analysis of WBs was performed on a Bio-Rad model ChemiDoc XRS densitometer using the Quantity One 1-D analysis software, version 4.6.1 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

2.2.3. Quantification of CR1 expression on erythrocytes using flow cytometry

The mean CR1 density on erythrocytes was determined using flow cytometry, as described previously (Kiss et al., 1996). A standard curve was obtained from donors of known CR1 antigenic sites with a density ranging from 180 to 1000 per erythrocyte. Flow cytometry was performed on stained cells using a flow cytometer (FACStarplus; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). At least 10,000 events for each sample were collected. A mean fluorescence channel was used to quantify the staining of each sample. The detection threshold was 30 CR1 antigenic sites per erythrocyte.

2.3. Genetic study

2.3.1. Analysis of CR1 LP using high-resolution melting

Original primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a total volume of 20 μ L, using 10 μ L of 2 $\times$ LightCycler 480 High Resolution Melting Master Mix (Roche, Meylan, France), 1 μ L of 300 nmol/L forward primer, 1 μ L of 300 nmol/L reverse primer, and 10 ng of DNA. PCR was performed on a 96-well thermal cycler (Veriti; Applied Biosystems) using an amplification protocol of 1 cycle at 95 °C for 10 minutes, 45 cycles at 95 °C for 10 seconds, 62 °C for 15 seconds, and 72 °C for 20 seconds. The high-resolution melting of the amplicons using the LightCycler 480 System (Roche) displayed the melting curve profiles corresponding to the 4 CR1 length phenotypes that were observed using WB.

2.3.2. Study of CR1 gene polymorphism by pyrosequencing and rs6656401 amplification

The PCR primers used in this analysis were A661A and 5' biotinylated A661RE BIOT. PCR was performed on a MyCycler apparatus (Bio-Rad) under the following conditions: final volume of 100 μ L containing 1 μ L of DNA solution (approximately 100–250 ng), 200 μ mol/L of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 mmol/L of each primer, 1.5 mmol/L of MgCl₂, and 2.5 U of Taq DNA polymerase (AmpliTaq; Applied Biosystems) in the manufacturer's buffer.

2.3.3. rs3818361 amplification

The PCR primers were ALZ1 and 5' biotinylated ALZ1RE BIOT. The PCR was performed on a MyCycler apparatus under the same conditions, except for MgCl₂ (2 mmol/L). The amplification conditions for rs6656401 or rs3818361 were described in Supplementary Table 2. All fragments were subjected to gel electrophoresis on agarose gels containing ethidium bromide before their isolation for pyrosequencing.

2.3.4. Pyrosequencing

Primers were designed to anneal to codons adjacent to the rs6656401 and rs3818361 polymorphisms of the CR1 gene: A66SEQ 5'-CCTTCTCTGTCTCCATCTT-3' and ALZ1SEQ 5'-ATGGGGCAA-TTTCCT-3', respectively. The biotinylated PCR product (40 μ L) was immobilized onto 4 μ L of streptavidin-coated Sepharose beads (>1.2 nmol binding capacity; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) in 40 μ L of binding buffer (10 mmol/L Tris-HCl [pH 7.6], 2

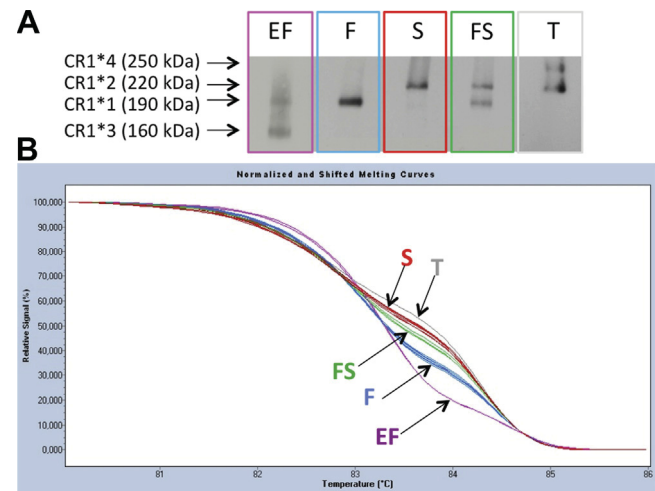


Fig. 1. Genotyping of complement receptor type 1 (CR1) length polymorphisms (LPs) using high-resolution melting (HRM) analysis. (A) LP analysis of CR1 on erythrocytes by Western blot with the anti-CR1 monoclonal antibody J3D3. Five CR1 LP allele patterns are shown: EF pattern, expressions of the CR1*3 (160 kDa) and CR1*1 (190 kDa) isoforms; F pattern, expression of the CR1*1 (190 kDa) isoform; FS pattern, expressions of the CR1*1 (190 kDa) and CR1*2 (220 kDa) isoforms; S pattern, expression of the CR1*2 (220 kDa) isoform; and T pattern, expressions of the CR1*2 (220 kDa) and CR1*4 (250 kDa) isoforms. (B) Determination of the LP genotypes of CR1 using HRM. HRM curve analysis led to the identification of specific curve profiles: T (gray), S (red), FS (green), F (blue), and EF (purple) profiles, which correspond to the CR1 LP alleles determined by sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: T (CR1*2 [220 kDa] and CR1*4 [250 kDa]), S (CR1*2 [220 kDa]), FS (CR1*1 [190 kDa] and CR1*2 [220 kDa]), F (CR1*1 [190 kDa]), and EF (CR1*3 [160 kDa] and CR1*1 [190 kDa]) allo- types, respectively.

mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, and 0.1% Tween 20) on a shaker (1400 rpm) at room temperature for 10 minutes. PCR products immobilized on beads were transferred to a 96-well filter plate (Millipore, Molshiem, France) and vacuum dried. Single-stranded DNA was obtained by adding 50 μ L of denaturation solution (0.2 mol/L NaOH) for 1 minute. The immobilized strand was washed twice with 150 μ L of washing buffer (10 mmol/L Tris-acetate, pH 7.6), resuspended in 45 μ L of annealing buffer (20 mmol/L Tris-acetate, pH 7.6, 2 mmol/L magnesium acetate), and transferred to wells containing 15 pmol of sequencing primer in a volume of 1.5 μ L of annealing buffer. The plate was heated at 61 $^{\circ}$ C for 5 minutes. Real-time pyrosequencing was performed at 28 $^{\circ}$ C in an automated 96-well Pyrosequencer using PSQ SNP 96 enzymes and substrate (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden) with cyclic dispensation of nucleotides. Computer analysis was based on an algorithm that compares the heights of the different peaks and the base number of the polymorphic fragment.

Table 1
Distribution of CR1 LP by WB, comparison between CR1 LP and number of CR1/E antigenic sites, and association between the CR1 LP phenotype detected using WB and the CR1 LP genotype detected using HRM among AD patients and controls

CR1 LP phenotype	Subjects			CR1/E ^a			Genotype ^b				
	AD patients and controls (n = 135)	AD patients (n = 100)	Controls (n = 35)	AD patients and controls (n = 135)	AD patients (n = 100)	Controls (n = 35)	F	FS	S	EF	T
CR1*1 CR1*1 (n = 92)	92 (68.15%)	64 (64.0%)	28 (80.0%)	668 $\pm$ 301	682 $\pm$ 299	636 $\pm$ 309	90	2	0	0	0
CR1*1 CR1*2 (n = 33)	33 (24.44%)	27 (27.0%)	6 (17.14%)	568 $\pm$ 208	524 $\pm$ 196	767 $\pm$ 136	0	33	0	0	0
CR1*2 CR1*2 (n = 7)	7 (5.18%)	6 (6.0%)	1 (2.86%)	584 $\pm$ 203	517 $\pm$ 113	980	0	0	7	0	0
CR1*1 CR1*3 (n = 2)	2 (1.48%)	2 (2.0%)	0 (0%)	615 $\pm$ 151	615 $\pm$ 151	—	0	0	0	2	0
CR1*2 CR1*4 (n = 1)	1 (0.74%)	1 (1%)	0 (0%)	420	420	—	0	0	0	0	1
CR1*1 CR1*2 + CR1*2 CR1*2 (n = 40)	40 (29.63%)	33 (33.0%)	7 (20.0%)	571 $\pm$ 204	523 $\pm$ 182	797 $\pm$ 148	0	33	7	0	0

Key: AD, Alzheimer's disease; CR1/E, number of complement receptor type 1 per erythrocyte; CR1 LP, complement receptor type 1 length polymorphism; HRM, high-resolution melting; WB, Western blot.

^a Student *t* test probability for the comparison between CR1 LP and number of CR1/E antigenic sites.

^b Fisher exact probability test, *p* < 0.0001, for the association between the CR1 LP phenotype detected using WB and the CR1 LP genotype detected using HRM.

2.4. Statistical analyses

Quantitative variables are presented as mean (*M*) $\pm$ standard deviation or standard error of the mean when appropriate and qualitative variables as number (percentage). Factors that distinguished subgroups were studied by cross-tabulations and tested using the chi-square or Fisher exact test, as appropriate, for the comparison of proportions. Student *t* test was used for quantitative data as they were all normally distributed. Relationship between quantitative data was tested using Pearson correlation coefficient. Significance level was set at *p* < 0.05. All analyses were performed using SAS, version 9.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Demographic and clinical characteristics

The differences between AD patients and control subjects were analyzed to confirm that the rationale of this study was valid. There were no significant differences between the 2 groups regarding sex, comorbidities, and malnutrition. Although age differences between AD patients and controls were statistically significant, this difference was only 3.6 years, (i.e., <5 years) between the 2 groups (Supplementary Table 3). Moreover, CR1 density was not correlated with age, in accordance with the previously published data (He et al., 2012). Indeed, the Pearson correlation coefficient was 0.028 (*p* = 0.77). It, therefore, appears unlikely that the CR1 density could be age dependent.

3.2. CR1 phenotypic data

At the protein level, 5 patterns of CR1 length were detected using WB as described in Fig. 1A. Among the 135 subjects studied, 92 expressed the CR1*1 isoform only, 33 expressed both the CR1*1 and CR1*2 isoforms, 7 expressed the CR1*2 isoform only, 2 expressed both the CR1*1 and CR1*3 isoforms, and 1 expressed both the CR1*2 and CR1*4 isoforms (Table 1).

A further study of CR1 density on erythrocytes according to CR1 isoform was performed using flow cytometry. In subjects expressing the CR1*1 isoform only, the mean CR1 density (mean number of sites per erythrocyte) was not significantly different between AD patients (682 $\pm$ 299) and control subjects (636 $\pm$ 309). In subjects expressing the CR1*2 isoform only, the mean CR1 density seemed to be lower in AD patients (517 $\pm$ 113) than in the unique control subject (980); however, no statistical analysis could be performed. In contrast, the mean CR1 density was significantly lower in AD patients expressing the CR1*2 isoform

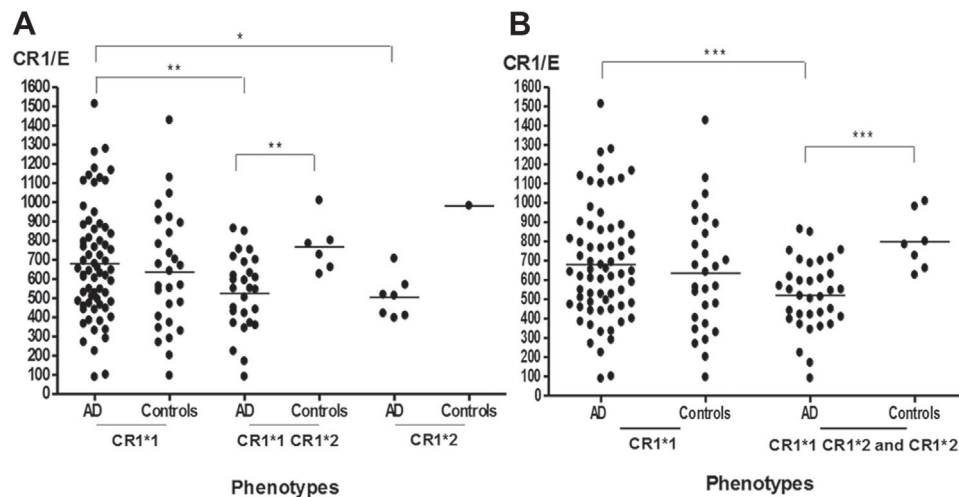


Fig. 2. Comparison between complement receptor type 1 (CR1) length polymorphisms and number of CR1/E antigenic sites between Alzheimer's disease (AD) patients and control subjects. (A) Comparison between AD patients expressing the CR1*2 isoform only or the CR1*1 isoform only (Student *t* test, $*p = 0.01$); comparison between AD patients expressing both CR1*1 and CR1*2 isoforms or the CR1*1 isoform only (Student *t* test, $**p = 0.004$); and comparison between AD patients and control subjects expressing both CR1*1 and CR1*2 isoforms (Student *t* test, $**p = 0.004$). (B) Comparison between AD patients expressing the CR1*1 isoform only or the CR1*2 isoform (Student *t* test, $***p = 0.001$) and comparison between AD patients and control subjects expressing the CR1*2 isoform (Student *t* test, $***p = 0.001$).

only (517 ± 113) than in AD patients expressing the CR1*1 isoform only (682 ± 299) (Student *t* test, $p = 0.01$). To investigate the hypothesis that the CR1*2 isoform is expressed at lower density than the CR1*1 isoform, CR1 density was quantified in subjects expressing both CR1*1 and CR1*2 isoforms. The mean CR1 density was significantly lower in AD patients expressing both CR1*1 and CR1*2 isoforms (524 ± 196) than it was in AD patients expressing the CR1*1 isoform only (682 ± 299) (Student *t* test, $p = 0.004$). In addition, the mean CR1 density was significantly lower in AD patients expressing both CR1*1 and CR1*2 isoforms (524 ± 196) than in control subjects expressing both CR1*1 and CR1*2 isoforms (767 ± 136) (Student *t* test, $p = 0.004$) (Fig. 2A, Table 1). Furthermore, the mean CR1 density was significantly lower in AD patients expressing the CR1*2 isoform (AD patients expressing the CR1*2 isoform only and AD patients expressing both CR1*1 and CR1*2 isoforms) than it was in control subjects expressing the CR1*2 isoform (control subjects expressing the CR1*2 isoform only and control subjects expressing both CR1*1 and CR1*2 isoforms) (Student *t* test, $p = 0.001$). Finally, the mean CR1 density on erythrocytes was significantly lower in AD patients expressing the CR1*2 isoform compared with AD patients expressing the CR1*1 isoform only ($p = 0.001$) (Fig. 2B, Table 1). The reliability of the results of CR1 density obtained using flow cytometry in subjects carrying both CR1*1 and CR1*2 isoforms was also assessed using WB as a second method with concordant results (Fig. 3A and B, Supplementary Table 4).

To rule out a selective different reactivity of the anti-CR1 J3D3 moAb on the various CR1 length isoforms, a comparative flow cytometry quantification of CR1 on erythrocytes was performed using 4 different anti-CR1 moAbs (J3D3, J3B11, TO5, and E11). A Western blotting was also performed to compare the reactivity pattern using anti-CR1 J3D3, TO5, and E11 moAbs. CR1 density measurement of a subject expressing the CR1*1 and CR1*2 isoforms was similar whatever the anti-CR1 moAb used (Supplementary Table 1). These data established that all anti-CR1 moAbs behave as functionally detecting a single antigenic site per CR1 molecule, regardless of the concerned CR1 length isoform and the number of potential antigenic binding sites (Nickells et al., 1998). Quantitative scanning of CR1*1 and CR1*2 bands from a single subject using different anti-CR1 moAbs (J3D3, E11, and TO5) was also identical (Supplementary Fig. 1).

3.3. CR1 molecular data

At the molecular level, the CR1 LP was studied using high-resolution melting analysis, providing 5 melting curve profiles as described in Fig. 1B. Among the 135 subjects studied, 90 subjects exhibited the F melting curve profile, 7 exhibited the S profile, 35 exhibited the FS profile, 2 exhibited the EF profile, and 1 exhibited the T profile (Table 1).

A significant concordance between the phenotypic CR1 length and the CR1 length deduced from the molecular analysis was found in 133 out of the 135 subjects ($p < 0.0001$). The 2 discordant results obtained during the comparison of the phenotypic CR1 length with the CR1 length deduced from the molecular analysis were related to the subjects who expressed the CR1*1 isoform only at the erythrocyte surface but exhibited the FS melting curve profile related to the association of a CR1 allele encoding the CR1*1 isoform with a CR1 allele encoding the CR1*2 isoform. Absence of any CR1*2 isoform expression was reproducible even when WB was performed using a longer exposure time, suggesting the presence of a silent CR1 allele (Fig. 3A).

Both SNPs, rs6656401 and rs3818361, were studied among AD patients and controls. The analysis of rs6656401 showed that it was strongly and significantly associated with the CR1 LP at protein level, both in AD patients and in control subjects (Fisher exact probability test, $p < 0.0001$). Among the 92 subjects who displayed the GG genotype at rs6656401, 95% expressed the CR1*1 isoform only, and none expressed the CR1*2 isoform only. Conversely, the 6 subjects who displayed the AA genotype at rs6656401 expressed the CR1*2 isoform only. Among the 35 subjects who displayed the AG genotype at rs6656401, 88.5% expressed both CR1*1 and CR1*2 isoforms (Table 2).

The analysis of rs3818361 showed that rs3818361 was also strongly and significantly associated with the CR1 LP at protein level, both in AD patients and in control subjects (Fisher exact probability test, $p < 0.0001$). Among the 88 subjects who displayed the CC genotype at rs3818361, 96.59% expressed the CR1*1 isoform only, and none expressed the CR1*2 isoform only. Conversely, among the 7 subjects who displayed the TT genotype at rs3818361, 6 expressed the CR1*2 isoform only (85.71%). Finally, among the 40 subjects who displayed the CT genotype at rs3818361, 80% expressed both CR1*1 and CR1*2 isoforms (Table 2).

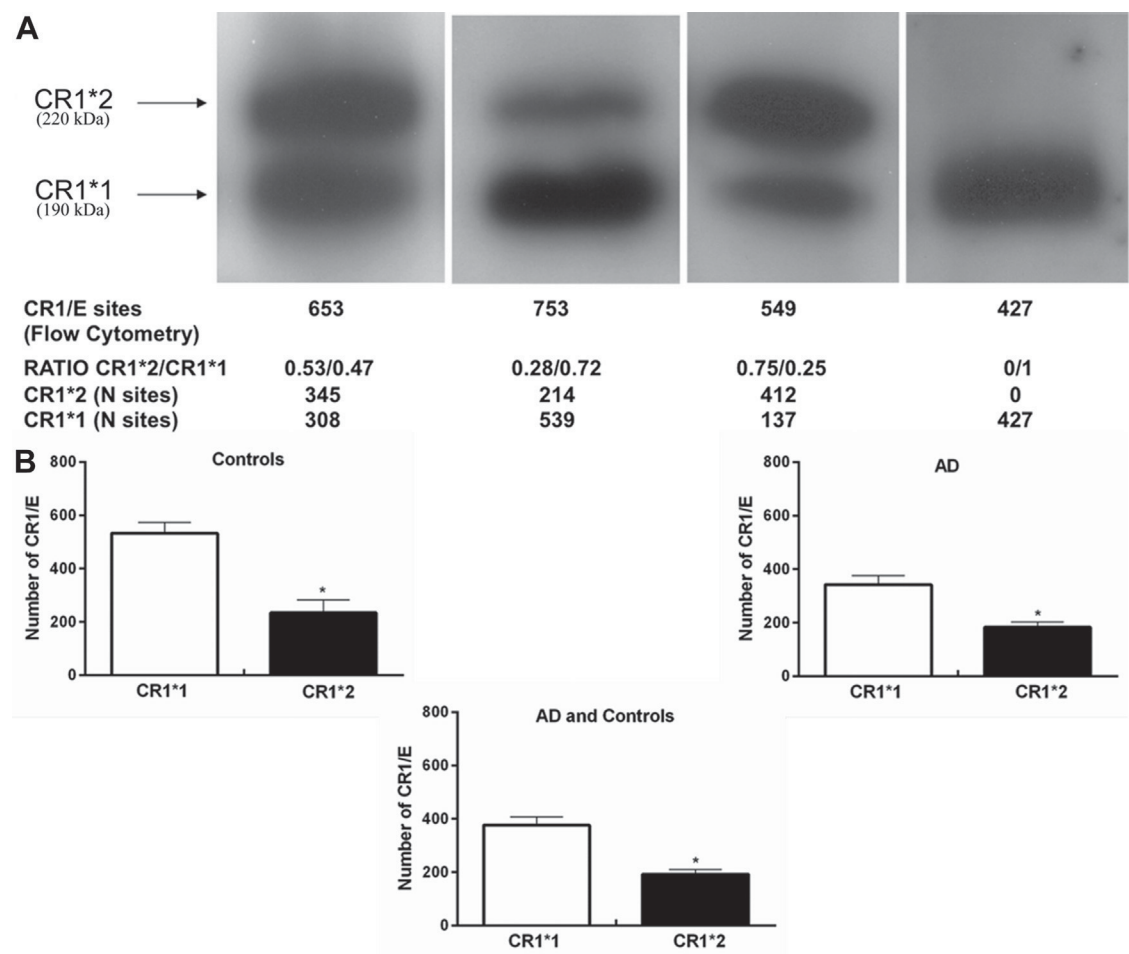


Fig. 3. Variation of complement receptor type 1 (CR1)*1/CR1*2 expression on erythrocytes in different subjects. (A) Illustrative gel of CR1*1/CR1*2 expression variation in 4 different subjects, using Western blot. The number of CR1 antigenic sites on erythrocyte was enumerated for each subject by flow cytometry, using a standard curve to obtain a precise quantitative value for a given individual. The intensities of each band corresponding to the CR1*1 or the CR1*2 isoform were compared on the basis of adjusted volume (mean optical density $\times$ area in square millimeters) and transformed to an antigenic site number from the global CR1 expression on erythrocytes of a given subject obtained by flow cytometry. (B) Quantification of the expression levels of CR1*1 and CR1*2 in subjects carrying both CR1*1 and CR1*2 isoforms. The expression level of the CR1*2 isoform is lower than that of the CR1*1 isoform in all comparisons presented. Asterisk indicates $p < 0.0001$. All values are mean $\pm$ standard error of the mean.

4. Discussion

The originality of this study was to combine CR1 phenotypic data with CR1 genetic data in the study of the CR1 polymorphism in a cohort of well-characterized AD patients and control subjects. CR1 attenuates complement activation by removing C3b/C4b-bound components. In humans, 90% of the total circulating CR1 is found on erythrocytes, thus facilitating the clearance of C3b- or C4b-bound microorganisms or immune complexes from the circulation (Rogers et al., 2006; Taylor et al., 1997). In fact, complexes bound to CR1 are transferred to phagocytes when erythrocytes go through the liver and spleen (Cornacoff et al., 1983; Cosio et al., 1990; Schifferli et al., 1988). By limiting the deposition of C3b and C4b, CR1 might prevent excessive complement activation. Therefore, the expression of CR1 on erythrocytes is viewed as a critical component of the protection of tissue against immune-complex deposition and subsequent disease. An abnormally low CR1 density on erythrocytes, regardless of whether it occurs via acquired or inherited mechanisms, has been considered as a characteristic of some immune diseases, such as SLE (Cohen et al., 1992). Brouwers et al. (2012) showed that the common association of AD risk with CR1 may be explained by the presence of the CR1*2 isoform. In our study, we show that the CR1*2 isoform was actually expressed on the surface of erythrocytes of AD patients, but at lower density

compared with the CR1*1 isoform. These data were generated by studying CR1 density on erythrocytes according to CR1 isoform using 2 different methods, thus reinforcing the validity of our technical approach. Although the association between AD and CR1 has now been widely established, the mechanisms underlying this relation remain to be elucidated. It has been proposed that, in AD patients, the inflammatory process may be associated with A β plaque formation, which may be caused by either an increase in microfibril deposition or an impairment of A β plaque cleaning, resulting in a harmful effect on neighboring cells (Crehan et al., 2012). The A β 42 peptide of A β plaques activates the complement system in the brain of AD patients, in an antibody-independent manner (Rogers et al., 1992, 2006), resulting in C3b binding on A β 42 peptide. Because the previous studies showed that clearance of A β 42 peptide present in the circulation was dependent on CR1, it has been hypothesized that CR1, through its C3b binding sites, is involved in the clearance of the C3b-bound A β 42 peptide from the brain and from the circulatory system (Chibnik et al., 2011; Rogers et al., 2006; Webster et al., 1997). Consequently, the structural CR1 polymorphism linked to the number of C3b binding sites was expected to play a potential role in the pathologic AD process. In fact, the CR1*2 isoform, which contains 1 additional C3b binding site (3 C3b binding sites instead of 2 as present on the CR1*1 isoform), is associated with AD risk (Brouwers et al., 2012). Conversely, the

Table 2

Association between SNPs (rs6656401 and rs3818361) and the CR1 LP genotype detected by HRM or the CR1 LP phenotype detected by WB among AD patients and controls

	SNP					
	rs6656401 ^a			rs3818361		
	GG	AG	AA	CC	CT	TT
Genotype HRM						
F	87	2	0	85	5	0
FS	3	32	0	1	34	0
S	0	1	6	0	1	6
EF	2	0	0	2	0	0
T	0	0	1	0	0	1
Phenotype WB						
CR1*1	88	3	0	85	7	0
CR1*1 CR1*2	2	31	0	1	32	0
CR1*2	0	1	6	0	1	6
CR1*1 CR1*3	2	0	0	2	0	0
CR1*2 CR1*4	0	0	1	0	0	1

Key: AD, Alzheimer's disease; CR1 LP, complement receptor type 1 length polymorphism; HRM, high-resolution melting; SNPs, single-nucleotide polymorphism; WB, Western blot.

Fisher exact probability test, $p < 0.0001$.

^a One missing datum.

CR1*2 isoform is expressed at lower levels than is the CR1*1 isoform in brain samples (Hazarati et al., 2012). Our findings led us to suggest an explanation that reconciles apparently conflicting data. Therefore, even if the long CR1*2 isoform is considered as a more efficient inhibitor of inflammation via a better interaction with C3b-bound components because of the additional C3b binding site compared with the common CR1*1 isoform, the low level of CR1*2 expression observed in AD patients may reverse this property into an impaired CR1 function. This impaired CR1 function may result in the impairment of C3b-bound component clearance, thus leading to insufficient A β plaque cleaning, limited control of the inflammation induced by A β 42 peptide deposits, and increased complement activation, which are harmful to neighboring cells.

The CR1 LP was studied here at the protein and genetic levels. Phenotypic CR1 length and CR1 length deduced from the molecular analysis were concordant in 98.3% of cases. The existence of a silent CR1 allele related to the CR1 LP (CR1*2 isoform in this study) may be associated with these discordant results. Further studies should be performed to address this hypothesis.

The manner in which the CR1 gene, which was identified by GWAS as a susceptibility gene for AD based on the 2 noncoding SNPs rs6656401 and rs3818361, is related to the physiopathologic mechanisms of the disease remains unknown. Recently, Thambisetty et al. (2013) reported that rs3818361 was associated with a low brain amyloid burden in AD patients, as assessed using [¹¹C] Pittsburgh Compound B, emphasizing the potential implication of CR1 in the brain amyloid pathway. In our study, rs6656401 and rs3818361 were strongly associated with the CR1*2 isoform at the protein and gene levels in AD patients and control subjects. Our results are in accordance with those of a recent study that established that another SNP, rs4844610, that tags the GWAS-significant SNPs and the CR1 allele encoding the CR1*2 isoform reflects the same association signal with AD (Hazarati et al., 2012). Taken together, these data reach the same conclusion that the CR1 LP is the probable true phenotype of the susceptibility detected by GWAS SNP studies.

In conclusion, variations in CR1 function via the CR1 LP/density polymorphism relationship deserve consideration in relation to the AD susceptibility mechanisms associated with the CR1 molecule. Qualitative and quantitative variations of CR1, depending of CR1 allele expression or the presence of silent CR1 alleles, and different behaviors of the CR1 molecule regarding its various functions might

lead to an intricately complex picture of CR1 involvement in AD. The precise manner in which the CR1*2 isoform in the immune complement cascade contributes to AD pathogenesis warrants additional functional studies. Finally, the results of this phenotypic and genetic study of CR1, which have pathophysiological potential, may open new avenues of research toward new therapies for AD; these remain unidentified because the causative mechanisms of AD are unknown.

Disclosure statement

The authors disclose no conflicts of interest. The study was approved by the regional ethics committee, and an informed consent was obtained from all the participants.

Acknowledgements

This study was funded by the Reims University Hospitals (grant no: AOL11UF9156) through an Appel d'Offre Locale project. The authors thank all the participants in this study, the members of the Plateforme Régionale de Biologie Innovante, the staff of the Reims Champagne-Ardenne Resource and Research Memory Center, the staff of the Department of Internal Medicine and Geriatrics, the staff of the Department of Immunology, and the staff of the Department of Research and Innovation of Reims University Hospitals.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.006>.

References

- American Psychiatric Association, 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth ed. American Psychiatric Press, Washington, DC.
- Avramopoulos, D., 2009. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Med.* 1, 34.
- Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D., Tsuang, D.W., 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23, 213–227.
- Birmingham, D.J., Chen, W., Liang, G., Schmitt, H.C., Gavit, K., Nagaraja, H.N., 2003. A CR1 polymorphism associated with constitutive erythrocyte CR1 levels affects binding to C4b but not C3b. *Immunology* 108, 531–538.
- Brouwers, N., Van Cauwenberghe, C.V., Engelborghs, S., Lambert, J.C., Bettens, K., Le Bastard, N., Pasquier, F., Gil-Montoya, A., Peeters, K., Mattheijssens, M., Vandenbergh, R., De Deyn, P.P., Cruts, M., Amouyel, P., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C., 2012. Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. *Mol. Psychiatry* 17, 223–233.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Antérion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, A., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Frebourg, T., 1999. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 664–670.
- Chibnik, L.B., Shulman, J.M., Leurgans, S.E., Schneider, J.A., Wilson, R.S., Tran, D., Aubin, C., Buchman, A.S., Heward, C.B., Myers, A.J., Hardy, J.A., Huentelman, M.J., Corneveaux, J.J., Reiman, E.M., Evans, D.A., Bennett, D.A., De Jager, P.L., 2011. CR1 is associated with amyloid plaque burden and age-related cognitive decline. *Ann. Neurol.* 69, 560–569.
- Cohen, J.H.M., Atkinson, J.P., Klickstein, L.B., Oudin, S., Bala Subramanian, V., Moulds, J.M., 1999. The C3b/C4b receptor (CR1, CD35) on erythrocytes: methods for study of the polymorphisms. *Mol. Immunol.* 36, 819–825.
- Cohen, J.H.M., Lutz, H.U., Pennaforte, J.L., Bouchard, A., Kazatchkine, M.D., 1992. Peripheral catabolism of CR1 (the C3b receptor, CD35) on erythrocytes from healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.* 87, 422–428.
- Cook, J., Fischer, E., Boucheix, C., Mirsrahi, M., Jouvin, M.H., Weiss, L., Jack, R.M., Kazatchkine, M.D., 1985. Mouse monoclonal antibodies to the human C3b receptor. *Mol. Immunol.* 22, 531–539.
- Cornacoff, J.B., Hebert, L.A., Smead, W.L., Van Aman, M.E., Birmingham, D.J., Waxman, F.J., 1983. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J. Clin. Invest.* 71, 236–247.

- Cornillet, P., Philbert, F., Kazatchkine, M.D., Cohen, J.H., 1991. Genomic determination of the CR1 (CD35) density polymorphism on erythrocytes using polymerase chain reaction amplification and HindIII restriction enzyme digestion. *J. Immunol. Methods* 136, 193–197.
- Cosio, F.G., Shen, X.P., Birmingham, D.J., Van Aman, M., Hebert, L.A., 1990. Evaluation of the mechanisms responsible for the reduction in erythrocyte complement receptors when immune complexes form in vivo in primates. *J. Immunol.* 145, 4198–4206.
- Crehan, H., Holton, P., Wray, S., Pocock, J., Guerreiro, R., Hardy, J., 2012. Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology* 217, 244–250.
- Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Scheper, W., Rozemuller, A.J., Van Gool, W.A., Hoozemans, J.J., 2006. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 113, 1685–1695.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S., Youkin, S., Hazalet, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St George-Hyslop, P., Singleton, A., Hardy, J., 2013. *TREM2* variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Singh, P., Hawa, J., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A.R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M.K., Brayne, C., Rubinsztein, D.C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Morgan, K., Brown, K.S., Passmore, P.A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A.D., Love, S., Kehoe, P.G., Hardy, J., Mead, S., Fox, N., Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Schürmann, B., Heun, R., Van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frölich, L., Hampel, H., Hüll, M., Rujescu, D., Goate, A.M., Kauwe, J.S.K., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J.C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N.J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., Tsolaki, M., Singleton, A.B., Guerreiro, R., Mühleisen, T.W., Nöthen, M.M., Moebus, S., Jöckel, K.H., Klopp, N., Wichmann, H.E., Carrasquillo, M.M., Pankratz, V.S., Younkin, S.G., Holmans, P.A., O'Donovan, M., Owen, M.J., Williams, J., 2009. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1088–1093.
- Hazrati, L.N., Van Cauwenbergh, C., Brooks, P.L., Brouwers, N., Ghani, M., Sato, C., Cruts, M., Sleegers, K., St-George-Hyslop, P., Van Broeckhoven, C., Rogaeva, E., 2012. Genetic association of CR1 with Alzheimer's disease: a tentative disease mechanism. *Neurobiol. Aging* 33, 2949.e5–2949.e12.
- He, J.R., Xi, J., Ren, Z.F., Qin, H., Zhang, Y., Zeng, Y.X., Mo, H.Y., Jia, W.H., 2012. Complement receptor 1 expression in peripheral blood mononuclear cells and the association with clinicopathological features and prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13, 6527–6531.
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.C., Carrasquillo, M.M., Abraham, R., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., Dowzell, K., Jones, N., Stretton, A., Thomas, C., Richards, A., Ivanov, D., Widdowson, C., Chapman, J., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M.K., Brayne, C., Rubinsztein, D.C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Brown, K.S., Passmore, P.A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A.D., Beaumont, H., Warden, D., Wilcock, G., Love, S., Kehoe, P.G., Hooper, N.M., Vardy, E.R., Hardy, J., Mead, S., Fox, N.C., Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Rutherford, E., Schürmann, B., Heun, R., Kölsch, H., Van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frölich, L., Hampel, H., Gallacher, J., Hüll, M., Rujescu, D., Giegling, I., Goate, A.M., Kauwe, J.S., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J.C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N.J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., Tsolaki, M., Singleton, A.B., Guerreiro, R., Mühleisen, T.W., Nöthen, M.M., Moebus, S., Jöckel, K.H., Klopp, N., Wichmann, H.E., Pankratz, V.S., Sando, S.B., Aasly, J.O., Barcikowska, M., Wszolek, Z.K., Dickson, D.W., Graff-Radford, N.R., Petersen, R.C., Van Duijn, C.M., Krawczak, M., Schreiber, S., Mayhaus, M., Nicolhaus, S., Wagenpfeil, S., Steinberg, S., Stefansson, H., Stefansson, K., Snaedal, J., Björnsson, S., Jonsson, P.V., Chouraki, V., Genier-Boley, B., Hiltunen, M., Soininen, H., Combarros, O., Zelenika, D., Delepine, M., Bullido, M.J., Pasquier, F., Mateo, I., Frank-Garcia, A., Porcellini, E., Hanon, O., Coto, E., Alvarez, V., Bosco, P., Siciliano, G., Mancuso, M., Panza, F., Solfrizzi, V., Nacmias, B., Sorbi, S., Bossù, P., Piccardi, P., Arosio, B., Annoni, G., Seripa, D., Pilotto, A., Scarpini, E., Galimberti, D., Brice, A., Hannequin, D., Licastro, F., Jones, L., Holmans, P.A., Jonsson, T., Riemenschneider, M., Morgan, K., Younkin, S.G., Owen, M.J., O'Donovan, M., Amouyel, P., Williams, J., 2011. Common variants at *ABCA7*, *MS4A6A*, *MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33* and *CD2AP* are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 429–435.
- Hourcade, D., Miesner, D.R., Atkinson, J.P., Holers, V.M., 1988. Identification of an alternative polyadenylation site in the human C3b/C4b receptor (complement receptor 1) transcriptional unit and prediction of a secreted form of complement receptor type 1. *J. Exp. Med.* 168, 1255–1270.
- Jacquet, M., Lacroix, M., Ancelet, S., Gout, E., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., Rossi, V., 2013. Deciphering complement receptor type 1 interactions with recognition proteins of the lectin complement pathway. *J. Immunol.* 190, 3721–3731.
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P.V., Snaedal, J., Björnsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A.I., Lah, J.J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O.A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., Ikram, M.A., Van Duijn, C.M., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Stefansson, K., 2013. Variant of *TREM2* associated with the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 107–116.
- Kiss, E., Csipö, I., Cohen, J.H., Reveil, B., Kárai, M., Szegedi, G., 1996. CR1 density polymorphism and expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 25, 53–58.
- Klickstein, L.B., Wong, W.W., Smith, J.A., Weis, J.H., Wilson, J.G., Fearon, D.T., 1987. Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins. *J. Exp. Med.* 165, 1095–1112.
- Krych-Goldberg, M., Moulds, J.M., Atkinson, J.P., 2002. Human complement receptor type 1 (CR1) binds to a major malarial adhesin. *Trends Mol. Med.* 8, 531–537.
- Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fiévet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Hanon, O., The European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, De Pancorbo, M.M., London, C., Dufouil, C., Jaillard, C., Leveillard, T., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossù, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blanché, H., Dartigues, J.F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., Amouyel, P., 2009. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1094–1099.
- Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D., Naj, A.C., Sims, R., Bellenguez, C., DeStafano, A.L., Bis, J.C., Beecham, G.W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T.A., Jones, N., Smith, A.V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M.A., Zelenika, D., Vardarajan, B.N., Kamatani, Y., Lin, C.F., Gerrish, A., Schmidt, H., Kunkle, B., Dunstan, M.L., Ruiz, A., Bihoreau, M.T., Choi, S.H., Reitz, C., Pasquier, F., Cruchaga, C., Craig, D., Amin, N., Berr, C., Lopez, O.L., De Jager, P.L., Deramecourt, V., Johnston, J.A., Evans, D., Lovestone, S., Letenneur, L., Morón, F.J., Rubinsztein, D.C., Eiriksdottir, G., Sleegers, K., Goate, A.M., Fiévet, N., Huentelman, M.W., Gill, M., Brown, K., Kamboh, M.I., Keller, L., Barberger-Gateau, P., McGuinness, B., Larson, E.B., Green, R., Myers, A.J., Dufouil, C., Todd, S., Wallon, D., Love, S., Rogaeva, E., Gallacher, J., St-George-Hyslop, P., Clarimon, J., Lleo, A., Bayer, A., Tsuang, D.W., Yu, L., Tsolaki, M., Bossù, P., Spalletta, G., Proitsi, P., Collinge, J., Sorbi, S., Sanchez-Garcia, F., Fox, N.C., Hardy, J., Deniz Naranjo, M.C., Bosco, P., Clarke, R., Brayne, C., Galimberti, D., Mancuso, M., Matthews, F., Moebus, S., Mecocci, P., Del Zompo, M., Maier, W., Hampel, H., Pilotto, A., Bullido, M., Panza, F., Caffarra, P., Nacmias, B., Gilbert, J.R., Mayhaus, M., Lennefelt, L., Hakonarson, H., Pichler, S., Carrasquillo, M.M., Ingelsson, M., Beekly, D., Alvarez, V., Zou, F., Valladares, O., Younkin, S.G., Coto, E., Hamilton-Nelson, K.L., Gu, W., Razquin, C., Pastor, P., Mateo, I., Owen, M.J., Faber, K.M., Jonsson, P.V., Combarros, O., O'Donovan, M.C., Cantwell, L.B., Soininen, H., Blacker, D., Mead, S., Mosley Jr., T.H., Bennett, D.A., Harris, T.B., Fratiglioni, L., Holmes, C., De Bruijn, R.F., Passmore, P., Montine, T.J., Bettens, K., Rotter, J.I., Brice, A., Morgan, K., Foroud, T.M., Kukull, W.A., Hannequin, D., Powell, J.F., Nalls, M.A., Ritchie, K., Lunetta, K.L., Kauwe, J.S., Boerwinkle, E., Riemenschneider, M., Boada, M., Hiltunen, M., Martin, E.R., Schmidt, R., Rujescu, D., Wang, L.S., Dartigues, J.F., Mayeux, R., Tzourio, C., Hofman, A., Nöthen, M.M., Graff, C., Psaty, B.M., Jones, L., Haines, J.L., Holmans, P.A., Lathrop, M., Pericak-Vance, M.A., Launer, L.J., Farrer, L.A., Van Duijn, C.M., Van Broeckhoven, C., Moskvina, V., Seshadri, S., Williams, J., Schellenberg, G.D., Amouyel, P., 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452–1458.
- McKhann, G., Drachman, D.A., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS–ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Forces on Alzheimer's disease. *Neurology* 34, 939–944.
- Moulds, J.M., Moulds, J.J., Brown, M., Atkinson, J.P., 1992. Antiglobulin testing for CR1-related (Knops/McCoy/Swain-Langley/York) blood group antigens: negative and weak reactions are caused by variable expression. *Vox. Sang.* 62, 230–235.
- Moulds, J.M., Nickells, M.W., Moulds, J.J., Brown, M.C., Atkinson, J.P., 1991. The C3b/C4b receptor is recognized by the Knops, McCoy, Swain-Langley, and York blood group antisera. *J. Exp. Med.* 173, 1159–1163.
- Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L.S., Vardarajan, B.N., Buross, J., Gallins, P.J., Buxbaum, J.D., Jarvik, G.P., Crane, P.K., Larson, E.B., Bird, T.D., Boeve, B.F., Graff-Radford, N.R., De Jager, P.L., Evans, D., Schneider, J.A., Carrasquillo, M.M., Erkin-Taner, N., Younkin, S.G., Cruchaga, C., Kauwe, J.S., Nowotny, P., Kramer, P., Hardy, J., Huentelman, M.J., Myers, A.J., Barmada, M.M., Demirci, F.Y., Baldwin, C.T., Green, R.C., Rogaeva, E., St George-Hyslop, P., Arnold, S.E., Barber, R., Beach, T., Bigio, E.H., Bowen, J.D., Boxer, A., Burke, J.R., Cairns, N.J., Carlson, C.S., Carney, R.M., Carroll, S.L., Chui, H.C., Clark, D.G., Corneveaux, J., Cotman, C.W., Cummings, J.L., DeCarli, C., DeKosky, S.T., Diaz-Arrastia, R., Dick, M., Dickson, D.W., Ellis, W.G., Faber, K.M., Fallon, K.B., Farlow, M.R., Ferris, S., Frosch, M.P., Galasko, D.R., Ganguli, M., Gearing, M., Geschwind, D.H., Ghetti, B., Gilbert, J.R., Gilman, S., Giordani, B., Glass, J.D., Growdon, J.H., Hamilton, R.L., Harrel, L.E., Head, E., Honig, L.S., Huette, C.M., Hyman, B.T., Jicha, G.A., Jin, L.W., Johnson, N., Karlawish, J., Karydas, A., Kaye, J.A., Kim, R., Koo, E.H., Kowall, N.W., Lah, J.J., Levey, A.I., Lieberman, A.P., Lopez, O.L., Mack, W.H., Marson, D.C., Martiniuk, F., Mash, D.C., Masliah, E., McCormick, W.C., McCurry, S.M., McDavid, A.N., McKee, A.C., Mesulam, M., Miller, B.L., Miller, C.A., Miller, J.W., Parisi, J.E., Perl, D.P., Peskind, E., Petersen, E., Poon, W.W., Quinn, J.F.,

- Rajbhandary, R.A., Raskind, M., Reisberg, B., Ringman, J.M., Roberson, E.D., Rosenberg, R.N., Sano, M., Schneider, L.S., Seeley, W., Shelanski, M.L., Slifer, M.A., Smith, C.D., Sonnen, J.A., Spina, S., Stern, R.A., Tanzi, R.E., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Van Deerlin, V.M., Vinters, H.V., Vonsattel, J.P., Weintraub, S., Welsh-Bohmer, K.A., Williamson, J., Woltier, R.L., Cantwell, L.B., Dombroski, B.A., Beekly, D., Lunetta, K.L., Martin, E.R., Kamboh, M.I., Saykin, A.J., Reiman, E.M., Bennett, D.A., Morris, J.C., Montine, T.J., Goate, A.M., Blacker, D., Tsuang, D.W., Hakonarson, H., Kukull, W.A., Foroud, T.M., Haines, J.L., Mayeux, R., Pericak-Vance, M.A., Farrer, L.A., Schellenberg, G.D., 2011. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 436–441.
- Nickells, M., Hauhart, R., Krych, M., Bala Subramanian, V., Geoghegan-Barek, K., Marsh Jr., H.C., Atkinson, J.P., 1998. Mapping epitopes for 20 monoclonal antibodies to CR1. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 27–33. Erratum in. *Clin. Exp. Immunol.* 113, 315.
- Rogers, J., Cooper, N.R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P.L., Styren, S.D., Civin, W.H., Brachova, L., Bradt, B., Ward, P., 1992. Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10016–10020.
- Rogers, J., Li, R., Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Ahern, G., Cao, P., Kolody, H., Vedders, L., Kolb, W.P., Sabbagh, M., 2006. Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiol. Aging* 27, 1733–1739.
- Schifferli, J.A., Ng, Y.C., Estreicher, J., Walport, M.J., 1988. The clearance of tetanus toxoid/anti-tetanus toxoid immune complexes from the circulation in humans. Complement- and erythrocyte complement receptor 1-dependent mechanisms. *J. Immunol.* 140, 899–904.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A.L., Ikram, M.A., DeStefano, A.L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J.C., Smith, A.V., Carasquillo, M.M., Lambert, J.C., Harold, D., Schrijvers, E.M., Ramirez-Lorca, R., Debette, S., Longstreth Jr., W.T., Janssens, A.C., Pankratz, V.S., Dartigues, J.F., Hollingworth, P., Aspelund, T., Hernandez, I., Beiser, A., Kuller, L.H., Koudstaal, P.J., Dickson, D.W., Tzourio, C., Abraham, R., Antunez, C., Du, Y., Rotter, J.I., Aulchenko, Y.S., Harris, T.B., Petersen, R.C., Berr, C., Owen, M.J., Lopez-Arrieta, J., Varadarajan, B.N., Becker, J.T., Rivadeneira, F., Nalls, M.A., Graff-Radford, N.R., Campion, D., Auerbach, S., Rice, K., Hofman, A., Jonsson, P.V., Schmidt, H., Lathrop, M., Mosley, T.H., Au, R., Psaty, B.M., Uitterlinden, A.G., Farrer, L.A., Lumley, T., Ruiz, A., Williams, J., Amouyel, P., Younkin, S.G., Wolf, P.A., Launer, L.J., Lopez, O.L., Van Duijn, C.M., Breteler, M.M., 2010. Genome wide-analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 303, 1832–1840.
- Taylor, R.P., Martin, E.N., Reinagel, M.L., Nardin, A., Craig, M., Choice, Q., Schlimgen, R., Greenbaum, S., Incardona, N.L., Ochs, H.D., 1997. Bispecific monoclonal antibody complexes facilitate erythrocyte binding and liver clearance of a prototype particulate pathogen in a monkey model. *J. Immunol.* 159, 4035–4044.
- Thambisetty, M., An, Y., Nalls, M., Sojkova, J., Swaminathan, S., Zhou, Y., Singleton, A.B., Wong, D.F., Ferruci, L., Saykin, A.J., Resnick, S.M. for the Baltimore Longitudinal Study of Aging and the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2013. Effect of complement CR1 on brain amyloid burden during aging and its modification by APOE genotype. *Biol. Psychiatry* 73, 422–428.
- Webster, S., Bradt, B., Rogers, J., Cooper, N., 1997. Aggregation state-dependent activation of the classical complement pathway by the amyloid beta peptide. *J. Neurochem.* 69, 388–398.
- Wong, W.W., Wilson, J.G., Fearon, D.T., 1983. Genetic regulation of a structural polymorphism of human C3b receptor. *J. Clin. Invest.* 72, 685–693.

SUPPLEMENTARY DATA

1. Supplementary Methods

1.1 Anti-CR1 monoclonal antibodies:

Anti-CR1 monoclonal antibody (moAb) from J3D3 hybridoma cells (Cook et al., 1985) was cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, glutamine (2 mM), penicillin/streptomycin/fungizone (1000 U/mL; 1000 µg/mL; 2.5 µg/mL; Sigma, St Quentin Fallavier, France). The anti-CR1 J3D3 moAb was purified from mouse ascites using the octanoic acid contraprecipitation method (Steinbuch and Audran, 1969). J3D3 is a member of a group with J8B10, To5, 9H3, 7G9 and YZ-1 whose epitopes are located in the three last SCRs (short consensus repeat) of the 3 first LHRs of the CR1 molecule: SCRs 5, 6, 7, 12, 13, 14, 19, 20 and 21 (Nickells et al., 1998). Other anti-CR1 moAb J3B11, TO5, and E11 were also used in flow cytometry or Western blotting for control experiments (Supplemental Table 1).

Supplemental Table 1. CR1 antigenic sites per erythrocyte measurement of a reference subject CR1*1 CR1*2 using different anti-CR1 monoclonal antibodies.

Anti-CR1 moAbs	CR1/E	Percentage of reference value (966 CR1 antigenic sites/E)
J3D3biot	962	99.6%
J3D3	945	97.8%
J3B11	979	101.3%
TO5	936	96.9%
E11	954	98.8%

Key: CR1/E, number of complement receptor type 1 per erythrocyte; moAbs, monoclonal antibodies.

Mahmoudi R., et *al.* Neurobiology of Aging (36) 2015.

Measurement of CR1 antigenic sites on erythrocyte using different anti-CR1 monoclonal antibodies (J3D3biot, J3D3, J3B11, TO5 and E11) gave very concordant values, indicating that all anti-CR1 moAbs behave as functionally recognizing a single epitope per CR1 molecule. Consequently, low CR1 level on erythrocyte of CR1*2 isoform carriers can't be due to a technical lower recognition of the CR1 by the anti-CR1 J3D3 moAb used.

Supplemental Table 2. Primers and conditions of primer amplification assays.

Primers	Sequence 5' to 3'	PCR specificity	PCR Conditions
A661A	5'-GGCTTGTAGATGCATCATTTCC-3'	<i>rs6656401</i>	94°C 10mn: 1 cycle, (94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s: 35 cycles), 72°C 10mn: 1 cycle
A661RE BIOT	5'-CAATCACGTTAATGATCTCGAGC-3'		
ALZ1	5'-TGTTAGATATGGGGCAATTTC-3'	<i>rs3818361</i>	94°C 10mn: 1 cycle, (94°C 60s, 58°C 60s, 72°C 60s: 35 cycles), 72°C 10mn: 1 cycle
ALZ1RE BIOT	5'-TGTGGCTACTGAAC TACCAATCTT-3'		

2. Supplementary Results

Supplemental Table 3. Demographic and Clinical Characteristics.

Variable	Subjects		<i>p</i>
	AD patients (<i>n</i> = 100)	Controls (<i>n</i> = 35)	
Age (years)	81.5 ± 7.2	77.9 ± 6.3	0.009
Sex (F)	66 (66.0%)	19 (54.3%)	0.23
Level of dependence			
IADL	4.81 ± 2.57	7.56 ± 1.37	< .0001
ADL	5.38 ± 1.0	5.90 ± 0.40	0.0001
Comorbidities (CI)	1.31 ± 1.26	0.94 ± 1.55	0.17
Cognition			
MMSE	19.2 ± 5.3	28.4 ± 1.6	< .0001
Malnutrition	52 (52%)	12 (34.2%)	0.07

Key: AD, Alzheimer's disease; n, number of subjects; IADL, Instrumental Activities of Daily Living: values range from 0 (completely dependent) to 8 (completely independent) (Lawton and Brody, 1969); ADL, Activities of Daily Living: values range from 0 (completely dependent) to 6 (completely independent) (Katz et al., 1963); CI, Charlson's index (Charlson et al., 1985); MMSE, Mini Mental State Examination: score ranges from 0 to 30; higher scores correspond to better cognitive status (Folstein et al., 1975); Malnutrition, was assessed using the Mini Nutritional Assessment Short Form (MNA-SF), and defined as an MNA-SF score <12 (Rubenstein et al., 2001).

Supplemental table 4. CR1*1 and CR1*2 isoform proportion (%) according to the mean measurement of the band intensities observed using western blotting in subjects expressing both the CR1*1 and CR1*2 isoforms: AD patients and/or controls.

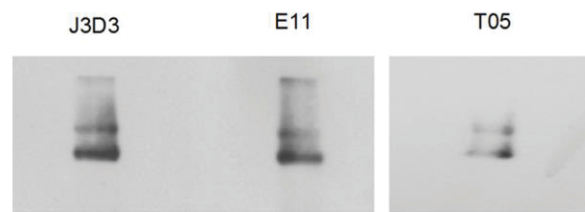
Phenotype Length Polymorphism					
Subjects	CR1*1		CR1*2		<i>p</i>
	Band intensity* (%)	Number of CR1/E	Band intensity (%)	Number of CR1/E	
AD patients and controls (n=33)	65.04 ± 18.10%	376 ± 180	34.96 ± 18.10%	192 ± 106	<10 ⁻⁴
AD patients (n=27)	63.93 ± 19.35%	342 ± 177	36.07 ± 19.35%	183 ± 103	<10 ⁻⁴
Controls (n=6)	70.03 ± 10.61%	533 ± 98	29.98 ± 10.61%	234 ± 120	<10 ⁻⁴

Key: AD, Alzheimer's disease; CR1/E, number of complement receptor type 1 per erythrocyte deduced from band intensity; n, number of subjects.

p, Student's *t* test probability for comparison of the mean measurement of band intensities.

* The intensities of each bands corresponding to the CR1*1 or the CR1*2 isoform were compared on the basis of adjusted volume (mean optical density x area in square millimeters), and transformed to an antigenic site number from the global CR1 expression on erythrocytes of a given subject obtained by flow cytometry.

In AD patients, the global CR1 expression was 63.93% ± 19.35% for the CR1*1 isoform and 36.07% ± 19.35% for the CR1*2 isoform. The number of CR1*2 isoform per erythrocyte deduced from band intensity (183 ± 103) was significantly lower than the number of CR1*1 isoform per erythrocyte deduced from band intensity (342 ± 177) (Student *t* test, *p* < 10⁻⁴).



Supplemental Figure 1. Comparative detection of the CR1*1 CR1*2 phenotype by western blot using anti-CR1 J3D3, E11 and T05 monoclonal antibodies, showing that the relative intensity of the CR1*1 (lower) and CR1*2 (upper) bands were the same for each of the anti-CR1 monoclonal antibodies used.

Brevet

Brevet N° FR1454010 déposé le 02 Mai 2014. Références 9U11 BT FR 5 «Méthode de Détermination du polymorphisme de longueur du récepteur CR1 ». Université de Reims Champagne Ardenne. Inventeurs : Jacques Cohen, A Kisserli, R Mahmoudi, V Duret, B Réveil.



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE

Réception électronique de la soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou d'un certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été automatiquement attribués.

Numéro de demande	1454010	
Numéro de soumission	1000238690	
Date de réception	02 mai 2014	
Vos références	9U11 BT FR 5	
Demandeur	UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE	
Pays	FR	
Titre de l'invention	METHODE DE DETERMINATION DU POLYMORPHISME DE LONGUEUR DU RECEPTEUR CR1.	
Documents envoyés	package-data.xml application-body.xml requetefr.pdf (3 p.) comment.pdf (1 p.) fr-office-specific-info.xml textebrevet.pdf (22 p.) SEQLTXT.txt	requetefr.xml fr-fee-sheet.xml validation-log.xml indication-bio-deposit.xml dessins.pdf (3 p.) SEQLPDF.pdf (1 p.)
Déposé par	EMAIL=cabinet@bleger-rhein.com,CN=Alain RHEIN,O=CABINET BLEGER-RHEIN,C=FR	
Méthode de dépôt	Dépôt électronique	
Date et heure de réception électronique	02 mai 2014, 12:02:39 (CEST)	
Empreinte officielle du dépôt	1C:8F:86:E1:A3:66:E2:6D:17:EB:2C:99:FB:EB:F8:8F:B3:B1:64:83	

/INPI, section dépôt/

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

<120> Méthode de détermination du polymorphisme de longueur du récepteur CR1

<130> 9U11 BT FR 5

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce pour l'amplification d'un segment variant B et d'un segment non variant

<400> 1

ggccttagac ttctcctgc

19

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce pour l'amplification d'un segment variant B et d'un segment non variant

<400> 2

gttgacaaat tggcggcttc g

21

La présente invention concerne le domaine de la détermination du polymorphisme de longueur d'un gène, en l'occurrence le gène CR1.

Il a en effet été démontré que les polymorphismes de longueur du gène CR1 sont impliqués dans la susceptibilité d'un individu à développer différentes maladies graves, et notamment la maladie d'Alzheimer, le lupus érythémateux disséminé, ou encore le paludisme.

Ce gène CR1 code pour une glycoprotéine transmembranaire CR1 (également appelée protéine CD35) de haut poids moléculaire, environ 200 kDa (kilodaltons).

Cette glycoprotéine CR1 (CD35) est présente à la surface de nombreux types cellulaires, notamment les érythrocytes, les lymphocytes B, certains types de cellules T, les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules dendritiques folliculaires, les astrocytes fœtaux ou encore les podocytes glomérulaires.

La glycoprotéine CR1 intervient dans la régulation de la réponse immunitaire déclenchée au cours de maladies infectieuses et autoimmunes.

En particulier, CR1 constitue un récepteur à certains composants du complément, comme C3b, C4b, C3bi (C3b inactif), C1q et MBL (*mannan-binding lectin*). CR1 sera appelé, dans la suite de la description, protéine CR1 ou récepteur CR1.

L'une des principales fonctions de la protéine CR1 est de réguler l'activation du complément en empêchant la formation des convertases des voies classiques et alternes, lesdites convertases consistant en des protéases qui sont responsables de l'activation du système du complément. En d'autres termes, le CR1 est un inhibiteur de la voie classique et de la voie alterne du complément.

CR1 agit également comme cofacteur du facteur I, ce dernier intervenant dans l'inflammation, en modulant le clivage de C3b en C3b et C3bi, C3c en C3dg et de C4b en C4c puis en C4d.

La protéine CR1 permet en outre la clairance, c'est-à-dire l'élimination, des complexes immuns couverts de C3b et de C4b dans le foie et dans la rate.

5 D'un point de vue structural, la protéine CR1 présente quatre formes différentes, ou allotypes, présentant chacune un poids moléculaire différent. En d'autres termes, la protéine CR1 montre un polymorphisme allotypique de longueur.

Les quatre formes différentes de CR1 présentent respectivement un poids moléculaire de 160, 190, 220 et 250 kDa.

10 En termes de nomenclature, la forme de CR1 présentant un poids moléculaire de 190 kDa est appelée CR1*1, de même que le gène codant pour cette forme.

Les formes de poids moléculaire 220 kDa, 160 kDa et 250 kDa sont respectivement notées CR1*2, CR1*3 et CR1*4.

15 Cette nomenclature a été récemment établie afin d'éviter les erreurs fréquentes, dues à l'ancienne nomenclature, dans les équipes de recherche non spécialisées dans l'étude de la protéine CR1*1.

Dans l'ancienne nomenclature, les deux formes les plus communes de CR1 ont d'abord été nommées F (*Fast*) et S (*Slow*) (190 kDa et 220 kDa respectivement) d'après la rapidité de leur migration électrophorétique. L'allotype de 160 kDa découvert ensuite a pris le nom de F'. Lors de l'isolement d'un quatrième allotype la nomenclature a changé, pour devenir A, B, C et D (190 kDa, 220 kDa, 160 kDa et 250 kDa respectivement). L'ordre de ces différentes lettres était en accord avec la fréquence de chacun des allotypes. Toutefois, de nombreuses personnes utilisaient les lettres A, B, C et D pour désigner les molécules en fonction de leur taille (A étant la plus grande et D la plus petite), et il a été décidé de modifier la nomenclature pour utiliser à présent CR1*1, CR1*2, CR1*3 et CR1*4.

Les différentes formes de la protéine CR1 sont représentées sur la figure 1 annexée (d'après Wong W. W., 1989).

35 La forme la plus fréquente de CR1 est la forme CR1*1, avec une fréquence allélique de l'ordre de 83%, mais pouvant varier

en fonction de l'origine géographique des populations. L'allèle CR1*1 reste majoritaire.

La forme CR1*2 est retrouvée dans les populations avec une fréquence de l'ordre de 16%.

5 Pour ce qui est des formes CR1*3 et CR1*4, celles-ci sont très marginales et représentent une fréquence de l'ordre de 1% chacune, cette fréquence variant toujours selon l'origine des personnes.

10 La forme la plus fréquente de CR1, CR1*1, comporte 30 structures répétitives, les SCR pour Short Consensus Repeat, encore appelées CCP (Complement Control Protein). De telles structures ont été mises en évidence à partir de l'ADNc (complémentaire) codant pour CR1*1.

15 Sur la figure 1 annexée, chaque SCR de CR1*1 est représentée par une petite sphère de couleur grise plus ou moins foncée. Les structures homologues sont colorisées de manière identique

Les structures SCR sont regroupées en une structure, ou domaine de taille supérieure, nommée LHR pour Long Homologous Repeat. Chaque LHR comprend 7 SCR, comme illustré sur la figure 1.

La forme CR1*1 de la protéine comporte 4 LHR, qui sont appelés LHR-A, LHR-B, LHR-C et LHR-D, depuis la région N-terminale vers la région C-terminale de ladite protéine, et du milieu extracellulaire vers la membrane cytoplasmique.

En ce qui concerne la forme CR1*2 de CR1, celle-ci comprend 5 LHR comme suit, depuis le milieu externe vers la membrane cellulaire : LHR-A, LHR-B, LHR-B, LHR-C et LHR-D.

30 Pour ce qui est de CR1*3, celle-ci comporte 3 LHR : LHR-A, LHR-C et LHR-D.

Enfin, la forme la plus rare CR1*4 est composée de 6 LHR avec LHR-A, suivi par 3 LHR-B, LHR-C et LHR-D.

Ainsi, les différents allotypes de la protéine CR1 diffèrent par le nombre et le type de LHR qui les composent.

35 Chaque individu peut porter, à la surface de ses cellules, un ou plusieurs allotypes, comme illustré sur la figure 2

annexée. Ainsi, sur les résultats d'une analyse par Western Blot de cinq sujets, visibles sur cette figure, on remarque cinq profils allotypiques différents.

Plus particulièrement, le sujet 1 exprime à la fois CR1*1 (190 kDa) et CR1*3 (160 kDa), le sujet 2 exprime uniquement CR1*1 (190 kDa), le sujet 3 exprime uniquement CR1*2 (220 kDa), le sujet 4 exprime à la fois CR1*1 (190 kDa) et CR1*2 (220 kDa) et le sujet 5 exprime à la fois CR1*2 (220 kDa) et CR1*4 (250 kDa).

Ainsi, la technique d'analyse par western blot est la technique originelle qui permet de diagnostiquer le polymorphisme de longueur de CR1 de chaque individu, en permettant de mettre en évidence la présence d'allotypes différents à la surface de leurs cellules.

Toutefois, cette technique d'analyse présente un certain nombre d'inconvénients.

En particulier, l'analyse protéique par western blot ne peut être effectuée qu'après extraction des membranes cellulaires. De ce fait, elle est lourde à réaliser, et coûteuse en temps. En effet, une telle manipulation nécessite environ deux jours de travail.

En outre, la technique suppose d'obtenir du matériel vivant et en bon état en début de procédure pour espérer avoir des résultats exploitables.

Or, le déterminisme du polymorphisme de longueur de CR1 permet de détecter la susceptibilité de certains individus à développer des maladies graves, comme la maladie d'Alzheimer ou le lupus érythémateux disséminé.

En outre, la détermination du polymorphisme de longueur de CR1 permettrait également de détecter la susceptibilité d'un individu à développer certaines formes de paludisme.

En effet, il a été mis en évidence, notamment, que les individus exprimant, à la surface de leurs cellules, la forme CR1*2 du récepteur, également dénommée forme longue de CR1, étaient plus susceptibles d'être atteints par les maladies susmentionnées.

Cela est dû au fait que le polymorphisme de longueur du récepteur CR1 entraîne notamment une variation dans le nombre de sites de liaison dudit récepteur à ses ligands, en particulier le C3b et le C4b.

5 En conséquence, il est primordial de proposer une méthode de détermination du polymorphisme de longueur du CR1 qui soit à la fois simple, rapide, et fiable. Une telle méthode permettrait de connaître rapidement la susceptibilité de nombreux individus à des pathologies graves et lourdes, et de proposer de manière
10 précoce un traitement adapté aux individus susceptibles de les développer.

Or, il a été expliqué ci-dessus que la technique traditionnelle de détermination du polymorphisme par analyse protéique ne permet pas un diagnostic rapide et à grande
15 échelle.

En outre, les techniques d'amplification ou d'hybridation segmentaire par biologie moléculaire n'ont jamais permis d'obtenir des résultats satisfaisants permettant le typage de tous, ou quasiment tous, les individus. Cela s'explique
20 notamment par le fait que les segments du gène CR1 présentent un caractère extrêmement répétitif.

Il convient donc de proposer, pour remédier aux inconvénients des techniques existantes, une méthode fiable, simple et applicable rapidement à un grand nombre d'individus
25 permettant de déterminer le polymorphisme du CR1, afin de savoir avec précision et rapidement si un individu donné est susceptible de développer certaines pathologies.

Il a alors été mis au point, selon une démarche inventive, une méthode de biologie moléculaire exploitant la distribution
30 quantitative du LHR B au sein du récepteur CR1.

En effet, les différents allotypes de CR1 présentent chacun un domaine LHR A, un domaine LHR C et un domaine LHR D, comme cela est d'ailleurs visible sur la figure 1 jointe.

Toutefois, l'allotype CR1*3 ne comporte pas de LHR B tandis
35 que les allotypes CR1*1, CR1*2 et CR1*4 comportent respectivement 1, 2 et 3 domaines LHR B.

A cet effet, la présente invention concerne une méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1, celui-ci comprenant un domaine LHR (Long Homologous Repeat) A, un domaine LHR C et un domaine LHR D, ledit récepteur CR1 comportant en
 5 outre n domaine LHR B, avec n correspondant à un nombre entier compris entre 0 et 3, ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

- on extrait du matériel génétique à partir d'un échantillon biologique prélevé sur un individu ;
- 10 - à partir dudit matériel génétique, on amplifie, grâce à un seul couple d'amorces spécifiques, un premier segment du domaine LHR B, représentant un variant caractéristique du LHR B, nommé segment variant B, et un deuxième segment appartenant à au moins un domaine,
 15 ledit domaine étant choisi parmi les domaines LHR A, LHR C et LHR D, ledit deuxième segment étant nommé segment non variant, ledit segment variant B et ledit segment non variant présentant, en dehors des zones d'hybridation desdites amorces, au moins trois
 20 différences de nucléotides ;
- on déduit, en utilisant un outil quantitatif, le nombre d'amplicons de segment variant B et le nombre d'amplicons de segment non variant, le ratio variant B/non variant étant différent en fonction du
 25 polymorphisme de longueur du récepteur CR1.

De manière avantageuse, le deuxième segment, ou segment non variant, est un segment du domaine LHR C.

Selon un exemple intéressant, ledit segment variant B et ledit segment non variant présentent, en dehors des zones
 30 d'hybridation desdites amorces, au moins trois et au plus vingt différences de nucléotides, de préférence au moins trois et au plus quinze, et encore plus préférentiellement au moins trois et au plus dix différences de nucléotides.

Dans un mode de réalisation préférentiel, ledit segment
 35 variant B et ledit segment non variant présentent, en dehors des

zones d'hybridation desdites amorces, cinq différences de nucléotides.

Avantageusement, on amplifie le segment variant B et le segment non variant avec un couple d'amorces comprenant une
5 amorce sens de SEQ ID NO:1 et une amorce antisens SEQ ID NO:2.

L'amorce sens de SEQ ID NO:1 est également identifiée par la référence CN3 et sa séquence est la suivante :

5' GGCCTTAGACTTCTCCTGC 3' (SEQ ID NO:1)

L'amorce antisens de SEQ ID NO:2 est également identifiée
10 par la référence CN3re et sa séquence est la suivante :

5' GTTGACAAATTGGCGGCTTCG 3' (SEQ ID NO:2)

De préférence, l'outil quantitatif permettant de déduire le ratio variant B/non variant est la technique par analyse des courbes de fusion à haute résolution, ou HRM (High Resolution
15 Melting), des amplicons obtenus lors de l'étape d'amplification.

La méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon l'invention peut avantageusement être utilisée pour diagnostiquer la présence de l'allotype CR1*2 du récepteur CR1 à la surface des cellules chez un individu.

20 La présente invention est également relative à l'utilisation de la méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 pour diagnostiquer la susceptibilité d'un individu à développer un lupus érythémateux disséminé, la maladie d'Alzheimer ou le paludisme.

25 La présente invention comporte de nombreux avantages. D'une part, le polymorphisme de longueur du CR1 est déterminé très rapidement. En effet, les résultats sont obtenus en 2h environ, une fois que l'extraction du matériel génétique a été effectuée.

Au contraire, la technique biochimique traditionnelle,
30 reposant sur une analyse protéique par western blot, nécessite des étapes qui sont relativement longues : une électrophorèse d'extraits membranaires cellulaires à travers un gel d'acrylamide, une étape de transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose ou de polyvinylidène fluoride (PVDF)
35 et une étape d'identification des allotypes du récepteur CR1 par immunochimiluminescence.

En outre, la méthode de détermination du polymorphisme de longueur de CR1 est très efficace et elle a notamment été validée par la comparaison avec les résultats d'une analyse protéique classique, par la technique du western blot, sur 140
 5 sujets chez lesquels étaient représentés l'ensemble des génotypes connus du polymorphisme de longueur de CR1. La méthode selon l'invention a montré des résultats identiques à ceux obtenus par l'analyse traditionnelle par western blot, et peut de ce fait être considérée comme étant très fiable. En outre,
 10 les tests statistiques effectués ont montré que les résultats étaient significatifs ($t < 10^{-4}$).

La méthode selon l'invention présente également l'avantage non négligeable de ne pas être trop onéreuse, ce qui est particulièrement important pour une méthode que l'on souhaite
 15 appliquer à un grand nombre d'individus afin de déterminer leur susceptibilité à développer certaines pathologies.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront de la description détaillée qui va suivre des modes de réalisation non limitatifs de l'invention, en référence aux
 20 figures annexées dans lesquelles :

- la figure 1 représente une illustration schématique des quatre allotypes identifiés de CR1. Ces quatre allotypes sont appelés CR1*1, CR1*2, CR1*3 et CR1*4, les structures homologues étant grisées de façon identique.
 25 Ces quatre formes de CR1 présentent un polymorphisme allotypique de taille ;
- la figure 2 est une photographie d'un gel de western blot mettant en évidence les différents allotypes de CR1 présents à la surface des cellules de cinq sujets ; dans
 30 l'exemple ayant donné lieu à ces résultats, le sujet 1 exprime à la fois CR1*1 (190 kDa) et CR1*3 (160 kDa), le sujet 2 exprime uniquement CR1*1 (190 kDa), le sujet 3 exprime uniquement CR1*2 (220 kDa), le sujet 4 exprime à la fois CR1*1 (190 kDa) et CR1*2 (220 kDa) et le sujet 5
 35 exprime à la fois CR1*2 (220 kDa) et CR1*4 (250 kDa) ;

- 5 - la figure 3 représente un alignement des séquences d'ADN génomique correspondant, d'une part, au segment variant, nommé segment variant B, et, d'autre part, au segment non variant du domaine LHR C, le segment variant B étant un segment génomique homologue au segment non variant du LHR C. Les différences de nucléotides entre les deux segments susmentionnés, au nombre de 5, sont mises en évidence au moyen de rectangles de couleur gris foncé sous les séquences desdits segments. Les zones encadrées

10 sur la figure correspondent aux zones d'hybridation des amorces sens et antisens, nommées respectivement CN3 et CN3re, qui permettent l'amplification des séquences d'ADN génomique reprises sur cette figure, par exemple par réaction de PCR.
- 15 - Les figures 4A et 4B illustrent les courbes qui sont obtenues lors de l'analyse par PCR-HRM du polymorphisme de longueur du récepteur CR1. L'analyse à l'aide du logiciel « LightCycler 480 software » (LC480; Roche) des courbes de fusion à haute résolution des amplicons

20 obtenus par PCR à partir d'ADN génomique de sujets présentant des allotypes de CR1 différents, montre des profils de courbes différents qui permettent de discriminer les sujets en fonction de leur profil d'expression allotypique de CR1. La figure 4A illustre

25 un premier mode de représentation, appelé «Normalized and Shifted Melting Curves» (« Courbes de fusion normalisées et décalées »), et la figure 4B représente un second mode de représentation appelé «Normalized and Temp-Shifted Difference Plot» (« Graphique différentiel

30 des courbes normalisées et regroupées à une température »). Les profils de courbes sont repartis selon les groupes qui ont été notés F'F, F, FS, S et T, selon l'ancienne nomenclature des différents allotypes du récepteur CR1.

35 La figure 4C illustre la concordance entre les groupes de profils de courbe de fusion (F'F, F, FS, S et T)

obtenus pour cinq individus par la méthode selon l'invention, utilisant la PCR-HRM comme outil quantitatif, et les résultats des allotypes CR1 observés, chez les mêmes individus, par western blot

5 lors d'une analyse protéique du polymorphisme de longueur de CR1. L'association entre le phénotypage des allotypes du polymorphisme de longueur de CR1 par western blot et le génotypage des allèles du polymorphisme de longueur de CR1 par PCR-HRM est

10 hautement concordante et statistiquement significative ($<10^{-4}$). Ainsi, le groupe F'F correspond au phénotype : CR1*1 (190 kDa) CR1*3 (160kDa), F correspond au phénotype : CR1*1 (190kDa), FS correspond au phénotype : CR1*1 (190kDa) CR1*2 (220kDa), S correspond au phénotype

15 : CR1*2 (220kDa) et T correspond au phénotype : CR1*2 (220kDa) CR1*4 (250kDa).

La présente invention est relative à une méthode de détermination du polymorphisme de longueur du récepteur CR1.

En effet, comme représenté sur la figure 1 jointe, le

20 récepteur CR1 présente quatre formes, ou allotypes, chacun de ces allotypes présentant une longueur différente, la différence entre les allotypes du récepteur CR1 se situant au niveau du polypeptide.

Plus particulièrement, il a déjà été évoqué plus haut que

25 les quatre allotypes de CR1 différaient par le nombre de structures LHR, ou domaines LHR, qui les composent.

Ainsi, les quatre allotypes du récepteur CR1 ont en commun de posséder, chacun, un domaine LHR A, un domaine LHR C, et un domaine LHR D.

30 Chacun des allotypes de CR1 comporte, en outre, un nombre n de domaine(s) LHR B, n étant un entier compris entre 0 et 3.

En effet, il est visible, sur la figure 1, que l'allotype CR1*1, qui correspond à la forme la plus fréquente de CR1, comporte un domaine LHR B. En d'autres termes, pour l'allotype

35 CR1*1, n est égal à 1.

L'allotype CR1*2 du récepteur CR1, qui a été déterminé comme étant l'allotype présent chez les individus susceptibles de développer une pathologie du type lupus érythémateux disséminé, maladie d'Alzheimer ou paludisme, comporte deux
5 domaines LHR B. Ainsi, pour CR1*2, n est égal à 2.

En ce qui concerne à présent les allotypes CR1*3 et 4, qui sont les allotypes les plus rares du récepteur CR1, ceux-ci comportent respectivement zéro et trois domaine(s) LHR B. Ainsi, pour l'allotype CR1*3, n est égal à 0, tandis que pour le CR1*4,
10 n est égal à 3.

Ainsi, de manière particulièrement originale, la méthode de détermination du polymorphisme de longueur du récepteur CR1 selon l'invention exploite, d'une part, cette différence du nombre de domaines LHR B entre les différents allotypes, et,
15 d'autre part, le fait que les différents domaines LHR présentent certains points communs, ou homologies.

De ce fait, ladite méthode comprend d'abord une première étape, dans laquelle on extrait du matériel génétique à partir d'un échantillon biologique prélevé sur un individu.

20 Le matériel génétique qui est extrait de l'individu chez lequel on souhaite déterminer le polymorphisme de longueur du récepteur CR1 consiste, de préférence, soit en de l'ADN (acide désoxyribonucléique), notamment de l'ADN génomique, soit en de l'ARNm (acide ribonucléique messager).

25 Dans le cas où le matériel génétique est constitué par de l'ARNm, celui-ci est rétrotranscrit en de l'ADN préalablement à l'étape d'amplification.

Avantageusement, on extrait le matériel génétique d'un échantillon biologique consistant en du sang, de la lymphe, de
30 l'urine, de la salive, un prélèvement par biopsie, des tissus, ou tout autre liquide biologique ou prélèvement biologique contenant des cellules et étant adéquat pour permettre une extraction de matériel génétique.

Ainsi, l'échantillon biologique peut également être de tout
35 autre type, par exemple des vestiges archéologiques.

L'étape d'extraction de matériel génétique peut être effectuée par les techniques classiquement utilisées par l'homme du métier et adaptées à cet effet.

En particulier, l'extraction de matériel génétique peut
5 être effectuée au moyen de kits commerciaux adaptés spécialement à cet effet.

Dans une deuxième étape de la méthode selon l'invention, on amplifie ledit matériel génétique extrait par l'intermédiaire d'un seul couple d'amorces.

10 Concernant l'amplification dudit matériel génétique, celle-ci est avantageusement réalisée par la technique classique de réaction de polymérisation en chaîne, abrégée PCR.

Pour en revenir audit couple d'amorces unique, celui-ci permet, à partir dudit matériel génétique, à la fois une
15 amplification d'un premier segment du domaine LHR B et une amplification d'un deuxième segment appartenant à au moins un autre des domaines du récepteur CR1.

En d'autres termes, ledit couple d'amorces permet également d'amplifier un segment du domaine LHR A, ou un segment du
20 domaine LHR C, ou un segment du domaine LHR D.

Il est également envisageable, dans un mode de réalisation particulier, que le couple d'amorces unique mis en œuvre dans la méthode selon l'invention permette l'amplification d'un segment qui est retrouvé dans plusieurs domaines LHR A, LHR C, ou LHR D.

25 Le segment du domaine LHR B qui est amplifié dans la méthode selon l'invention, avec ledit couple d'amorces, représente un variant caractéristique du LHR B, et est nommé « segment variant B ».

Le deuxième segment amplifié, appartenant à au moins un des
30 autres domaines LHR du récepteur CR1, est appelé « segment non variant ».

Les deux segments, variant B et non variant, sont amplifiés par les mêmes amorces, et présentent en dehors des zones des segments où les amorces s'apparient avec l'ADN pour initier
35 l'amplification, avantageusement au moins trois différences de nucléotides.

Plus préférentiellement encore, ledit segment variant B et ledit segment non variant présentent, en dehors des zones d'hybridation desdites amorces, au moins trois et au plus vingt différences de nucléotides, de préférence au moins trois et au plus quinze, et encore plus préférentiellement au moins trois et au plus dix différences de nucléotides.

Une telle caractéristique permet, dans une étape ultérieure, de déterminer, par l'utilisation d'un outil quantitatif adapté à cet effet :

- 10 - le nombre d'amplicons de segment variant B
- le nombre d'amplicons de segment non variant.

Le ratio entre le nombre d'amplicons de segment variant B et de segment non variant est déterminé (ratio variant B/non variant), et celui-ci est différent en fonction du polymorphisme de longueur du récepteur CR1.

En effet, le nombre d'amplicons de segment non variant ne change pas d'un individu à un autre. D'un autre côté, le nombre d'amplicon de segment variant B est modifié en fonction du ou des allotypes de CR1 exprimé(s) à la surface des cellules de l'individu dont est extrait le matériel de départ. Cela est dû au fait que le nombre de domaine(s) LHR B varie entre 0 et 3 en fonction que l'individu exprime le CR1*1, le CR1*2, le CR1*3, ou le CR1*4.

La méthode selon l'invention est donc, selon une démarche inventive, basée sur le fait que les deux types de segments amplifiés présentent des homologies de séquences, permettant l'appariement d'un seul couple d'amorces, tout en présentant un certain nombre de différences, pour que l'outil quantitatif permettent de discriminer les amplicons de segment variant B et les amplicons de segment non variant.

Dans un exemple tout particulièrement intéressant de la méthode de détermination du polymorphisme de longueur de CR1, le deuxième segment amplifié par le couple d'amorces, autrement dit le segment non variant, est un segment appartenant au domaine LHR C.

Dans un mode de réalisation préférentiel, le segment variant B et le segment non variant, qui appartient de préférence au domaine LHR C, présentent, en dehors des zones d'hybridation du couple d'amorces spécifiques, cinq différences
5 de nucléotides.

Cela permet, de manière avantageuse, d'une part, que les amorces s'apparient aux deux segments génomiques, c'est-à-dire le segment variant B et le segment non variant, par exemple du LHR C. D'autre part, les cinq différences de nucléotides
10 facilitent la détermination, au moyen de l'outil quantitatif choisi, du nombre d'amplicons de segment variant B et de segment non variant, par exemple du LHR C.

Tout préférentiellement, pour l'amplification des segments variant B et non variant du LHR C, on utilise une
15 amorce sens et une amorce antisens de séquences respectives SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:2 sur le listage de séquences.

Ces amorces sens et antisens, également référencées CN3 et CN3re respectivement, présentent plus particulièrement les séquences suivantes :

- 20 - SEQ ID NO:1 : 5' GGCCTTAGACTTCTCCTGC 3'
 - SEQ ID NO:2 : 5' GTTGACAAATTGGCGGCTTCG 3'

Le principe de ce mode réalisation particulier de la méthode de détection du polymorphisme de longueur décrit ici est de tirer parti de l'existence de cinq changements de nucléotides
25 dans un segment génomique du LHR B, représentant un variant caractéristique du LHR B (segment variant B), ce dernier étant un segment génomique homologue du LHR C (segment non variant).

Le segment variant B et le segment génomique du LHR C sont repris et alignés sur la figure 3 qui est annexée. Les cinq
30 changements de nucléotides entre ces deux segments sont mis en évidence sur cette figure. En outre, les zones d'hybridation des amorces CN3 et CN3re sont représentées par un encadré.

Si on amplifie les segments génomiques dans les domaines LHR B et LHR C selon les polymorphismes de longueur, le nombre
35 de copies des segments variants B et non variants sera différent

et le ratio segment variant B/segment non variant sera fonction du polymorphisme de longueur de CR1.

On entend par séquence homologues deux séquences qui ont un ancêtre commun ; l'homologie entre deux séquences se mesure par leur similarité, qui correspond au pourcentage d'identité ou de substitution entre lesdites deux séquences. Une similarité importante entre deux séquences est signe d'homologie.

Selon un mode de réalisation particulier, l'outil quantitatif avec lequel on déduit le ratio entre segment variant B et segment non variant est la technique par analyse des courbes de fusion à haute résolution, ou technique HRM (High Resolution Melting), appliquée aux amplicons obtenus lors de l'étape d'amplification.

En effet, deux individus différents, présentant chacun un polymorphisme de longueur du récepteur CR1 différent, ont, par définition, un ratio segment variant B/segment non variant différent. Par conséquent, ces deux individus vont présenter chacun un profil spécifique de courbe de fusion à haute résolution, en fonction du polymorphisme de longueur du récepteur CR1, et donc du ratio segment variant B/segment non variant.

Toutefois, tout autre outil quantitatif adapté peut être utilisé, comme les méthodes de PCR quantitative ou d'hybridation en temps réel.

Pour en revenir à la technique HRM, celle-ci permet notamment, de manière particulièrement fiable, de détecter un polymorphisme génétique, dans des échantillons d'ADN double brin. Avantageusement, au moyen de cette technique, il est possible de distinguer deux amplicons présentant une différence d'au moins un nucléotide.

Les amplicons obtenus lors de l'étape d'amplification sont dans un premier temps chauffés, de manière très progressive, par pas de température les plus fins possibles, afin d'obtenir des résultats les plus précis possibles.

Généralement, les amplicons sont chauffés progressivement entre une température de 50°C et une température de 95°C.

A une certaine température, les deux brins de la molécule d'ADN se séparent. Ce phénomène est appelée fusion de l'ADN.

Dans la technique HRM de fusion à haute résolution, le but est d'observer cette fusion en temps réel, grâce à l'utilisation d'agents intercalants. Ces agents sont fluorescents lorsqu'ils sont fixés à la molécule d'ADN double brin.

En l'absence d'ADN double brin, ces agents intercalants ne peuvent donc pas se fixer, et le niveau de fluorescence est très faible.

Lorsque l'on débute l'analyse par la technique HRM, les amplicons sont sous forme double brin. Un grand nombre de molécules d'agent intercalant peut alors se fixer à l'ADN, et l'intensité de la fluorescence est très importante.

Lorsque, au cours de l'analyse, la température est progressivement augmentée, les deux brins d'ADN des amplicons se séparent, et la fluorescence diminue.

On obtient alors une courbe de fusion de l'ADN, qui représente l'intensité de la fluorescence émise par les molécules d'agent intercalant, en fonction de la température à laquelle sont soumis les amplicons.

Les courbes de fusion, obtenues lors de la mise en œuvre de la méthode de caractérisation du polymorphisme de longueur du récepteur CR1, sont représentées sur la figure 4A ci-jointe.

Les changements dans la molécule d'ADN se traduisent par une variation dans la cinétique de fusion de l'ADN, cette variation pouvant être détectée du fait de la haute résolution utilisée.

Ainsi, sur la figure 4A, des profils de courbes différents sont observés, et ils correspondent à des individus présentant des allotypes différents du récepteur CR1 (F'F, F, FS, S et T).

La figure 4B montre un second mode de représentation des courbes, et l'on remarque également les différences entre les individus présentant des formes différentes du récepteur CR1.

Différentes études scientifiques ont démontré que les personnes qui expriment, à la surface de leurs cellules, la forme CR1*2 du récepteur CR1, sont plus susceptibles de

développer certaines pathologies, notamment la maladie d'Alzheimer, le lupus érythémateux disséminé, ou encore le paludisme.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable, qui touche le tissu cérébral, et entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales.

Pour ce qui est du lupus érythémateux disséminé, cette pathologie est d'origine autoimmune, et touche le tissu conjonctif.

Enfin, concernant le paludisme, il s'agit d'une maladie infectieuse causée par un parasite, appartenant au genre *Plasmodium*. Le paludisme est propagé par l'intermédiaire d'un moustique anophèle.

De récents résultats d'études scientifiques ont démontré que le parasite responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum*, était capable de se fixer sur les SCR n°1, 2 et 3 du récepteur CR1. Or, ces SCR présentent une très forte homologie avec les SCR 8, 9 et 10 du domaine LHR B du récepteur CR1. Il en résulte qu'il est probable que l'allotype CR1*2 du récepteur CR1 soit un facteur de risque pour le développement du paludisme.

En conséquence, la méthode de caractérisation du polymorphisme de longueur du récepteur CR1 permet de mettre en évidence les individus porteurs de la forme CR1*2. Ces derniers ont plus de risques de développer l'une ou l'autre de ces maladies.

Un diagnostic précoce et rapide de cette susceptibilité à la maladie d'Alzheimer, au lupus érythémateux disséminé, ou encore au paludisme permet de proposer aux personnes concernées un traitement adapté dans les meilleurs délais.

La méthode selon l'invention est donc particulièrement avantageuse, et elle peut être mise en œuvre aisément sur un grand nombre d'individus, afin d'obtenir des résultats rapidement.

L'exemple 1 ci-dessous est destiné à illustrer un mode de réalisation particulièrement préférentiel de la méthode de détermination du polymorphisme de CR1 selon l'invention. Cet

exemple ne doit toutefois pas être considéré comme étant limitatif de l'invention.

Exemple 1 : Caractérisation du polymorphisme de longueur du récepteur CR1 par amplification du segment variant de LHR B et du segment non variant de LHR C et analyse HRM

Les amorces CN3 et CN3re, de SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:2 respectivement ont été synthétisées par la société Eurogentec (Seraing, Belgique).

Ces amorces permettent d'amplifier les segments génomiques représentés sur la figure 3, correspondant au segment variant B et au segment non variant du domaine LHR C.

Pour amplifier ces segments, la réaction d'amplification a été effectuée sur du matériel génétique extrait de cinq individu, par PCR, dans un volume total de 20 µL, utilisant :

- 10 µL de « LightCycler 480 High Resolution Melting Master Mix 2X concentré » (Roche, Meylan, France) ;
- 2 µL de MgCl₂ (25 mM),
- 1 µL d'amorce CN3 de SEQ ID NO:1 concentrée à 300 nmol/L,
- 1 µL d'amorce CN3re de SEQ ID NO:2 concentrée à 300 nmol/L,
- 5 µL d'eau, et
- 10 ng d'ADN génomique.

Les réactions de PCR sont réalisées à l'aide de plaques de 96-puits "LightCycler 480 multiwell Plate 96, white" (Roche, Meylan, France) selon le protocole d'amplification suivant:

- un cycle à 95°C pendant 10 minutes,
- 45 cycles à 95°C pendant 10 secondes, à 62°C pendant 15 secondes, et à 72°C pendant 20 secondes.

La fusion à haute résolution (*High Resolution Melting* ou *HRM*) des amplicons obtenus lors de l'étape de PCR est réalisée à l'aide de l'appareil "LightCycler 480 System" (Roche, Meylan, France) et permet de mettre en évidence des profils de courbe de fusion qui correspondent aux allotypes du polymorphisme de longueur de CR1.

Ces profils de courbes de fusion sont visibles sur les figures 4A et 4B, correspondant à deux modes de représentation différents desdites courbes. Le logiciel de l'appareil permettant la réalisation de la PCR HRM permet le passage de
5 l'une à l'autre représentation. Il permet ainsi de réaliser le graphique différentiel des courbes normalisées, visible sur la figure 4B, pour le bruit de fond, la fluorescence finale, et la température de fusion finale.

Les résultats qui ont été obtenus par la méthode selon
10 l'invention ont été comparés aux résultats obtenus lors de la mise en œuvre de la technique classique de détermination du polymorphisme du CR1 par western blot. Cela est illustré sur la figure 4C.

La présente méthode de détection du polymorphisme de CR1,
15 par amplification PCR suivie d'une détermination des températures de fusion des amplicons obtenus par HRM, présente des résultats concordants avec la technique traditionnelle d'analyse protéique par western blot.

En outre, la méthode selon l'invention permet l'obtention
20 des résultats de manière particulièrement rapide, en comparaison avec la technique traditionnelle.

REVENDECATIONS

1. Méthode de détermination du polymorphisme de longueur du récepteur CR1, celui-ci comprenant un domaine LHR (Long Homologous Repeat) A, un domaine LHR C et un domaine LHR D, ledit récepteur CR1 comportant en outre n domaine LHR B, avec n correspondant à un nombre entier compris entre 0 et 3, ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

- on extrait du matériel génétique à partir d'un échantillon biologique prélevé sur un individu ;
- à partir dudit matériel génétique, on amplifie, grâce à un seul couple d'amorces spécifiques, un premier segment du domaine LHR B, représentant un variant caractéristique du LHR B, nommé segment variant B, et un deuxième segment appartenant à au moins un domaine, ledit domaine étant choisi parmi les domaines LHR A, LHR C et LHR D, ledit deuxième segment étant nommé segment non variant, ledit segment variant B et ledit segment non variant présentant, en dehors des zones d'hybridation desdites amorces, au moins trois différences de nucléotides ;
- on déduit, en utilisant un outil quantitatif, le nombre d'amplicons de segment variant B et le nombre d'amplicons de segment non variant, le ratio variant B/non variant étant différent en fonction du polymorphisme de longueur du récepteur CR1.

2. Méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon la revendication 1 caractérisée en ce que le deuxième segment, ou segment non variant, est un segment du domaine LHR C.

3. Méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que ledit segment variant B et ledit segment non variant présentent, en dehors des zones d'hybridation desdites amorces, au moins trois et au plus vingt, de préférence

au moins trois et au plus quinze, de préférence au moins trois et au plus dix différences de nucléotides.

4.Méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon l'une quelconque des revendications précédentes
5 caractérisée en ce que ledit segment variant B et ledit segment non variant présentent, en dehors des zones d'hybridation desdites amorces, 5 différences de nucléotides.

5.Méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon l'une quelconque des revendications précédentes
10 caractérisée en ce que l'on amplifie le segment variant B et le segment non variant avec un couple d'amorces comprenant une amorce sens de SEQ ID NO:1 et une amorce antisens SEQ ID NO:2.

6.Méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon l'une quelconque des revendications précédentes
15 caractérisée en ce que l'outil quantitatif permettant de déduire le ratio variant B/non variant est la technique par analyse des courbes de fusion à haute résolution ou HRM (High Resolution Melting) des amplicons obtenus lors de l'étape d'amplification.

7.Utilisation de la méthode de détermination du polymorphisme
20 du récepteur CR1 selon l'une quelconque des revendications précédentes pour diagnostiquer la présence de l'allotype CR1*2 du récepteur CR1 à la surface des cellules chez un individu.

8.Utilisation de la méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon l'une des revendications 1 à 6 pour
25 diagnostiquer la susceptibilité d'un individu à développer un lupus érythémateux disséminé.

9.Utilisation de la méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon l'une des revendications 1 à 6 pour diagnostiquer la susceptibilité d'un individu à développer la
30 maladie d'Alzheimer.

10. Utilisation de la méthode de détermination du polymorphisme du récepteur CR1 selon l'une des revendications 1 à 6 pour diagnostiquer la susceptibilité d'un individu à développer le paludisme.

ABREGEMéthode de détermination du polymorphisme de longueur du récepteur CR1

5

L'invention concerne une méthode de détermination du polymorphisme de longueur du récepteur CR1, celui-ci comprenant trois domaines, LHR A, LHR C et LHR D, et n domaine LHR B, avec n un entier entre 0 et 3.

10

A partir de matériel génétique, on amplifie, grâce à un seul couple d'amorces spécifiques, un premier segment du domaine LHR B (segment variant B) et un deuxième segment appartenant à au moins un autre domaine, (segment non variant), ledit segment variant B et ledit segment non variant présentant, en dehors des zones d'hybridation desdites amorces, au moins trois différences de nucléotides.

15

On déduit, en utilisant un outil quantitatif, le nombre d'amplicons de segment variant B et de segment non variant, le ratio variant B/non variant étant différent en fonction du polymorphisme de longueur du récepteur CR1.

20

Figure 4

25

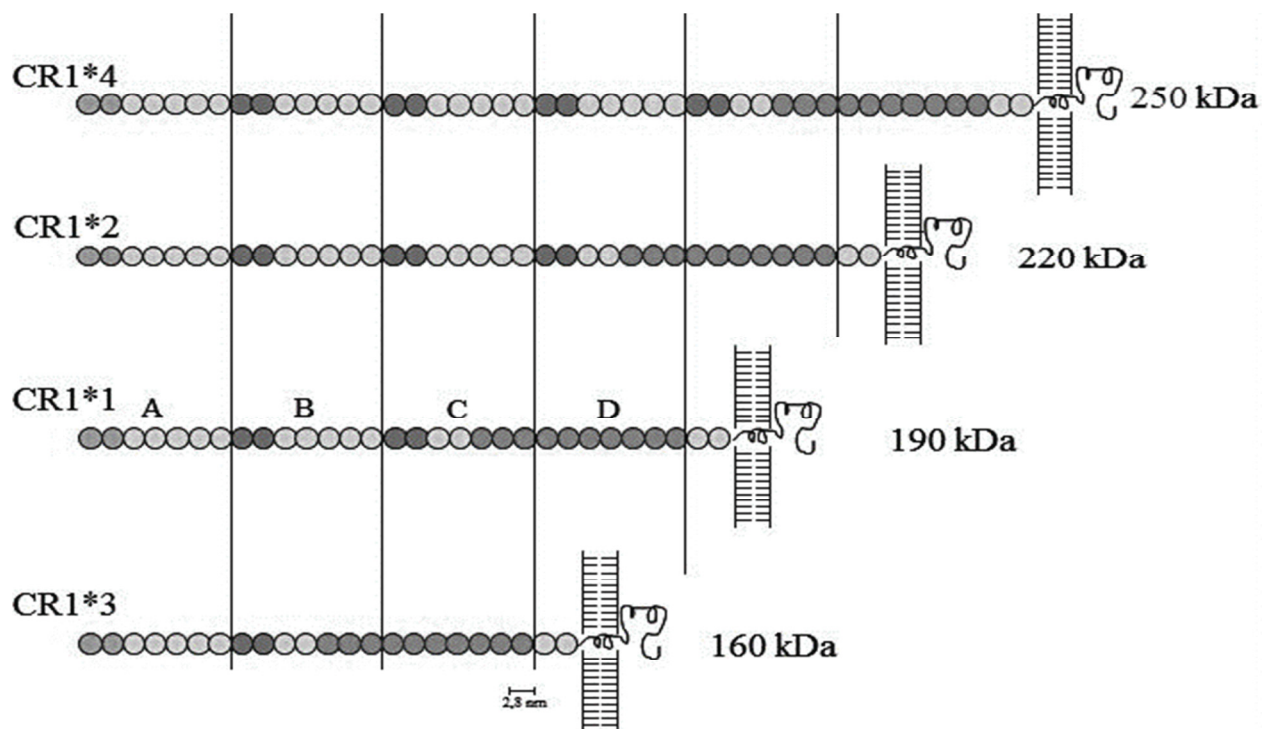


FIG. 1

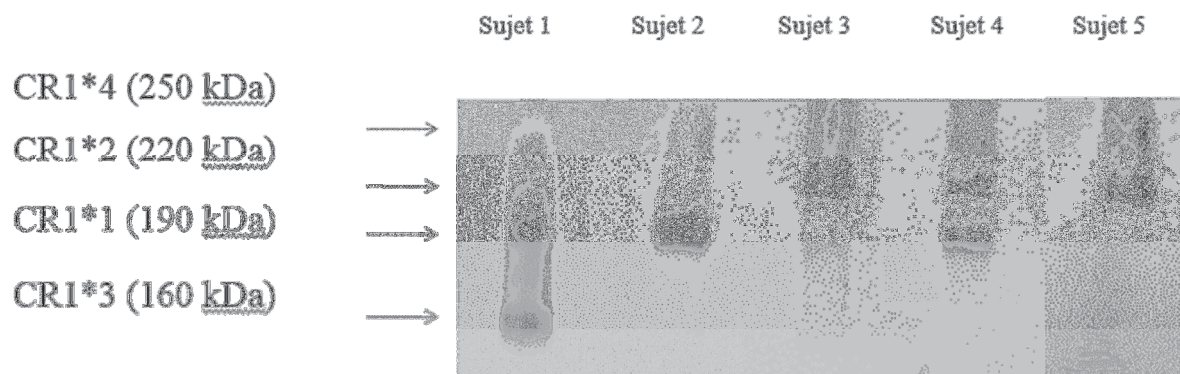


FIG. 2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
329 bits(178)	4e-87()	191/197(97%)	1/197(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Non variant 1		GGCCTTAGACTTCTCCTGCATTGTAATCCCTCTGGTTTGCCACATATGCATGCTGTCAGG			60
Variant B 84358		GGCCTTAGACTTCTCCTGCATTGTAATCCTTCTGGTTTGCCACATATGCATGCTGTCAGG			84417
Non variant 61		AAGTTGATGAGGTATGTACAGCACAATTTATTTTCCATTTTTCCTTTAGGCACCGACT			120
Variant B 84418		AAGTTGATGAGGTATGTACAGGACAA-TGATTTTCCATTTTTCCTTTAGGCACCGACT			84476
Non variant 121		CATTGGTCACTCATCTGCTGAATGTATCCTCTCGGGCAATGCTGCCCATTGGAGCACGAA			180
Variant B 84477		CATTGGTCACTCATCTGCTGAATGTATCCTCTCAGGCAATACTGCCCATTGGAGCA			84536
Non variant 181		GCCGCCAATTTGTCAAC			197
Variant B 84537		GCCGCCAATTTGTCAAC			84553

FIG. 3

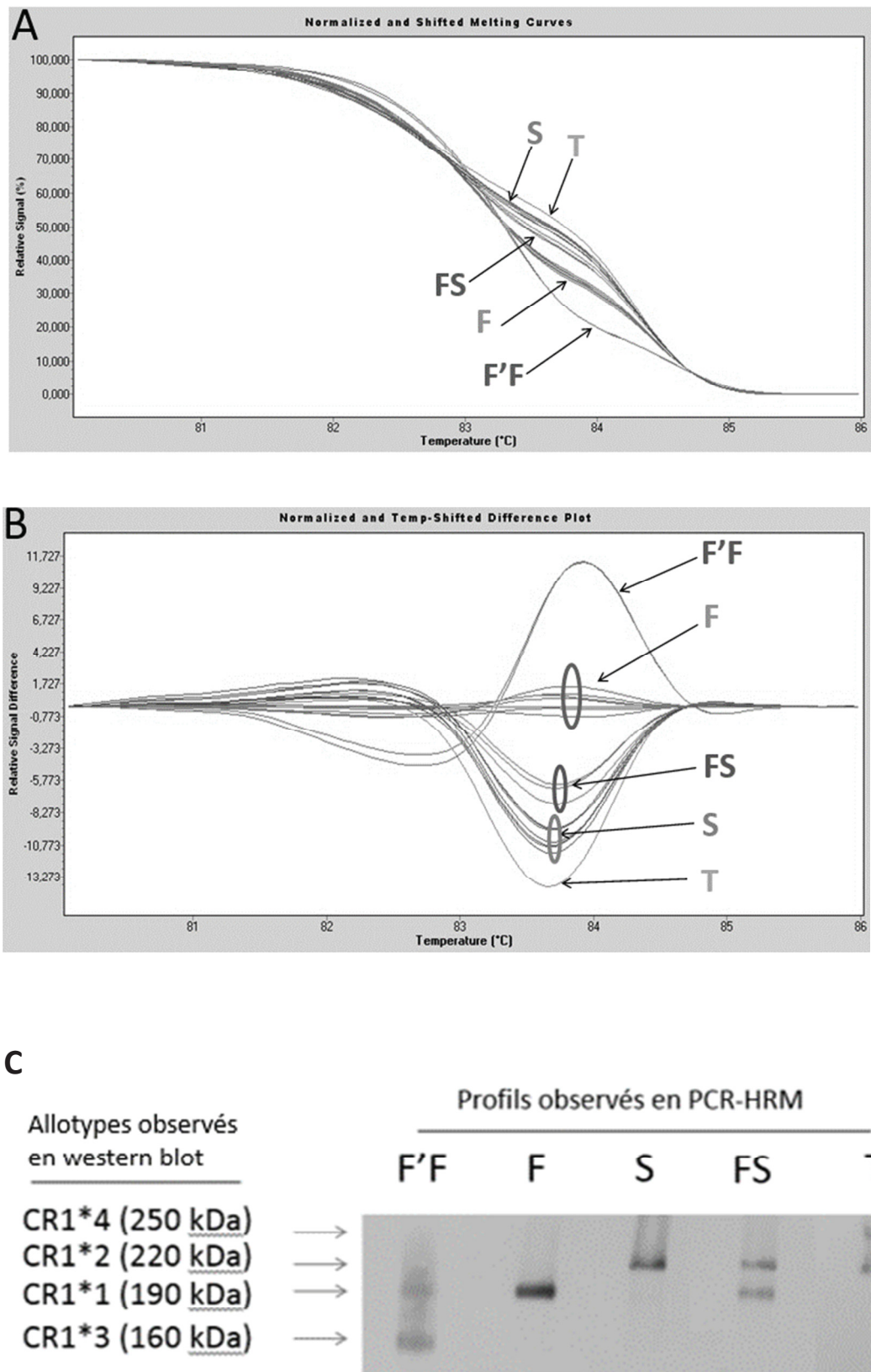


FIG. 4

Discussion générale

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative dont l'étiologie n'est pas encore élucidée, dépendant à la fois de facteurs génétiques et environnementaux. Les études génétiques ont montré que le déterminisme de la MA est multiple : si certaines formes à début précoce sont directement liées à des mutations sur des gènes obéissant à un mode de transmission mendélien classique, le rôle d'autres facteurs de risques génétiques comme le *CR1* est à présent bien établi dans les formes sporadiques de la maladie qui représentent l'immense majorité des cas. Ce facteur de risque génétique exerce son effet en interaction avec d'autres gènes, dont certains restent à découvrir. La maladie n'apparaissant que lorsqu'un seuil de vulnérabilité, dû à l'action conjointe de ces différents facteurs, est atteint. Les études génétiques ont permis d'élaborer une première ébauche de vision intégrée du processus morbide, connue sous le nom de « la théorie de la cascade amyloïdergique » ou « théorie de la cascade amyloïde ». Dans sa formulation initiale, cette théorie considérait que le *primum movens* de la MA était l'accumulation d'A β fibrillaire au sein des plaques « séniles », sous l'effet de plusieurs facteurs pouvant différer selon les individus (surproduction de peptide A β dans les formes autosomiques dominantes, fibrillogénèse accrue voire défaut d'épuration ou de clairance des amas fibrillaires dû à des facteurs génétiques). Ces amas fibrillaires contenus dans les plaques amyloïdes présentent une toxicité neuronale, qui se traduirait notamment par la phosphorylation anormale des protéines tau et la survenue, à terme, de dégénérescence neurofibrillaire et lésions dont la présence est étroitement corrélée au processus de mort neuronale (El Kadmiri et *al.*, 2013 ; Hardy & Selkoe, 2002 ; Yankner, 1996).

L'originalité de notre étude consistait en la combinaison de données phénotypiques et de données génotypiques des polymorphismes de CR1 dans une cohorte bien caractérisée de patients atteints de MA et de sujets témoins. Le CR1 permet non seulement la capture des complexes immuns dans la circulation, mais également l'inactivation du complément en liant les fragments C3b et C4b, en dissociant les convertases classiques et alternes, et en agissant comme cofacteur du facteur I qui arrête ainsi l'amplification par la boucle du C3 (Rogers et *al.*, 2006). Chez l'homme, 90% de la quantité circulante totale de CR1 se trouve au niveau des érythrocytes, facilitant ainsi la clairance des fragments C3b- ou C4b- liés aux

microorganismes ou aux complexes immuns (Rogers et *al.*, 2006 ; Taylor et *al.*, 1997). En effet, ces complexes liés au CR1 sont ensuite emmenés dans les organes d'épuration (rate et foie) où ils sont transférés aux cellules du système des phagocytes mononucléés, sans dommage pour l'érythrocyte qui repart dans la circulation (Cornacoff et *al.*, 1983; Cosio et *al.*, 1990b ; Schifferli et *al.*, 1988). Il en résulte qu'en limitant les dépôts de C3b et C4b, le CR1 pourrait atténuer l'activation excessive du complément. Par conséquent, l'expression de CR1 au niveau des érythrocytes est considérée comme un élément essentiel dans la protection des tissus comme le cerveau contre les dépôts de complexes immuns et les maladies subséquentes. Ainsi, une densité anormalement basse de CR1 sur les érythrocytes, indépendamment des facteurs génétiques ou acquis, a été identifiée comme une des caractéristiques de certaines maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (LES) (Cohen et *al.*, 1992).

Par ailleurs, Brouwers et *al.* (2012) ont montré que l'association du risque de MA avec CR1 pouvait s'expliquer par la présence de l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]). Dans notre étude, nous avons montré que l'isoforme CR1*2 était exprimé chez les patients atteints de MA mais à une densité plus basse comparée à l'isoforme CR1*1. Ces données ont été obtenues par l'étude de la densité de CR1 sur les érythrocytes selon le polymorphisme de longueur, en utilisant deux méthodes différentes renforçant ainsi la validité de notre approche technique.

Bien que l'association entre la MA et le gène *CR1* a maintenant été largement établie, les mécanismes sous-jacents à cette association restent à élucider (Carrasquillo et *al.*, 2010 ; Chen et *al.*, 2012 ; Chung et *al.*, 2014 ; Corneveaux et *al.*, 2010 ; Hazrati et *al.*, 2012 ; Jin et *al.*, 2012 ; Jun et *al.*, 2010 ; Lambert et *al.*, 2009 ; Ma et *al.*, 2014 ; Naj et *al.*, 2011 ; Schjeide et *al.*, 2011 ; Wijsman et *al.*, 2011 ; Zhang et *al.*, 2010). A ce jour, seules deux études se sont intéressées à l'implication potentielle de la protéine CR1 dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer.

Dans ce sens, il a été proposé que chez les patients atteints de MA, le processus inflammatoire serait associé à la formation des plaques d'A β , qui peut être causée soit par une augmentation des dépôts de micro fibrilles soit par une déficience de l'épuration (clairance) des plaques d'A β , ce qui entraînerait un effet nocif sur les cellules voisines (Crehan et *al.*, 2012).

En effet, il est établi que le peptide $A\beta_{1-42}$ des plaques amyloïdes active le système du complément d'une manière indépendante des anticorps, résultant en la liaison de C3b sur le peptide $A\beta_{1-42}$ (Rogers et *al.*, 1992 ; Rogers et *al.*, 2006). Comme des études précédentes ont montré que la clairance du peptide $A\beta_{1-42}$ présent dans la circulation sanguine dépendait du CR1 érythrocytaire, certains auteurs ont émis l'hypothèse que CR1, grâce à ses sites de liaisons C3b, serait impliqué dans la clairance des complexes C3b- peptide $A\beta_{1-42}$ au niveau cérébral comme au niveau de la circulation sanguine (Chibnik et *al.*, 2011; Rogers et *al.*, 2006; Webster et *al.*, 1997). Par conséquent, le polymorphisme structural ou de longueur de CR1, en raison du nombre de sites de liaison C3b qui varie en fonction de l'isoforme de CR1, pourrait jouer un rôle potentiel dans le processus physiopathologique de la MA. Selon cette hypothèse, l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]) qui contient un site de liaison supplémentaire pour C3b (trois sites de liaison C3b au lieu de deux sites, comme c'est le cas pour l'isoforme le plus commun CR1*1 [F]) aurait un effet protecteur contre le risque de développer la MA. Cependant, l'étude de Brouwers et *al.* (2012) contredisait cette hypothèse. En effet, les auteurs ont montré dans deux cohortes (la première belge constituée de 1883 sujets et la seconde française constituée de 2003 sujets) que le risque de développer la MA était associé à l'isoforme CR1*2, et que ce risque était estimé à 30% chez les sujets exprimant l'isoforme long de CR1 (CR1*2 [S]). En l'occurrence, il n'existait aucune association entre l'isoforme CR1*2 et le taux de peptides $A\beta_{1-42}$ dans le LCR.

Brouwers et *al.* (2012) expliquaient l'absence d'association entre l'isoforme CR1*2 et le taux d' $A\beta_{1-42}$ dans le LCR par le fait que, dans son étude, il s'agissait du peptide $A\beta_{1-42}$ soluble, alors que l'isoforme CR1*2 pouvait n'affecter que les peptides $A\beta_{1-42}$ agrégés (Bradt et *al.*, 1998 ; Webster et *al.*, 1997). Néanmoins, cette étude apportait une preuve supplémentaire associant les variants de CR1 au peptide $A\beta_{1-42}$, indiquant que CR1 aurait un rôle dans la pathogénèse de la MA via la voie amyloïde. En l'occurrence, les auteurs expliquaient leurs résultats (association entre isoforme CR1*2 et MA), par le fait que le rôle du complément, dans ce cas loin d'être pathogène, pourrait avoir un rôle neuroprotecteur, à savoir la clairance des peptides $A\beta$ agrégés au niveau cérébral. Par conséquent, un excès d'inhibition du système du complément par les allotypes les plus longs de CR1 (CR1*2 [S] et CR1*4 [T]) conférerait un risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer. Une des raisons possibles pourrait être le fait que le fragment C3b, en opsonisant le peptide $A\beta_{1-42}$ faciliterait sa clairance (Brouwers et *al.*, 2012). Selon ce scénario, les auteurs suggéraient que

les allotypes les plus longs de CR1 puissent augmenter le risque de développer la MA du fait de leur inhibition excessive du fragment C3b du complément, entraînant ainsi une diminution de l'opsonisation du peptide A β ₁₋₄₂ par C3b. Ainsi ces résultats seraient en accord avec ceux démontrés dans des modèles murins de MA, où il existait une corrélation entre inhibition de l'activation du complément et augmentation de dépôts de plaques A β et perte neuronale (Crehan et *al.*, 2013 ; Maier et *al.*, 2008 ; Wyss-Coray et *al.*, 2002). En effet, Wyss-Coray et *al.* (2002) ont montré que l'inhibition de l'activation du complément chez un modèle de souris transgénique, entraînait une augmentation des lésions caractéristiques de la MA (dépôts amyloïdes et neurodégénérescence). Les auteurs concluaient que les produits d'activation du complément pouvait protéger contre la neurotoxicité induite par les peptides A β , et pouvait de ce fait, réduire ou promouvoir la clairance des peptides A β et la dégénérescence neuronale. Leurs résultats appuyaient le concept que certains mécanismes inflammatoires de défense dans le cerveau pourraient être bénéfiques dans les maladies neurodégénératives. Dans le même sens, Maier et *al.* (2008) ont montré qu'une déficience en C3 chez des souris transgéniques (APP/C3 [-/-]) entraînait non seulement une accélération des dépôts amyloïdes et de la dégénérescence neurofibrillaire, mais également une augmentation des peptides A β dans le plasma et une activation différentielle des cellules microgliales vers des phénotypes alternatifs (augmentation des IL4, IL8, et TNF...), suggérant un rôle bénéfique du complément (C3) dans la clairance des plaques amyloïdes et dans la modulation des phénotypes des cellules gliales. Toujours dans le même sens, Crehan et *al.* (2013) ont montré chez le rongeur que les cellules microgliales présentaient un phénotype activé avec une expression élevée de CR1, que l'activation du CR1 microgliale était préjudiciable pour les neurones et que ceci était en corrélation avec une augmentation de la production de superoxyde intracellulaire microgliale, de TNF- α et IL- β . Par ailleurs, le blocage de CR1 empêchait l'activation des cellules microgliales, via la suppression du clivage de C3b en C3bi, suggérant également un rôle bénéfique de l'inflammation.

D'autres travaux ont montré que l'activation du complément pouvait entraîner une réaction immunitaire puissante, qui aurait un effet délétère sur les neurones, et que dans cette optique, une inhibition de l'activation du complément, notamment via la voie classique du complément, pourrait avoir un effet bénéfique (Fonseca et *al.*, 2004 ; Zhou et *al.*, 2008). C'est le cas d'abord de Fonseca et *al.* (2004), qui ont utilisé un modèle murin déficient en C1q (APP/C1q/-/-). Ces auteurs ont montré que, malgré le fait que les concentrations de peptides

A β totaux et fibrillaires étaient identiques chez les souris déficientes en C1q (APP/C1q^{-/-}) et les souris non déficientes en C1q (souris APP), le nombre de cellules gliales activées entourant le peptide A β était significativement plus bas chez les souris (APP/C1q^{-/-}). Les auteurs suggéraient que le C1q puisse exercer un effet néfaste sur les neurones, probablement par activation du système du complément et ses conséquences sur la neuroinflammation. Par ailleurs, Zhou et *al.* (2008) ont montré que chez les souris transgéniques (APP/C1q^{+/+}), les protéines C3 et C4 du complément augmentaient avec l'âge et l'importance des dépôts amyloïdes fibrillaires. De plus, alors que C4 était principalement détecté au niveau des plaques amyloïdes et/ou associé aux oligodendrocytes chez les souris (APP/C1q^{+/+}), très peu de C4 était détecté chez les souris (APP/C1q^{-/-}), du fait de la non activation de la voie du complément liée à l'absence de C1q. En revanche, les plaques amyloïdes et le C3 étaient plus détectés chez les souris (APP/C1q^{-/-}), suggérant l'activation d'une voie alternative du complément. D'autre part, l'augmentation des concentrations de C3 chez les souris (APP/C1q^{-/-}) était associée à une diminution des éléments neuropathologiques caractéristiques de la MA. Les auteurs proposaient que l'activation de la voie du complément puisse avoir aussi bien un rôle protecteur que délétère dans la pathogénèse de la MA.

Inversement aux résultats de Brouwers et *al.* (2012), Hazrati et *al.* (2012) ont démontré qu'au niveau cérébral, l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]) s'exprimait à des taux inférieurs à ceux de l'isoforme CR1*1 (CR1 [F]), chez des patients atteints de MA par rapport à des témoins. Ils proposaient, de ce fait, que l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]) puisse être associé à une augmentation de l'activation du complément. Ces auteurs ont également montré que chez les cas, la présence de l'isoforme CR1*2 (CR1[S]) était associée à un stade plus évolué de la MA (stade V-VI de Braak et Braak, versus stade IV chez les sujets exprimant l'isoforme CR1*1 [F]). De plus, ces auteurs ont montré que la distribution de CR1 était différente selon le génotype : les sujets génotypés FF présentaient un profil filiforme, alors que les sujets FS présentaient un profil vésiculaire. Enfin, le double marquage (CR1, C3b), montrait que chez les sujets atteints de MA génotypés FS, le CR1 était dans le compartiment lysosomal. Les auteurs suggéraient donc que l'isoforme CR1*1 (CR1 [F]) pourrait être transporté entre les compartiments de tri des protéines, c'est-à-dire le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, alors que l'isoforme le plus long CR1*2 (CR1*2 [S]) s'accumulerait dans les membranes des vésicules cytoplasmiques. Par ailleurs, les marqueurs du système du complément (C1, C3b et C4b) montraient un marquage massif au niveau des plaques et DNF,

ainsi qu'au niveau des cellules microgliales et des astrocytes chez tous les sujets atteints de MA, quel que soit le génotype.

Dans ce sens, nos résultats fourniraient une explication aux études précédemment citées et qui sont en apparence contradictoires (Brouwers et *al.*, 2012, Hazrati et *al.*, 2012). Ainsi, même si l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]) est considéré comme un inhibiteur plus puissant ou plus efficace de la réaction inflammatoire via une meilleure interaction avec les fragments C3b grâce à la présence d'un site de liaison supplémentaire C3b, conséquence d'un nombre plus élevé de LHR (cinq) par rapport à l'isoforme le plus commun CR1*1 (CR1[F]) (quatre LHR), la densité basse (faible expression) de l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]) pourrait inverser cette propriété en une fonction altérée de CR1. D'une part, cette altération fonctionnelle de CR1 pourrait conduire à une altération de la clairance des fragments C3b liés, entraînant ainsi une épuration insuffisante des peptides A β au niveau des plaques amyloïdes. D'autre part, cette altération fonctionnelle de CR1 pourrait conduire à un contrôle limité de l'inflammation induite par les dépôts de peptides A β ₁₋₄₂ et une augmentation de l'activation de la voie du complément ce qui entraînerait un effet nocif sur les cellules voisines.

Dans notre étude, les polymorphismes de longueur de CR1 ont été étudiés aussi bien au niveau du gène (génotype) qu'au niveau de la protéine (phénotype), par deux méthodes différentes. La technique d'analyse par western blot est la technique originelle qui permet d'identifier les différents polymorphismes de longueur de CR1 au niveau de la protéine. Toutefois, cette technique d'analyse présente un certain nombre d'inconvénients. En particulier, l'analyse protéique par western blot ne peut être effectuée qu'après extraction des membranes cellulaires. De ce fait, elle est lourde à réaliser et très chronophage. En effet, une telle manipulation nécessite environ deux jours de travail. En outre, cette technique nécessite d'obtenir du matériel vivant et en bon état en début de procédure pour avoir des résultats exploitables. Il était donc important de proposer une autre méthode de détermination des polymorphismes de longueur de CR1 à partir du gène *CR1*, méthode qui soit à la fois simple, rapide et fiable. Jusqu'à présent, les techniques d'amplification ou d'hybridation segmentaire par biologie moléculaire n'avait jamais permis d'obtenir des résultats satisfaisants permettant la détermination des polymorphismes de longueur de CR1. Cela pourrait s'expliquer notamment par le fait que les segments du gène *CR1* présentent un caractère extrêmement répétitif. Dans ce sens, nous avons donc mis en place une nouvelle technique permettant de

déterminer les polymorphismes de longueur de CR1 à partir du gène. Cette technique d'analyse des courbes de fusion à haute résolution ou HRM (High Resolution Melting) comporte de nombreux avantages. D'une part, les polymorphismes de longueur de CR1 sont déterminés plus rapidement puisque les résultats sont obtenus en deux heures environ, une fois l'extraction du matériel génétique effectuée. A l'inverse, la technique biochimique traditionnelle, reposant sur une analyse protéique par western blot, nécessite des étapes qui sont relativement longues : une électrophorèse d'extraits membranaires cellulaires à travers un gel d'acrylamide, une étape de transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose ou de polyvinylidène (PVDF) et une étape d'identification des allotypes du récepteur CR1 par immunochimiluminescence. D'autre part, cette technique d'analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM) présente également l'avantage de ne pas être trop onéreuse, ce qui est particulièrement important pour une méthode que l'on souhaite appliquer à un grand nombre d'individus afin de déterminer leur susceptibilité à développer certaines pathologies. Dans notre étude, les polymorphismes de longueur de CR1 au niveau du gène et de la protéine étaient concordants chez 98,9% des sujets inclus. Les deux résultats discordants obtenus lors de la comparaison des polymorphismes de longueur obtenus par HRM (génotype) et des polymorphismes de longueur obtenus par WB (phénotype) correspondaient à des sujets présentant un profil FS à l'HRM (gène) mais exprimant uniquement l'isoforme CR1*1 à la surface de l'érythrocyte au WB (protéine). L'absence d'expression de l'isoforme CR1*2 était reproductible quand le WB était réalisé avec un temps d'exposition plus long. L'existence d'un allèle *CR1* silencieux (CR1*2 dans notre étude) pourrait expliquer ces deux résultats discordants entre gène et protéine (Helgeson et *al.*, 1970). Néanmoins, d'autres études sur des populations plus importantes sont nécessaires pour étayer cette hypothèse.

Par ailleurs, la manière avec laquelle le gène *CR1*, identifié par les études d'association pangénomiques (GWAS) comme gène de susceptibilité à la MA sur la base des deux SNPs non codants (rs6656401 et rs3818361), est en relation avec les mécanismes physiopathologiques de la MA reste inconnue. Récemment, d'une part Biffi et *al.* (2012) ont montré que rs6656401 influençait la sévérité des dépôts amyloïdes vasculaires (angiopathie amyloïde cérébrale). D'autre part, Thambisetty et *al.* (2013) ont montré qu'au niveau cérébral, rs3818361 était associé à une faible charge amyloïde fibrillaire, évaluée à l'aide du 11 C Pittsburgh Compound B, soulignant l'implication potentielle de *CR1* dans la voie amyloïde cérébrale. Gandy et *al.* (2013) expliquaient que cette association était probablement liée au

fait que CR1 atténué en densité, entraînerait une augmentation de l'inflammation qui serait hypertoxique pour les neurones voisins, et que probablement ces plaques hyperinflammées seraient également hyperlytiques pour les plaques amyloïdes fibrillaires, ce qui expliquerait le manque de détection des plaques amyloïdes fibrillaires par le C¹¹-PiB. Dans notre étude, rs6656401 et rs3818361 étaient fortement associés à l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]) au niveau du gène et au niveau de la protéine, aussi bien chez les patients atteints de MA que chez les témoins. Nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude ayant montré qu'un autre SNP, rs4844610, était associé à l'allèle *CR1* codant l'isoforme CR1*2 (CR1 [S]) (Hazrati et *al.*, 2012). Prises ensemble, ces données parviennent à la même conclusion, à savoir que le polymorphisme de longueur de CR1 (isoforme CR1*2 [S]) est le phénotype le plus probable de l'association entre *CR1* et MA, établie par les GWAS.

Concernant l'implication potentielle des polymorphismes de densité de CR1 dans la MA, aucune autre étude que la nôtre n'a été réalisée à ce jour. Dans notre étude, d'une part la concordance entre les deux génotypes (sites *HindIII* et Q981H) était excellente, aussi bien pour les cas que pour les témoins, et d'autre part la présence de l'allèle H pour *HindIII* ou de l'allèle Q pour Q981H était associée à une densité plus élevée comparée respectivement à l'allèle L pour *HindIII* ou l'allèle H pour Q981H, aussi bien chez les cas que chez les témoins. Ces données suggèrent que les critères ou influences génétiques sont respectées (allèle H de *HindIII* et allèle Q de Q981H associés à une densité haute). En l'occurrence, la présence de l'allèle H pour *HindIII* (sujets génotypés HH ou sujets HH +HL) ou de l'allèle Q pour Q981H (sujets génotypés QQ ou sujets QQ+ QH) était associée à une densité plus basse chez les cas comparée à celle des témoins. Ceci pourrait être expliqué par l'intervention de facteurs autres que génétiques dans le risque de développer la MA, à savoir des facteurs acquis et/ou environnementaux. En effet, les patients atteints de MA exprimaient une densité plus basse quand ils étaient génotypés HH pour le site *HindIII* ou QQ pour le site Q981H, par rapport aux témoins. Ceci suggère que le phénotype (densité) serait acquis au cours de la MA, bien que cette hypothèse nécessite d'être étayée par d'autres études indépendantes à plus grande échelle. Par ailleurs, cette observation (densité plus basse chez les sujets porteurs du génotype densité haute : H pour *HindIII* et Q pour Q981H) était plus visible chez les sujets homozygotes pour l'allèle codant pour une densité haute, ce qui n'était pas le cas quand on comparait la densité de CR1 chez les sujets génotypés LL pour *HindIII* ou HH pour Q981H. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'écart de densité chez les porteurs d'un allèle

codant pour une densité basse de CR1 ne soit détectable alors que cet écart est plus facilement visible quand un sujet est porteur d'un allèle codant pour une densité haute alors qu'il exprime une densité basse. Nos résultats pourraient donc être expliqués par l'existence d'un facteur génotypique « classique » et d'un facteur phénotypique « observé ».

Néanmoins, et bien qu'il n'existe aucune association entre polymorphismes de longueur et polymorphismes de densité de CR1, nos résultats vont dans le même sens que ceux que nous avons retrouvés concernant l'étude du polymorphisme de longueur. Pour expliquer cela, il existe deux hypothèses :

D'après Crehan et *al.* (2012), l'expression de l'allèle H ou L de CR1 serait en déséquilibre de liaison avec la structure allélique du gène *CR1*, ce qui expliquerait les différences de taille des fragments après digestion par *HindIII* par exemple. Cela serait fonctionnellement important, car impliquerait que les allotypes les plus longs de CR1 (CR1*2 [S] et CR1*4 [T]) auraient non seulement plus de sites de liaisons pour les fragments C3b et C4b du complément, mais également une dégradation plus lente (demi vie plus longue) que les allotypes les plus courts de CR1 (CR1*1 [F]). Ces deux facteurs augmenteraient ainsi la capacité de liaison aux fragments C3b et C4b chez les individus porteurs du génotype HH pour *HindIII* ou QQ pour Q981H, entraînant une inhibition excessive de la voie du complément. Selon nos résultats, cette propriété étant inversée (densité plus basse chez les cas, comparée aux témoins), il en résulterait donc une diminution de la clairance du peptide A β ₁₋₄₂ d'où un risque plus élevé de développer la MA (Brouwers et *al.*, 2012 ; Crehan et *al.*, 2012).

Bien qu'au niveau phénotypique, nous avons mis en évidence une association entre polymorphismes de longueur (protéine) et polymorphismes de densité (nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes), cette association n'était pas retrouvée au niveau génotypique (pas d'association entre polymorphisme de densité [génotype] et polymorphisme de longueur [protéine]). Ces résultats confortent notre hypothèse, à savoir l'influence de facteurs extérieurs ou l'intervention de facteurs autres que génétiques et non pas uniquement d'un facteur génétique constitutionnel. Cette hypothèse va à l'encontre de celle qui proposait qu'il existait un déséquilibre de liaison entre les facteurs de régulation de la densité au niveau du promoteur et les différentes formes de CR1 puisqu'au niveau génotypique, il n'existait aucune association alors que cette association était présente au niveau phénotypique, ce qui

serait plus en faveur de l'intervention de facteurs autres que génétiques dans la MA et conforterait notre hypothèse à savoir que le phénotype densité basse serait acquis au cours de la MA. Néanmoins, à ce stade et en l'absence d'étude longitudinale, on ne peut déterminer si ce facteur extérieur est acquis avant ou pendant la maladie

Enfin, concernant le CR1 soluble sérique, les taux étaient plus élevés chez les cas comparés aux témoins, ceci pourrait être expliqué par une augmentation de la protéolyse de CR1 et/ou sa vésiculation (exocytose) (Dervillez *et al.*, 1997).

D'une part, la protéolyse de CR1 peut constituer un des mécanismes pouvant expliquer le transfert des complexes immuns des érythrocytes vers les macrophages du foie. Dans le cas des maladies auto-immunes par exemple, la production importante de complexes immuns oblige les érythrocytes à effectuer de nombreux cycles de clairance et pourrait expliquer la diminution pathologique de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes et l'augmentation du taux du CR1 soluble sérique. La dégradation de CR1 par des protéases sériques peut également expliquer cette augmentation des taux du CR1 soluble chez les sujets atteints de MA. En effet, plusieurs auteurs ont montré que chez les patients atteints de pathologies associées à la production de protéases comme les pathologies malignes (cancer du poumon) ou les pathologies auto-immunes (LES), il existait une corrélation entre augmentation de la concentration des protéases sériques et diminution de la densité de CR1 (Cohen *et al.*, 1992 ; Currie *et al.*, 1990).

D'autre part, la vésiculation ou l'exocytose de CR1 est un mécanisme qui a déjà été démontré aussi bien dans les érythrocytes (Dervillez *et al.*, 1997) que dans les polynucléaires neutrophiles (Morgan *et al.*, 1987). Nos résultats suggèrent qu'au niveau périphérique, lors de la fixation ou capture des peptides amyloïdes par les érythrocytes, il pourrait y avoir dépôts de molécules de C3b sur la membrane érythrocytaire et que ces dépôts pourraient induire la formation d'un complexe d'attaque membranaire. Ce complexe pourrait ensuite être expulsé par vésiculation de la membrane de l'érythrocyte, ainsi que les molécules à proximité dont le CR1. Ce mécanisme a déjà été décrit dans certaines maladies à complexes immuns comme le LES (Ross *et al.*, 1985) et a déjà été provoqué d'une manière expérimentale au niveau des érythrocytes, en utilisant un flux calcique à l'intérieur de la cellule ou en les privant d'ATP. Ainsi, les vésicules produites sont enrichies en molécules régulatrices du complément comme le CR1 (Pascual *et al.*, 1993b). Dans ce sens, nos résultats pourraient en partie expliquer les observations anatomopathologiques de Hazrati *et al.* (2012) qui retrouvait que la distribution

de CR1 était différente selon le génotype (FF : profil filiforme, FS : profil vésiculaire), et seraient en accord avec les hypothèses de ces auteurs qui suggéraient que l'isoforme CR1*1 (CR1 [F]) pourrait être transporté entre les compartiments de tri des protéines, alors que l'isoforme le plus long CR1*2 (CR1*2 [S]) s'accumulerait dans les membranes des vésicules cytoplasmiques.

En analyse univariée, les allèles longs de CR1 (CR1* 2 et CR1* 4) étaient associés à des taux du CR1 soluble plus élevés chez les cas par rapport aux témoins. Selon l'hypothèse de Crehan et *al.* (2012), les allèles les plus longs de *CR1* seraient protecteurs contre la MA (plus de sites de liaison pour le C3b et C4b) et auraient une demi vie plus longue que les allèles les plus courts (CR1*1 et CR1*3). Néanmoins, selon nos résultats, ces propriétés seraient probablement inversées au cours de la MA (densité plus basse et plus sensible à la protéolyse), en raison de l'intervention de facteurs autres (autres facteurs génétiques, facteurs environnementaux ou acquis) ce qui pourrait expliquer en partie une augmentation de la partie soluble du CR1. D'autres études ont montré que la MA était associée à l'isoforme long de CR1 (CR1*2). Dans notre étude, nous avons montré que la MA était associée à une densité basse de l'isoforme long de CR1, et à des taux du CR1 soluble sérique plus élevés. Le parallélisme des deux observations suggère que l'activation du complément pourrait être en cause. Une influence extérieure phénotypique (acquise) est donc requise. En effet, CR1 pourrait donc être activé dans la circulation par des complexes immuns et/ou in situ en vue de l'épuration ou de la clairance des dépôts amyloïdes.

Par ailleurs, en analyse multivariée cinq facteurs indépendamment associés à la maladie d'Alzheimer ont été identifiés : le sexe féminin, l'âge, le nombre de sites antigéniques de CR1 par érythrocytes (densité), le taux du CR1 soluble sérique et le polymorphisme de densité Q981H. Ceci souligne le fait qu'on est en présence d'éléments génotypiques (connus) et phénotypiques (acquis), et que l'élément phénotypique est probablement d'action univoque mais détectable uniquement dans les catégories génotypiques où les écarts sont grand. Cet élément phénotypique s'exprime modulé par les éléments génotypiques. En effet, selon notre modèle multivarié, une augmentation de 200 sites antigéniques de CR1 serait associée à une diminution du risque de développer la MA de 29.8%. Cela ne signifie pas que les sujets ayant une densité basse (200 sites par exemple) ont plus de risque de développer la MA, car les différents génotypes doivent comporter

probablement d'autres mécanismes, qui feront que le risque de développer la MA ne sera pas plus élevé chez un sujet ayant 200 sites que chez un sujet exprimant 900 sites par exemple. Ceci pourrait être probablement expliqué par l'existence d'autres allèles appartenant à d'autres systèmes. Mais si une personne est génétiquement programmée pour avoir 900 sites et qu'elle baisse sous l'effet de facteurs extérieurs à 200, le risque de développer la MA sera à ce moment élevé. Les voies biologiques sont souvent intriquées et un abaissement acquis du nombre de sites antigéniques de CR1 est associé à un risque élevé de MA, et non pas le génotype densité basse. En effet, c'est la baisse de la densité qui est un facteur de risque associé à la MA et non pas le génotype densité basse. Ceci est conforté par nos résultats qui montrait une surreprésentation de l'allèle QQ ou HH aussi bien chez les cas que chez les témoins.

Par ailleurs, et toujours en analyse multivariée, le taux du CR1 soluble sérique était un facteur explicatif de la maladie, indépendamment de l'âge, de la densité du CR1 et des polymorphismes de densité (allèle Q pour Q981H). Parallèlement, il existait une corrélation négative entre les taux du CR1 soluble sérique et le score au MMSE chez les témoins. Une étude longitudinale dans une population à plus grande échelle serait probablement intéressante, car il pourrait s'agir d'un biomarqueur reflétant l'état inflammatoire au niveau périphérique (circulation sanguine) et probablement prédictif d'évolution vers la MA.

Enfin, bien que l'originalité de notre étude consiste dans le fait de corréler des éléments génotypiques aux données phénotypiques, elle nécessite des investigations à plus grande échelle. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA pourra ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques.

Conclusion et Perspectives

La composante génétique de la MA est complexe, elle requiert ainsi une recherche ambitieuse et active car elle laisse percevoir l'avènement de stratégies thérapeutiques efficaces. Cependant, compte tenu de la complexité de la MA, il semble nécessaire d'appréhender les intrications génétiques et protéiques pour comprendre et analyser leurs impacts sur la maladie. La détermination exhaustive de ces facteurs ne pourra se faire que conjointement à la mise en place de grandes études cas-témoins avec une rigueur de caractérisation clinique qui permettront la spécification du rôle des protéines codées par ces facteurs génétiques sur le processus physiopathologique de la maladie. De ce fait, seule une approche multidisciplinaire semble être adaptée pour répondre à cette complexité. Dans ce sens, notre étude montre l'importance d'une stratégie translationnelle intégrée pour une recherche fructueuse.

Comme la MA résulte d'une interaction complexe entre des facteurs de susceptibilité génétique et des voies moléculaires en aval, de ce fait, l'utilisation de biomarqueurs, comme endophénotypes quantitatifs dans une population suivie, pourra nous donner plus d'information sur le rôle potentiel d'un ou de plusieurs gènes dans l'apparition et/ou la progression de la maladie.

Si notre étude met en évidence un certain nombre de faits particulièrement intéressants, il ne s'agit cependant que d'une étude pilote. Dès sa conception nous avons positionné notre étude comme une recherche exploratoire. Au vu des premiers résultats et des implications qu'ils pourraient entraîner en terme de compréhension de la physiopathologie avec de probables pistes nouvelles sur les versants diagnostique et thérapeutique, nous envisageons l'avenir dans la continuité des travaux de nos deux unités (EA 3797 et EA 4682 du Laboratoire de Recherche en Nanosciences).

Si le risque de développer une MA, associé aux polymorphismes de CR1, est lié à une déficience de la clairance des peptides amyloïdes neurotoxiques, cela soulignerait l'importance de cette voie dans la pathogénèse de la maladie. De ce fait, il serait probablement intéressant d'étudier les corrélations entre le taux du CR1 soluble dans le LCR et les biomarqueurs utilisés dans notre pratique quotidienne (peptide A β ₄₂, protéine tau et protéine tau-P), voire des données de l'imagerie amyloïde. Dans ce sens, nous avons déjà débuté les inclusions dans le cadre d'un projet financé par les AOL (Appel d'Offre Local) incluant, en plus des paramètres déjà étudiés, un dosage du CR1 soluble, du C3b et du C4b

dans le LCR, et nous envisageons dès à présent, afin d'étayer nos hypothèses, une étude de confirmation multicentrique à plus grande échelle avec un financement dans le cadre des PRTS nationaux (Projet de Recherche Translationnelle en Santé). Ce projet sera réalisé en collaboration entre l'EA 3797 (Santé publique- Vieillessement-Qualité de vie et Réadaptation des sujets fragiles) dirigée par le Professeur Jolly, et l'EA 4682 du Laboratoire de Recherche en Nanosciences dirigée par le Professeur Cohen.

En effet, le CR1 soluble résulte en partie du clivage de CR1, qui peut être généré par des protéases endogènes et exogènes appartenant aux familles des sérines protéases (élastase, protéinase 3), ou des metallopeptidases (MMPs, ADAMs). Cette forme soluble ne contient pas la partie transmembranaire et cytoplasmique de la protéine, mais est constituée de quasiment l'intégralité de la partie extracellulaire. De façon importante, le CR1 soluble conserve les propriétés biologiques du CR1 (anti-inflammatoire, régulation du complément). Cette forme soluble pourrait être considérée comme un outil diagnostique mais également thérapeutique.

Sur le plan diagnostique, le rôle du CR1 soluble dans le système nerveux central a été très peu exploré. A notre connaissance, seule une étude s'est intéressée aux corrélations possibles entre la MA et les fractions du complément C3 et C4 dans le LCR, mais d'une part aucune relation avec les polymorphismes de CR1 n'avait été étudiée et d'autre part il existait une différence d'âge de 17 ans entre les cas et les témoins (Daborg et *al.*, 2012). Nous émettons donc l'hypothèse que les concentrations du CR1 soluble et des protéines du système du complément (C3b-C4b) pourraient être liées à l'évolution ou à la progression de la MA, pathologie dans laquelle l'importance de la composante inflammatoire est de plus en plus reconnue. Parallèlement à l'étude du CR1 soluble dans le LCR, il serait également intéressant d'étudier le comportement de CR1 *in situ* « anapath » dans les différents compartiments cellulaires selon les polymorphismes de longueur de CR1.

Sur le plan thérapeutique, et au vue des résultats de notre étude, mais surtout du rôle physiologique et implication potentielle du CR1 dans la pathogénèse de la MA, deux voies pourraient être explorées : (i) une augmentation de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes des patients atteints de MA, (ii) l'utilisation d'une forme recombinante de CR1 soluble comme anti-inflammatoire (Oudin et *al.*, 2000).

En effet, selon notre modèle multivarié, une augmentation de 200 sites antigéniques de CR1 serait associée à une diminution du risque de développer la MA de 29.8%. Dans ce sens, on pourrait donc supposer qu'une restauration de la densité de CR1 chez les sujets atteints de MA pourrait améliorer la clairance des peptides amyloïdes. A ce jour et à notre connaissance, aucun essai thérapeutique chez l'animal n'a été réalisé dans le cadre de la MA. Comme la densité de CR1 diminue au cours de la vie de l'érythrocyte (Ripoche & Sim, 1986), la première hypothèse consisterait à augmenter la proportion des érythrocytes jeunes qui ont une densité supérieure de CR1. Plusieurs techniques sont possibles chez l'animal mais chacune a ses inconvénients. La première technique consiste en une activation de l'érythropoïèse par l'érythropoïétine qui conduit à une augmentation de la population d'érythrocytes jeunes et donc une augmentation de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes (Hebert et *al.*, 1994b). La seconde technique consiste à prélever 30% des globules rouges et à remplacer le volume correspondant par une solution isotonique. Cette technique a montré chez le primate que, d'une part, au bout d'une semaine les érythrocytes prélevés étaient remplacés par des érythrocytes plus jeunes et que d'autre part, la densité de CR1 était triplée et que cet état persistait pendant plus de dix semaines (Hebert et *al.*, 1992). Enfin, la deuxième hypothèse consisterait à transfuser un animal ayant une densité basse de CR1 avec des érythrocytes d'un autre animal ayant une densité élevée de CR1, mais cette technique a montré que l'augmentation de la densité ne dépassait pas quatre jours (Hebert et *al.*, 1994a). Par ailleurs, ces deux hypothèses devraient tenir compte du fait qu'une augmentation trop importante de l'hématocrite peut être dangereuse.

Enfin, le CR1 soluble recombinant pourrait constituer une piste thérapeutique sérieuse (Oudin et *al.*, 2000 ; Shen et *al.*, 2013 ; Zhu et *al.*, 2015). En effet, plusieurs auteurs ont déjà montré que la concentration de CR1soluble sérique était élevée dans certaines maladies autoimmunes comme le lupus érythémateux systémique ou la glomérulonéphrite (Cohen et *al.*, 1992 ; Kubiak-Wlekly et *al.*, 2009). D'une manière plus intéressante, Ramaglia et *al.* (2008) ont étudié l'effet d'un traitement par le CR1 soluble chez des rats ayant une blessure mécanique par écrasement au niveau du nerf périphérique. Les auteurs ont montré d'une part qu'au niveau du nerf endommagé, l'activation du complément était presque complètement inhibée par le CR1S. D'autre part, le nerf endommagé était protégé contre la perte axonale et la démyélinisation dès les premières phases suivants le traumatisme, suggérant que le CR1S aurait une capacité de protection. Dans ce cas, le CR1S recombinant pourrait constituer une

molécule de choix pour les différentes stratégies thérapeutiques basées sur le rôle potentiel de CR1 dans la pathogénèse de la MA.

Concernant ces pistes thérapeutiques que renforcent notre travail, il nous apparaît indispensable d'avancer à partir du modèle animal. Cette étape devra également être construite sur des bases méthodologiques combinant les analyses génétiques aux données protéiques.

Bibliographie

1. Adam, S., Van der Linden, M., Poitrenaud, J., & Kalafat, M. (2004). L'épreuve de rappel indicé à 48 items (RI-48). In M. Van der Linden, S. Adam, A. Agniel, C. Baisset-Mouly & les membres du GREMEM (Eds.), *L'évaluation des troubles de la mémoire: Présentation de quatre tests de mémoire épisodique (avec leur étalonnage)* (pp. 49-68). Marseille, France : Solal.
2. Adam, S., Van der Linden, M., Ivanoiu, A., Juillerat, A. C., Bechet, S., & Salmon, E. (2007). Optimization of encoding specificity for the diagnosis of early AD: the RI-48 task. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 29, 477-487.
3. Agniel, A., Joannette, Y., Doyon, B. & Duchein, C.H. (1993). PEGV et PEGA. Isbergues: Ortho Edition.
4. Aisen, P.S., Petersen, R.C., Donohue, M.C., Gamst, A., Raman, R., Thomas RG., ... Weiner, M.W. (2010). Clinical Core of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: progress and plans. *Alzheimer's & Dementia*, 6, 239-246.
5. Akbaraly, T.N., Portet, F., Fustini, S., Dartigues, J.F., Artero, S., Rouaud, O., ... Berr, C. (2009). Leisure activities and the risk of dementia in the elderly: results from the Three-City Study. *Neurology*, 73, 854-861.
6. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., ... Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21, 383-421.
7. Allen, M., Zou, F., Chai, H.S., Younkin, C.S., Crook, J., Pankratz, V.S., ... Woltjer, R.L. (2012). Novel late-onset Alzheimer disease loci variants associate with brain gene expression. *Neurology*, 79, 221-228.
8. Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. In E. Schultze, O. Snell, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie Und Psychisch- Gerichtliche Medizin* (pp. 146-148). Berlin. Traduction française par P. North. (1989). *Alzh Actual*, Paris, 33, 6-7.

9. Alzheimer's Disease International, 2013. Available from:
<http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2013.pdf>.
10. American Psychiatric Association (1980). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 3rd ed. : DSM-III.3rd ed. Washington, DC: American Psychiatric Association.
11. American Psychiatric Association. (1987). Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-III-R. 3rd ed. Washington, DC: American Psychiatric Association.
12. American Psychiatric Association. (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV. 4th ed. Washington, DC: Task Force on DSM-IV.
13. American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fourth edition, text revised (DSM-IV TR). 4e ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.
14. American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM V. 5th ed. Washington DC : American Psychiatric Association.
15. Andersen, K., Launer, L.J., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J.R., ... Hofman, A. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology*, 53, 1992-1997.
16. Angevaren, M., Aufdemkampe, G., Verhaar, H., Aleman, A., & Vanhees, L. (2008). Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 16, CD005381.
17. Anicet, L., Calais, G., Lefeuvre, M. & Rousseaux, M. (2007). TLA – Tests Lillois d'Apraxie Gestuelle. Paris, Ortho Edition.
18. Ankri, J. (2006). Épidémiologie des démences et de la maladie d'Alzheimer. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 5-6, 42-44.

19. Anstey, K.J., Von Sanden, C., Salim, A., & O'Kearney, R. (2007). Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *American Journal of Epidemiology*, 15, 166, 367-378.
20. Arvanitakis, Z., Leurgans, S.E., Wang, Z., Wilson, R.S., Bennett, D.A., & Schneider, J.A. (2011). Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons. *Annals of neurology*, 69, 320–327.
21. Athan, E.S., Williamson, J., Ciappa, A., Santana, V., Romas, S.N., Lee, J.H., ... Mayeux, R. (2001). A founder mutation in presenilin 1 causing early-onset Alzheimer disease in unrelated Caribbean Hispanic families. *JAMA*, 286, 2257-2263.
22. Avramopoulos, D. (2009). Genetics of Alzheimer's disease: Recent advances. *Genome Medicine*, 1, 34.
23. Baig, S., Joseph, S.A., Tayler, H., Abraham, R., Owen, M.J., Williams, J., ... Love, S. (2010). Distribution and expression of picalm in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 69, 1071–1077.
24. Ball, M.J., Fisman, M., Hachinski, V., Blume, W., Fox, A., Kral, V.A., ... Merskey, H. (1985). A new definition of Alzheimer's disease: a hippocampal dementia. *Lancet*, 1, 14-16.
25. Barbeau, E., Tramon, E., Joubert, S., Mancini, J., Ceccaldi, M., & Poncet, M. (2004). Evaluation de la mémoire de reconnaissance visuelle: normalisation d'une épreuve en choix forcé (DMS48) et utilisé en neuropsychologie clinique. In M. Van Der Linden, et les membres du GREMEM (Eds.), *L'évaluation des troubles de la mémoire* (pp. 85-101). Marseille, France : Solal.
26. Barberger-Gateau, P., Commenges, D., Gagnon, M., Letenneur, L., Sauvel, C., & Dartigues, J.F. (1992). Instrumental activities of daily living as a screening tool for cognitive impairment and dementia in elderly community dwellers. *Journal of the American Geriatric Society*, 40, 1129-1134.

27. Barberger-Gateau, P., Dartigues, J.F., & Letenneur, L. (1993). Four Instrumental Activities of Daily Living Score as a predictor of one-year incident dementia. *Age Ageing*, 22, 457-463.
28. Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D., & Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *Journal of Geriatric Psychiatry Neurology*, 23, 213–227.
29. Benitez, B.A., & Cruchaga, C. (2013). TREM2 and neurodegenerative disease. *New England Journal of Medicine*, 369, 1567-1568.
30. Bennett, S., & Thomas, A.J. (2014). Depression and dementia: cause, consequence or coincidence? *Maturitas*, 79, 184-190.
31. Bertram, L., Lange, C., Mullin, K., Parkinson, M., Hsiao, M., Hogan, M.F., ... Tanzi, R.E. (2008). Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *American Journal of Human Genetics*, 83, 623–632.
32. Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., & Tanzi, R.E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nature Genetics*, 39, 17–23.
33. Bertram, L., Parrado, A.R., & Tanzi, R.E. (2013). TREM2 and neurodegenerative disease. *New England Journal of Medicine*, 369, 1565.
34. Bertram, L., & Tanzi, R.E. (2010). Alzheimer disease: New light on an old *CLU*. *Nature Reviews Neurology*, 6, 11-13.
35. Biffi, A., Anderson, C.D., Desikan, R.S., Sabuncu, M., Cortellini, L., Schmansky, N., ... Rosand, J. (2010). Genetic variation and neuroimaging measures in Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 67, 677–685.
36. Biffi, A., Shulman, J.M., Jagiella, J.M., Cortellini, L., Ayres, A.M., Schwab, K., ... Rosand, J. (2012). Genetic variation at CR1 increases risk of cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*, 78, 334–341.

37. Birmingham, D.J., Chen, W., Liang, G., Schmitt, H.C., Gavit, K., & Nagaraja, H.N. (2003). A CR1 polymorphism associated with constitutive erythrocyte CR1 levels affects binding to C4b but not C3b. *Immunology*, 108, 531–538.
38. Blanchard, F., Duarte, F., & Munsch, F. (2000). A subject in search of meaning: Frailty and dignity in very old age. *Diogenes*, 48, 84-92.
39. Blessed, G., Tomlinson, B. E., & Roth, M. (1968). The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *British Journal of Psychiatry*, 114, 797-811.
40. Bloudek, L.M., Spackman, D.E., Blankenburg, M., & Sullivan, S.D. (2011). Review and meta-analysis of biomarkers and diagnostic imaging in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 26, 627–645.
41. Braak, H., Braak, E., & Bohl, J. (1993). Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *European Neurology*, 33, 403-408.
42. Bradt, B.M., Kolb, W.P., & Cooper, N.R. (1998). Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide. *Journal of Experimental Medicine*, 3, 431-438.
43. Brouwers, N., Van Cauwenberghe, C.V., Engelborghs, S., Lambert, J.C., Bettens, K., Le Bastard, N., ... Van Broeckhoven, C. (2012). Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. *Molecular Psychiatry*, 17, 223–233.
44. Buchhave, P., Minthon, L., Zetterberg, H., Wallin, A.K., Blennow, K., & Hansson, O. (2012). Cerebrospinal fluid levels of beta-amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Archives of General Psychiatry*, 69, 98–106.
45. Buschke, H., Kuslansky, G., Katz, M., Stewart, W.F., Sliwinski, M.J., Eckholdt, H.M., & Lipton, R.B. (1999). Screening for dementia with the memory impairment screen. *Neurology*, 52, 231-238.

46. Cai, D., Netzer, W.J., Zhong, M., Lin, Y., Du, G., Frohman, M., ... Greengard, P. (2006). Presenilin-1 uses phospholipase D1 as a negative regulator of betaamyloid formation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 103, 1941–1946.
47. Cai, D., Zhong, M., Wang, R., Netzer, W.J., Shields, D., Zheng, H., ... Greengard, P. (2006). Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 103, 1936–1940.
48. Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B., Frangione, B., & Ghiso, J. (2000). Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microscopy Research and Technique*, 50, 305–315.
49. Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., ... Frebourg, T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: Prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *American Journal of Human Genetics*, 65, 664–670.
50. Cardebat, D., Doyon, B., Puel, M., Goulet, P., & Joanette, Y. (1990). Formal and semantic lexical evocation in normal subjects. Performances and dynamics of production as a function of sex, age and educational level. *Acta Neurologica Belgica*, 90, 207-217.
51. Carrasquillo, M.M., Belbin, O., Hunter, T.A., Ma, L., Bisceglia, G.D., Zou, F., ... Younkin, S.G. (2010). Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 67, 961–964.
52. Carroll, M.C., Alicot, E.M., Katzman, P.J., Klickstein, L.B., Smith, J.A., & Fearon, D.T. (1988). Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. *The Journal of Experimental Medicine*, 167, 1271-1280.

53. Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., ... Holtzman, D.M. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Science Translational Medicine*, 3, 89ra57.
54. Cesbron, J.Y., Chevaillier, A., Dragon, M.A., & Uring-Lambert, B. (2013). Le système du complément. In M. Bené, Y. Lebranchu, F. Lemoine, & E. Seillès (Eds.), *Immunologie fondamentale et immunopathologie* (pp. 68-71). Paris, France : Elsevier Masson.
55. Chan, S.L., Kim, W.S., Kwok, J.B., Hill, A.F., Cappai, R., Rye, K.A., & Garner, B. (2008). ATP-binding cassette transporter A7 regulates processing of amyloid precursor protein in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 106, 793–804.
56. Charlson, M.E., Pompei, P., Ales, K.L., & MacKenzie, C.R. (1985). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *Journal of Chronic Diseases*, 40, 373–383.
57. Chen, L.H., Kao, P.Y., Fan, Y.H., Ho, D.T., Chan, C.S., Yik, P.Y., ... Song, Y.Q. (2012). Polymorphisms of CR1, CLU and PICALM confer susceptibility of Alzheimer's disease in a southern Chinese population. *Neurobiology of Aging*, 33, 210 e211–217.
58. Cheng, G., Huang, C., Deng, H., & Wang, H. (2012). Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Internal Medicine Journal*, 42, 484-491.
59. Chevalier, J., & Kazatchkine, M.D. (1989). Distribution in clusters of complement receptor type one (CR1) on human erythrocytes. *Journal of Immunology*, 142, 2031-2036.
60. Chibnik, L.B., Shulman, J.M., Leurgans, S.E., Schneider, J.A., Wilson, R.S., Tran, D., ... De Jager, P.L. (2011). CR1 is associated with amyloid plaque burden and age-related cognitive decline. *Annals of Neurology*, 69, 560–569.
61. Christensen, K., Thinggaard, M., Oksuzyan, A., Steenstrup, T., Andersen-Ranberg, K., Jeune, B., ... Vaupel, J.W. (2013). Physical and cognitive functioning of people

older than 90 years: a comparison of two Danish cohorts born 10 years apart. *Lancet*, 382, 1507-1513.

62. Chung, S.J., Kim, M.J., Kim, Y.J., Kim, J., You, S., Jang, E.H., ... Lee, J.H. (2014). CR1, ABCA7, and APOE genes affect the features of cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 339, 91–96.
63. Cockburn, I.A., & Rowe, J.A. (2006). Erythrocyte complement receptor 1 (CR1) expression level is not associated with polymorphisms in the promoter or 3' untranslated regions of the CR1 gene. *International Journal of Immunogenetics*, 33, 17-20.
64. Cohen, J.H., Aubry, J.P., Revillard, J.P., Banchereau, J., & Kazatchkine, M.D. (1989). Human T lymphocytes expressing the C3b/C4b complement receptor type one (CR1, CD35) belong to Fc gamma receptor-positive CD4-positive T cells. *Cellular Immunology*, 121, 383-390.
65. Cohen, J.H.M., Atkinson, J.P., Klickstein, L.B., Oudin, S., Bala Subramanian, V., & Moulds, J.M. (1999). The C3b/C4b receptor (CR1, CD35) on erythrocytes: methods for study of the polymorphisms. *Molecular Immunology*, 36, 819–825.
66. Cohen, J.H.M., Lutz, H.U., Pennaforte, J.L., Bouchard, A., & Kazatchkine, M.D. (1992). Peripheral catabolism of CR1 (the C3b receptor, CD35) on erythrocytes from healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical and Experimental Immunology*, 87, 422–428.
67. Colonna, M. (2003). TREMs in the immune system and beyond. *Nature Reviews Immunology*, 3, 445–453.
68. Cook, J., Fischer, E., Boucheix, C., Mirsrahi, M., Jouvin, M.H., Weiss, L., ... Kazatchkine, M.D. (1985). Mouse monoclonal antibodies to the human C3b receptor. *Molecular Immunology*, 22, 531–539.
69. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., ... Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261, 921-923.

70. Cormont, M., Meton, I., Mari, M., Monzo, P., Keslair, F., Gaskin, C., ... Le Marchand-Brustel, Y. (2003). CD2AP/CMS regulates endosome morphology and traffic to the degradative pathway through its interaction with Rab4 and c-Cbl. *Traffic*, 4, 97–112.
71. Cornacoff, J.B., Hebert, L.A., Smead, W.L., Van Aman, M.E., Birmingham, D.J., & Waxman, F.J. (1983). Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*, 71, 236–247.
72. Corneveaux, J.J., Myers, A.J., Allen, A.N., Pruzin, J.J., Ramirez, M., Engel, A., ... Huentelman, M.J. (2010). Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer's disease in a cohort of clinically characterized and neuropathologically verified individuals. *Human Molecular Genetics*, 19, 3295–3301.
73. Cornillet, P., Philbert, F., Kazatchkine, M.D., & Cohen, JH. (1991). Genomic determination of the CR1 (CD35) density polymorphism on erythrocytes using polymerase chain reaction amplification and *Hind*III restriction enzyme digestion. *Journal of Immunological Methods*, 136, 193–197.
74. Corsi, P.M. (1972). Human memory and the medial temporal region of the brain. *Dissertation Abstracts International*, 34, 819B.
75. Cosio, F.G., Shen, X.P., & Hebert, L.A. (1990a). Immune complexes bind preferentially to specific subpopulations of human erythrocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 55, 337–354.
76. Cosio, F.G., Shen, X.P., Birmingham, D.J., Van Aman, M., & Hebert, L.A. (1990b). Evaluation of the mechanisms responsible for the reduction in erythrocyte complement receptors when immune complexes form in vivo in primates. *Journal of Immunology*, 145, 4198–4206.
77. Crehan, H., Holton, P., Wray, S., Pocock, J., Guerreiro, R., & Hardy, J. (2012). Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology*, 217, 244–250.
78. Crehan, H., Hardy, J., & Pocock, J. (2013). Blockage of CR1 prevents activation of rodent microglia. *Neurobiology of Disease*, 54, 139–149.

79. Crocker, P.R., Hartnell, A., Munday, J., & Nath, D. (1997). The potential role of sialoadhesin as a macrophage recognition molecule in health and disease. *Glycoconjugate Journal*, 14, 601–609.
80. Croisile, B. (1999). Une (petite) batterie d'évaluation de l'orthographe. *Glossa*, 67, 26-39.
81. Cruchaga, C., Kauwe, J.S., Harari, O., Jin, S.C., Cai, Y., Karch, C.M., ... Goate, A.M. (2013). GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for Alzheimer's disease. *Neuron*, 78, 256–268.
82. Cruchaga, C., Karch, C.M., Jin, S.C., Benitez, B.A., Cai, Y., Guerreiro, R., ... Goate, A.M. (2014). Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature*, 505, 550–554.
83. Crutcher, K.A., Clay, M.A., Scott, S.A., Tian, X., Tolar, M., & Harmony, J.A. (1994). Neurite degeneration elicited by apolipoprotein E peptides. *Experimental Neurology*, 130, 120-126.
84. Cummings, J.L., Mega, M., Gray, K., Rosenberg-Thompson, S., Carusi, D.A., & Gornbein, J. (1994). The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*, 44, 2308-2314.
85. Currie, M.S., Vala, M., Pisetsky, D.S., Greenberg, C.S., Crawford, J., & Cohen, H.J. (1990). Correlation between erythrocyte CR1 reduction and other blood proteinase markers in patients with malignant and inflammatory disorders. *Blood*, 75, 1699-1704.
86. Daborg, J., Andreasson, U., Pekna, M., Lautner, R., Hanse, E., Minthon, L., ... Zetterberg, H. (2012). Cerebrospinal fluid levels of complement proteins C3, C4 and CR1 in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 119, 789-797.
87. Dekhtyar, S., Wang, H.X., Scott, K., Goodman, A., Koupil, I., & Herlitz, A. (2015). A Life-Course Study of Cognitive Reserve in Dementia-From Childhood to Old Age. *American Journal of Geriatrics and Psychiatry*, 11, S1064-7481(15)00082-2.

88. De la Torre, J.C. (2002). Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke*, 33, 1152-1162.
89. DeMattos, R.B., O'Dell, M.A., Parsadanian, M., Taylor, J.W., Harmony, J.A.K., Bales, K.R., ... Holtzman, D.M. (2002). Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99, 10843–10848.
90. De Partz, M.-P., Bilocq, V., De Wilde, V., Seron, X., & Pillon, A. (2001). Tests pour le diagnostic des troubles lexicaux chez le patient aphasique. Marseille, France : Ed. De Boeck, Solal.
91. De Rotrou, J., Battal-Merlet, L., Wenisch, E., Chausson, C., Bizet, E., Dray, F., ... Hanon, O. (2007). Relevance of 10-min delayed recall in dementia screening. *European Journal of Neurology*, 14, 144-149.
92. Derouesné, C., Poitreneau, J., Hugonot, L., Kalafat, M., Dubois, B., & Laurent, B. (1999). Au nom du groupe de recherche sur l'évaluation cognitive (GRECO). Le Mental-State Examination (MMSE): un outil pratique pour l'évaluation de l'état cognitif des patients par le clinicien. Version française consensuelle. *Presse Médicale*, 28, 1141-1148.
93. Derouesné, C., & Lacomblez, L. (2000). Diagnostic de la maladie d'Alzheimer à la phase prédéméntielle : possibilité et utilité. *Presse Médicale*, 29, 1663-1669.
94. Dervillez, X., Oudin, S., Libyh, M.T., Tabary, T., Reveil, B., Philbert, F., ... Cohen, J.H. (1997). Catabolism of the human erythrocyte C3b/C4b receptor (CR1, CD35): vesiculation and/or proteolysis? *Immunopharmacology*, 38, 129-140.
95. Dodson, S.E., Gearing, M., Lipka, C.F., Montine, T.J., Levey, A.I., & Lah, J.J. (2006). LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65, 866–872.

96. Dodson, S.E., Andersen, O.M., Karmali, V., Fritz, J.J., Cheng, D., Peng, J., ... Lah, J.J. (2008). Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: Evidence for a proximal role in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 28, 12877–12886.
97. Dubois, B., Slachevsky, A., Litvan, I., & Pillon, B. (2000). The FAB: A frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology*, 55, 1621-1626.
98. Dubois, B., Touchon, J., Portet, F., Ousset, P.J., Vellas, B., & Michel, B. (2002). "The 5 words": a simple and sensitive test for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Presse Médicale*, 31, 1696-1699.
99. Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Cummings, J.L., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., ... Scheltens, P. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurology*, 9, 1118-1127.
100. Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., ... Shaw, A.S. (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*, 94, 667–677.
101. Dykman, T.R., Hatch, J.A., Aqua, M.S., & Atkinson, J.P. (1985). Polymorphism of the C3b/C4b receptor (CR1): characterization of a fourth allele. *Journal of Immunology*, 134, 1787-1789.
102. Edjolo, A., Helmer, C., Barberger-Gateau, P., Dartigues, J.F., Maubaret, C., & Pérès, K. (2013). Becoming a nonagenarian: factors associated with survival up to 90 years old in 70+ men and women. Results from the PAQUID longitudinal cohort. *Journal of Nutrition Health and Aging*, 17, 881-892.
103. Ehlers, M.R., & Riordan, J.F. (1991). Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry*, 30, 10065-10074.
104. Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Scheper, W., Rozemuller, A.J., Van Gool, W.A., & Hoozemans, J.J. (2006). The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 113, 1685–1695.

105. El Kadmiri, N., Hamzi, K., El Moutawakil, B., Slassi, I., & Nadifi, S. (2013). Genetic aspects of Alzheimer's disease (Review). *Pathologie Biologie*, 61, 228–238.
106. Erkinjuntti, T., Ostbye, T., Steenhuys, R., & Hachinski, V. (1997). The effect of different diagnostic criteria on the prevalence of dementia. *New England Journal of Medicine*, 337, 1667-1674.
107. Fagan, A.M., Watson, M., Parsadanian, M., Bales, K.R., Paul, S.M., & Holtzman, D.M. (2002). Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 9, 305–318.
108. Fagan, A.M., Xiong, C., Jasielec, M.S., Bateman, R.J., Goate, A.M., Benzinger, T.L., ... Holtzman, D.M. (2014). Longitudinal change in CSF biomarkers in autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 6, 226ra30.
109. Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., ... Van Duijn, C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 278, 1349-1356.
110. Faxen-Irving, G., Basun, H., & Cederholm, T. (2005). Nutritional and cognitive relationships and long-term mortality in patients with various dementia disorders. *Age Ageing*, 34, 136–141.
111. Fearon, D.T. (1980). Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *Journal of Experimental Medicine*, 152, 20-30.
112. Fédération Nationale des Centres Mémoire de Ressources et de Recherche. (2012). Diagnostic et prise en charge de la maladie d'Alzheimer et des pathologies apparentées. *Recommandations*.
113. Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., ... Scazufca, M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366, 2112-2117.

114. Fishelson, Z., & Marikovsky, Y. (1993). Reduced CR1 expression on aged human erythrocytes: immuno-electron microscopic and functional analysis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 72, 25-35.
115. Flicker, C., Ferris, S.H., & Reisberg, B. (1991). Mild cognitive impairment in the elderly: predictors of dementia. *Neurology*, 41, 1006-1009.
116. Flicker, C., Ferris, S.H., & Reisberg, B. (1993). A two-year longitudinal study of cognitive function in normal aging and Alzheimer's disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 6, 84-96.
117. Folstein, M.F., Folstein, S.E., & McHugh, P.R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, 12, 189–198.
118. Fonseca, M.I., Zhou, J., Botto, M., & Tenner, A.J. (2004). Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 24, 6457-6465.
119. Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S., & Winblad, B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurology*, 3, 343–353.
120. Furney, S.J., Simmons, A., Breen, G., Pedroso, I., Lunnon, K., Proitsi, P., ... Lovestone, S. (2011). Genome-wide association with MRI atrophy measures as a quantitative trait locus for Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 16, 1130–1138.
121. Gallez, C. (2005). Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées. *Office Parlementaire d'Evaluation des Politiques de Santé (OPEPS)*, 256.
122. Gandy, S., Haroutunian, V., DeKosky, S.T., Sano, M., & Schadt, E.E. (2013). CR1 and the "vanishing amyloid" hypothesis of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, 73, 393–395.
123. Gao, Y., Huang, C., Zhao, K., Ma, L., Qiu, X., Zhang, L., ... Xiao, Q. (2013). Depression as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-

- analysis of longitudinal studies. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 28, 441-449.
124. Gasque, P., Chan, P., Mauger, C., Schouft, M.T., Singhrao, S., Dierich, M.P., ... Fontaine, M. (1996). Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *Journal of Immunology*, 156, 2247-2255.
 125. Ghiso, J., Shayo, M., Calero, M., Ng, D., Tomidokoro, Y., Gandy, S., ... Frangione, B. (2004). Systemic catabolism of Alzheimer's Abeta40 and Abeta42. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 45897-45908.
 126. Gibson, G.E., Haroutunian, V., Zhang, H., Park, L.C., Shi, Q., Lesser, M., ... Blass, J.P. (2000). Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype. *Annals of Neurology*, 48, 297-303.
 127. Giraldo, M., Lopera, F., Siniard, A.L., Corneveaux, J.J., Schrauwen, I., Carvajal, J., ... Huentelman, M.J. (2013). Variants in triggering receptor expressed on myeloid cells 2 are associated with both behavioral variant frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34, 2077 e11-e18.
 128. Glenner, G.G., & Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120, 885-890.
 129. Glenner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V., & Eanes, E.D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Applied Pathology*, 2, 357-369.
 130. Griciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A.R., Lesinski, A.N., Asselin, C.N., Mullin, K., ... Tanzi, R.E. (2013). Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron*, 78, 631-643.
 131. Gudala, K., Bansal, D., Schifano, F., & Bhansali, A. (2013). Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of Diabetes Investigation*, 4, 640-650.

132. Guerreiro, R., & Hardy, J. (2013). TREM2 and neurodegenerative disease. *New England Journal of Medicine*, 369, 1569–1570.
133. Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., ... Hardy, J., (2013). *TREM2* variants in Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 368, 117–127.
134. Guerreiro, R., Bras, J., Toombs, J., Heslegrave, A., Hardy, J., & Zetterberg, H. (2015). Genetic Variants and Related Biomarkers in Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Genetic Medicine Reports*, 3, 19-25.
135. Hamer, I., Paccaud, J.P., Belin, D., Maeder, C., & Carpentier, J.L. (1998). Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain. *The Biochemical Journal*, 329, 183–190
136. Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosciences*, 20, 154-159.
137. Hardy, J., & Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353–356.
138. Harel, A., Wu, F., Mattson, M.P., Morris, C.M., & Yao P.J. (2008). Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. *Traffic*, 9, 417–429.
139. Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., ... Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41, 1088–1093.
140. Haute Autorité de Santé. (2011). Maladie d'Alzheimer et maladies apparentées. Diagnostic et prise en charge. *Recommandations*.
141. Hazrati, L.N., Van Cauwenberghe, C., Brooks, P.L., Brouwers, N., Ghani, M., Sato, C., ... Rogaeva, E. (2012). Genetic association of CR1 with Alzheimer's disease: A tentative disease mechanism. *Neurobiology of Aging*, 33, 2949.e5-2949.e12.

142. Hebert, L.A., Birmingham, D.J., Shen, X.P., & Cosio, F.G. (1992). Stimulating erythropoiesis increases complement receptor expression on primate erythrocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 62, 301-306.
143. Hebert, L.A., Birmingham, D.J., Dillon, J.J., Cosio, F.G., & Shen, X.P. (1994a). Erythropoietin therapy in humans increases erythrocyte expression of complement receptor type 1 (CD35). *Journal of the American Society of Nephrology*, 4, 1786-1791.
144. Hebert, L.A., Birmingham, D.J., Mahan, J.D., Shen, X.P., McAllister, C., Cosio, F.G., & Dillon, J.J. (1994b). Effect of chronically increased erythrocyte complement receptors on immune complex nephritis. *Kidney International*, 45, 493-499.
145. Helgeson, M., Swanson, J., & Polesky, H.F. (1970). Knops-Helgeson (Kna), a high frequency erythrocyte antigen. *Transfusion*, 10, 737-738.
146. Helmer, C., Pasquier, F., & Dartigues, J.F. (2006). Epidemiology of Alzheimer disease and related disorders. *Médecine Sciences*, 22, 288-296.
147. Herrera, A.H., Xiang, L., Martin, S.G., Lewis, J., & Wilson, J.G. (1998). Analysis of complement receptor type 1 (CR1) expression on erythrocytes and of CR1 allelic markers in Caucasian and African American populations. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 87, 176-183.
148. Holers, V.M., Chaplin, D.D., Leykam, J.F., Gruner, B.A., Kumar, V., & Atkinson, J.P. (1987). Human complement C3b/C4b receptor (CR1) mRNA polymorphism that correlates with the CR1 allelic molecular weight polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 84, 2459-2463.
149. Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.C., Carrasquillo, M.M., ... Williams, J. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43, 429-435.
150. Holtzman, D.M., Bales, K.R., Wu, S., Bhat, P., Parsadanian, M., Fagan, A.M., ... Paul, S.M. (1999). Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta

deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Investigation*, 103, R15-R21.

151. Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J., ... Paul, S.M. (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97, 2892-2897.
152. Holtzman, D.M. (2001). Role of APOE/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Journal of Molecular Neuroscience*, 17, 147-155.
153. Holtzman, D.M., Morris, J.C., ... Goate A.M. (2011). Alzheimer's disease: The challenge of the second century. *Science Translational Medicine*, 3, 77sr71.
154. Hourcade, D., Miesner, D.R., Atkinson, J.P., & Holers, V.M. (1988). Identification of an alternative polyadenylation site in the human C3b/C4b receptor (complement receptor 1) transcriptional unit and prediction of a secreted form of complement receptor type 1. *Journal of Experimental Medicine*, 168, 1255-1270.
155. Howard, D., & Patterson, K. (1992). The pyramids and Palm Trees Test. Bury St-Edmunds: Thames Valley Test Company.
156. Howie, D., Nolan, K.F., Daley, S., Butterfield, E., Adams, E., Garcia-Rueda, H., ... Waldmann, H. (2009). MS4A4B is a GPCR-associated membrane adapter, expressed by regulatory T cells, which modulates T cell activation. *Journal of Immunology*, 183, 4197-4204.
157. Ikeda, Y., Abe-Dohmae, S., Munehira, Y., Aoki, R., Kawamoto, S., Furuya, A., ... Ueda, K. (2003). Posttranscriptional regulation of human ABCA7 and its function for the apoA-I-dependent lipid release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311, 313-318.
158. INSERM. (2007). Aspects cliniques et prise en charge de la maladie. In Inserm (Eds), *Maladie d'Alzheimer: enjeux scientifiques médicaux et sociétaux* (pp. 379-429). Paris, France: Les éditions Inserm.

159. Jacqmin-Gadda, H., Alperovitch, A., Montlahuc, C., Commenges, D., Leffondre, K., Dufouil, C., ... Joly, P. (2013). 20-Year prevalence projections for dementia and impact of preventive policy about risk factors. *European Journal of Epidemiology*, 28, 493-502.
160. Jacquet, M., Lacroix, M., Ancelet, S., Gout, E., Gaboriaud, C., Thielens, N.M., & Rossi, V. (2013). Deciphering complement receptor type 1 interactions with recognition proteins of the lectin complement pathway. *Journal of Immunology*, 190, 3721–3731.
161. Jehle, A.W., Gardai, S.J., Li, S., Linsel-Nitschke, P., Morimoto, K., Janssen, W.J., ... Tall, A.R. (2006). ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *The Journal of Cell Biology*, 174, 547–556.
162. Jiang, T., Yu, J.T., & Tan, L. (2012). Novel disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer Disease*, 31, 475–492.
163. Jiang, T., Yu, J.T., Tian, Y., & Tan, L. (2013a). Epidemiology and etiology of Alzheimer's disease: from genetic to non-genetic factors. *Current Alzheimer Research*, 10, 852–867.
164. Jiang, T., Yu, J.T., Zhu, X.C., & Tan, L. (2013b). TREM2 in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 48, 180-185.
165. Jin, J.K., Ahn, B.H., Na, Y.J., Kim, J.I., Kim, Y.S., Choi, E.K., ... Min Do, S. (2007). Phospholipase D1 is associated with amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 28, 1015–1027.
166. Jin, C., Li, W., Yuan, J., Xu, W., & Cheng, Z. (2012). Association of the CR1 polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in Chinese Han populations: a meta-analysis. *Neuroscience Letter*, 527, 46–49.
167. Joachim, C.L., Mori, H., & Selkoe, D.J. (1989). Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature*, 341, 226–230.

168. Jones, L., Holmans, P.A., Hamshere, M.L., Harold, D., Moskvina, V., Ivanov, D., ... Williams, J. (2010). Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, 5, e13950.
169. Jones, S.E., & Jomary, C. (2002). Clusterin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34, 427–431.
170. Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P.V., Snaedal, J., ... Stefansson, K. (2013). Variant of *TREM2* associated with the risk of Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 368, 107–116.
171. Józsi, M., Prechl, J., Bajtay, Z., & Erdei, A. (2002). Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. *Journal of Immunology*, 168, 2782-8.
172. Jun, G., Naj, A.C., Beecham, G.W., Wang, L.S., Buross, J., Gallins, P.J., ... Schellenberg, G.D. (2010). Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Archives of Neurology*, 67, 1473–1484.
173. Kalafat, M., Hugonot-Diener, L., & Poitrenaud, J. (2003). Standardisation et étalonnage français du « Mini Mental State » (MMS) version GRECO. *Revue de Neuropsychologie*, 13, 209-36.
174. Karch, C.M., Jeng, A.T., Nowotny, P., Cady, J., Cruchaga, C., & Goate, A.M. (2012). Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains. *PLoS One*, 7, e50976.
175. Karch, C.M., & Goate, A.M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77, 43-51.
176. Katz, S., Ford, A.B., Moskowitz, R.W., Jackson, B.A., & Jaffe, M.W. (1963). Studies of illness in the aged. The index of ADL: A standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA*, 185, 914–919.

177. Kauwe, J.S.K., Cruchaga, C., Bertelsen, S., Mayo, K., Latu, W., Nowotny, P., ... Goate, A.M. (2010). Validating predicted biological effects of Alzheimer's disease associated SNPs using CSF biomarker levels. *Journal of Alzheimers Disease*, 21, 833–842.
178. Kiddle, S.J., Sattlecker, M., Proitsi, P., Simmons, A., Westman, E., Bazenet, C., ... Dobson, R.J. (2014). Candidate blood proteome markers of Alzheimer's disease onset and progression: A systematic review and replication study. *Journal of Alzheimers Disease*, 38, 515–531.
179. Killick, R., Hughes, T.R., Morgan, B.P., & Lovestone, S. (2013). Deletion of Crry, the murine ortholog of the sporadic Alzheimer's disease risk gene CR1, impacts tau phosphorylation and brain CFH. *Neuroscience Letters*, 533, 96–99.
180. Kim, C.H., Kim, H.S., Cubells, J.F., & Kim, K.S. (1999). A previously undescribed intron and extensive 5' upstream sequence, but not Phox2a-mediated transactivation, are necessary for high level cell type-specific expression of the human norepinephrine transporter gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 6507–6518.
181. Kim, W.S., Guillemín, G.J., Glaros, E.N., Lim, C.K., & Garner, B. (2006). Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport*, 17, 891–896.
182. Kim, W.S., Weickert, C.S., & Garner, B. (2008). Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *Journal of Neurochemistry*, 104, 1145–1166.
183. Kim, J., Basak, J.M., & Holtzman, D.M. (2009a). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63, 287–303.
184. Kim, M., Suh, J., Romano, D., Truong, M.H., Mullin, K., Hooli, B., ... Tanzi, R.E. (2009b). Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate {alpha}-secretase activity. *Human Molecular Genetics*, 18, 3987–3996.

185. Kim, W.S., Li, H., Ruberu, K., Chan, S., Elliott, D.A., Low, J.K., ... Garner, B. (2013). Deletion of *Abca7* increases cerebral amyloid-beta accumulation in the J20 mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 33, 4387–4394.
186. Klickstein, L.B., Wong, W.W., Smith, J.A., Weis, J.H., Wilson, J.G., & Fearon, D.T. (1987). Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins. *The Journal of Experimental Medicine*, 165, 1095-1112.
187. Knopman, D.S., DeKosky, S.T., Cummings, J.L., Chui, H., Corey-Bloom, J., Relkin, N., ... Stevens, J.C. (2001). Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 56, 1143-1153.
188. Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., ... Paul, S.M. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nature Medicine*, 10, 719-726.
189. Koudinov, A.R., Berezov, T.T., & Koudinova, N.V. (1998). Alzheimer's amyloid beta and lipid metabolism: a missing link? *FASEB Journal*, 12, 1097-1099.
190. Krych, M., Clemenza, L., Howdeshell, D., Hauhart, R., Hourcade, D., & Atkinson, J.P. (1994). Analysis of the functional domains of complement receptor type 1 (C3b/C4b receptor; CD35) by substitution mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 13273-13278.
191. Krych-Goldberg, M., Moulds, J.M., & Atkinson, J.P. (2002). Human complement receptor type 1 (CR1) binds to a major malarial adhesin. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 531–537.
192. Kubiak-Wlekly, A., Perkowska-Ptasinska, A., Olejniczak, P., Rochowiak, A., Kaczmarek, E., Durlík, M., ... Niemir, Z.I. (2009). The comparison of the podocyte expression of synaptopodin, CR1 and neprilysin in human glomerulonephritis: could the expression of CR1 be clinically relevant? *International Journal of Biomedical Science*, 5, 28–36.

193. Lai, K.O., & Ip, N.Y. (2009). Synapse development and plasticity: Roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 19, 275–283.
194. Lambert, J.C., Mann, D., Goumide, L., Harris, J., Amouyel, P., Iwatsubo, T., & Chartier-Harlin, M.C. (2001). Effect of the APOE promoter polymorphisms on cerebral amyloid peptide deposition in Alzheimer's disease. *Lancet*, 357, 608-609. Erratum in *Lancet*, 357, 1370.
195. Lambert, J.C., Araria-Goumide, L., Myllykangas, L., Ellis, C., Wang, J.C., Bullido, M.J., ... Chartier-Harlin, M.C. (2002). Contribution of APOE promoter polymorphisms to Alzheimer's disease risk. *Neurology*, 59, 59-66.
196. Lambert, J.C., Mann, D., Richard, F., Tian, J., Shi, J., Thaker, U., ... Amouyel, P. (2005). Is there a relation between APOE expression and brain amyloid load in Alzheimer's disease? *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 76, 928-933.
197. Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., ... Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CRI* associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41, 1094–1099.
198. Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D., Naj, A.C., Sims, R., Bellenguez, C., ... Amouyel, P. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 45, 1452–1458.
199. Larson, E.B., Wang, L., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Crane, P., & Kukull, W. (2006). Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Annals of Internal Medicine*, 144, 73–81.
200. Launer, L.J., Andersen, K., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Amaducci, L.A., ... Hofman, A. (1999). Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia. *Neurology*, 52, 78-84.

201. Lautner, R., Mattsson, N., Scholl, M., Augutis, K., Blennow, K., Olsson, B., & Zetterberg, H. (2011) Biomarkers for microglial activation in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 939426.
202. Lawton, M.P., & Brody, E.M. (1969). Assessment of older people: Self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*, 9, 179–186.
203. Lebert, F., Pasquier, F., Souliez, L., & Petit, H. (1998). Frontotemporal behavioral scale. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 12, 335-339.
204. Lennek, R., Baldwin, A.S.Jr., Waller, S.J., Morley, K.W., & Taylor, R.P. (1981). Studies of the physical biochemistry and complement-fixing properties of DNA/anti-DNA immune complexes. *Journal of Immunology*, 127, 602-608.
205. Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., ... Wang, K. (1995a). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, 269, 973-977.
206. Levy-Lahad, E., Wijsman, E.M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K.A., Weber, J.L., ... Schellenberg GD. (1995b). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*, 269, 970-973.
207. Li, Q.X., Whyte, S., Tanner, J.E., Evin, G., Beyreuther, K., & Masters, C.L. (1998). Secretion of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptide by activated human platelets. *Laboratory Investigation Journal of Technical Methods and Pathology*, 78, 461–469.
208. Liszewski, M.K., Post, T.W., & Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annuals Review of Immunology*, 9, 431-455.
209. Liu, D., & Niu, Z.X. (2009). The structure, genetic polymorphisms, expression and biological function's of complement receptor type I (CR1/CD35). *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31, 524-535.
210. Lobo, A., Launer, L.J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di Carlo, A., Breteler, M.M., ... Hofman, A. (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A

collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 54, S4-S9.

211. Lowenberg, K., & Waggoner, R. (1934). Familial organic psychosis (Alzheimer's type). *Archives of Neurology and Psychiatry*, 31, 737.
212. Lublin, D.M., Griffith, R.C., & Atkinson, J.P. (1986). Influence of glycosylation on allelic and cell-specific Mr variation, receptor processing, and ligand binding of the human complement C3b/C4b receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 5736-5744.
213. Ma, X.Y., Yu, J.T., Tan, M.S., Sun, F.R., Miao, D., & Tan, L. (2014) Missense variants in CR1 are associated with increased risk of Alzheimer' disease in Han Chinese. *Neurobiology of Aging*, 35, 443 e417–421.
214. Madi, N., Paccaud, J.P., Steiger, G., & Schifferli, J.A. (1991). Immune complex binding efficiency of erythrocyte complement receptor 1 (CR1). *Clinical and Experimental Immunology*, 84, 9-15.
215. Mahieux-Laurent, F., Fabre, C., Galbrun, E., Dubrulle, A., Moroni, C., & Groupe de réflexion sur les praxies du CMRR Ile-de-France Sud. (2009). Validation d'une batterie brève d'évaluation des praxies gestuelles pour Consultation Mémoire. Evaluation chez 419 témoins, 127 patients atteints de troubles cognitifs légers et 320 patients atteints d'une démence. *Revue Neurologique*, 165, 560-567.
216. Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240, 622–630.
217. Maier, M., Peng, Y., Jiang, L., Seabrook, T.J., Carroll, M.C., & Lemere, C.A. (2008). Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid beta plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*, 28, 6333–6341.

218. Malik, M., Simpson, J.F., Parikh, I., Wilfred, B.R., Fardo, D.W., Nelson, P.T., & Estus, S. (2013). CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *Journal of Neuroscience*, 33, 13320–13325.
219. Manos, P. (1998). 10-Point Clock Test Screens for Cognitive Impairment in Clinic and Hospital Settings. *Psychiatric Times*, 15.
220. Martinez, A., Otal, R., Sieber, B.A., Ibanez, C., & Soriano, E. (2005). Disruption of ephrin-A/EphA binding alters synaptogenesis and neural connectivity in the hippocampus. *Neuroscience*, 135, 451–461.
221. Masaki, T., Matsumoto, M., Nakanishi, I., Yasuda, R., & Seya, T. (1992). Factor I-dependent inactivation of human complement C4b of the classical pathway by C3b/C4b receptor (CR1, CD35) and membrane cofactor protein (MCP, CD46). *Journal of Biochemistry*, 111, 573–578.
222. Matsubara, E., Frangione, B., & Ghiso, J. (1995). Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 7563–7567.
223. Matsubara, E., Soto, C., Governale, S., Frangione, B., & Ghiso, J. (1996). Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. *The Biochemical Journal*, 316, 671–679.
224. Matsubara, E., Ghiso, J., Frangione, B., Amari, M., Tomidokoro, Y., Ikeda, Y., ... Shoji, M. (1999). Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Annals of Neurology*, 45, 537–541.
225. Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., ... Bateman, R.J. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330, 1774.
226. May, P.C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S.A., Poirier, J., Masters, J.N., & Finch, C.E. (1990). Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron*, 5, 831–839.

227. Mayeux, R., Tang, M.X., Jacobs, D.M., Manly, J., Bell, K., Merchant, C., ... Mehta, P.D. (1999). Plasma amyloid beta-peptide 1-42 and incipient Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 46, 412–416.
228. Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, pii: a006239.
229. McDermott, M., Wakelam, M.J., & Morris, A.J. (2004). Phospholipase D. *Biochemistry and Cell Biology*, 82, 225–253.
230. McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34, 939-944.
231. McMahon, H.T., Wigge, P., & Smith, C. (1997). Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Letters*, 413, 319–322.
232. Medof, M.E., Iida, K., Mold, C., & Nussenzweig, V. (1982). Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *The Journal of Experimental Medicine*, 156, 1739-1754.
233. Meng, X., & D'Arcy, C. (2012). Education and dementia in the context of the cognitive reserve hypothesis: a systematic review with meta-analyses and qualitative analyses. *PLoS One*, 7, e38268.
234. Mengel-From, J., Christensen, K., McGue, M., & Christiansen, L. (2011). Genetic variations in the CLU and PICALM genes are associated with cognitive function in the oldest old. *Neurobiology of Aging*, 32, 554, e7–11.
235. Merck, C., Charnallet, A., Auriacombe, S., Belliard, S., Hahn-Barma, V., Kremin, H., ... Sieguard, H. (2011). La batterie d'évaluation des connaissances sémantiques du GRECO (BECS-GRECO) : Validation et données normatives. *Revue de Neuropsychologie*, 3, 235-255.

236. Meunier, B., Quaranta, M., Daviet, L., Hatzoglou, A., & Leprince, C. (2009). The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170). *European Journal of Cell Biology*, 88, 91–102.
237. Middleton, L.E., & Yaffe, K. (2009). Promising strategies for the prevention of dementia. *Archives of Neurology*, 66, 1210-1215.
238. Miyata, M., & Smith, J.D. (1996). Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nature Genetics*, 14, 55-61.
239. Moise, P., Schwarzing, M., Um, M.Y., & the dementia Experts' Group. (2004). Dementia care in 9 OECD countries : a comparative analysis. Paris : Organisation de Cooperation et de Developpement Economiques (OCDE).
240. Morgan, B.P., Dankert, J.R., & Esser, A.F. (1987). Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. *Journal of Immunology*, 138, 246-253.
241. Morris, J.C., Roe, C.M., Xiong, C., Fagan, A.M., Goate, A.M., Holtzman, D.M., & Mintun, M.A. (2010). APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Annals of Neurology*, 67, 122–131.
242. Moulds, J.M., Moulds, J.J., Brown, M., & Atkinson, J.P. (1992). Antiglobulin testing for CR1-related (Knops/McCoy/Swain-Langley/York) blood group antigens: Negative and weak reactions are caused by variable expression. *Vox Sanguinis*, 62, 230–135.
243. Moulds, J.M., Nickells, M.W., Moulds, J.J., Brown, M.C., & Atkinson, J.P. (1991). The C3b/C4b receptor is recognized by the Knops, McCoy, Swain-Langley, and York blood group antisera. *Journal of Experimental Medicine*, 173, 1159–1163.
244. Munck, A., Bohm, C., Seibel, N.M., Hashemol-Hosseini, Z., & Hampe, W. (2005). Hu-K4 is a ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum. *The FEBS Journal*, 272, 1718–1726.

245. Murayama, O., Tomita, T., Nihonmatsu, N., Murayama, M., Sun, X., Honda, T., ... Takashima, A. (1999). Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 265, 61-63.
246. Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L.S., Vardarajan, B.N., Buross, J., ... Schellenberg, G.D. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43, 436-441.
247. Nathan, B.P., Bellosta, S., Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., & Pitas, R.E. (1994). Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, 264, 850-852.
248. Nelson, H.E. (1976). A modified Card Sorting Test sensitive to frontal lobe deficits. *Cortex*, 12, 313-324.
249. Nespoulous, J.L., Lecours, A.R., Lafond, D., Lemay, M.A., Puel, M., Joanette, Y., ... Rascol, A. (1992). Protocole Montréal-Toulouse d'examen linguistique de l'aphasie: MT-86 module standard initial, M1b (2e édition révisée par R.Béland et F.Giroux). Isbergues, France: Ortho Edition.
250. Ng, Y.C., Schifferli, J.A., & Walport, M.J. (1988). Immune complexes and erythrocyte CR1 (complement receptor type 1): effect of CR1 numbers on binding and release reactions. *Clinical and Experimental Immunology*, 71, 481-485.
251. Nickells, M., Hauhart, R., Krych, M., Bala Subramanian, V., Geoghegan-Barek, K., Marsh Jr, H.C., & Atkinson, J.P. (1998). Mapping epitopes for 20 monoclonal antibodies to CR1. *Clinical and Experimental Immunology* 112, 27-33. Erratum in *Clinical and Experimental Immunology*, 113, 315.
252. Oda, T., Wals, P., Osterburg, H.H., Johnson, S.A., Pasinetti, G.M., Morgan, T.E., ... Holtzman, T.F. (1995). Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Experimental Neurology*, 136, 22-31.

253. Offe, K., Dodson, S.E., Shoemaker, J.T., Fritz, J.J., Gearing, M., Levey, A.I., & Lah, J.J. (2006). The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *Journal of Neuroscience*, 26, 1596–1603.
254. Oliveira, T.G., Chan, R.B., Tian, H., Laredo, M., Shui, G., Staniszewski, A., ... Di Paolo, G. (2010). Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *Journal of Neuroscience*, 30, 16419–16428.
255. Oudin, S., Libyh, M.T., Goossens, D., Dervillez, X., Philbert, F., Réveil, B., ... Cohen, J.H. (2000). A soluble recombinant multimeric anti-Rh(D) single-chain Fv/CR1 molecule restores the immune complex binding ability of CR1-deficient erythrocytes. *Journal of Immunology*, 164, 1505-1513.
256. Paccaud, J.P., Carpentier, J.L., & Schifferli, J.A. (1988). Direct evidence for the clustered nature of complement receptors type 1 on the erythrocyte membrane. *Journal of Immunology*, 141, 3889-3894.
257. Pant, S., Sharma, M., Patel, K., Caplan, S., Carr, C.M., & Grant, B.D. (2009). AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nature Cell Biology*, 11, 1399–1410.
258. Pascual, M., Duchosal, M.A., Steiger, G., Giostra, E., Pechère, A., Paccaud, J.P., ... Schifferli, J.A. (1993a). Circulating soluble CR1 (CD35). Serum levels in diseases and evidence for its release by human leukocytes. *Journal of Immunology*, 151, 1702-1711.
259. Pascual, M., Lutz, H.U., Steiger, G., Stammers, P., & Schifferli, J.A. (1993b). Release of vesicles enriched in complement receptor 1 from human erythrocytes. *Journal of Immunology*, 151, 397-404.
260. Petersen, R.C., Smith, G.E., Waring, S.C., Ivnik, R.J., Tangalos, E.G., & Kokmen, E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of Neurology*, 56, 303-308. Erratum in *Archives of Neurology*, 56, 760.

261. Petersen, R.C. (2004). Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of Internal Medicine*, 256, 183-194.
262. Petersen, R.C. (2010). Alzheimer's disease: progress in prediction. *Lancet*, 9, 4-5.
263. Pottier, C., Wallon, D., Rousseau, S., Rovelet-Lecrux, A., Richard, A.C., Rollin-Sillaire, A., ... Hannequin, D. (2013). TREM2 R47H variant as a risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 35, 45-49.
264. Probst, A., Cartron, G., & Watier, H. (2006). Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux recombinants utilisés en oncologie. *Bulletin du Cancer*, 93, 107-112.
265. Profenno, L.A., Porsteinsson, A.P., & Faraone, S.V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biological Psychiatry*, 67, 505-512.
266. Qiu, C., Von Strauss, E., Bäckman, L., Winblad, B., & Fratiglioni, L. (2013). Twenty-year changes in dementia occurrence suggest decreasing incidence in central Stockholm, Sweden. *Neurology*, 80, 1888-1894.
267. Ramaglia, V., Wolterman, R., de Kok, M., Vigar, M.A., Wagenaar-Bos, I., King, R.H., ... Baas, F. (2008). Soluble complement receptor 1 protects the peripheral nerve from early axon loss after injury. *The American Journal of Pathology*, 172, 1043-1052.
268. Ramaroson, H., Helmer, C., Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., & Dartigues, J.F. (2003). PAQUID, Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort. *Revue Neurologique*, 159, 405-411.
269. Ramjaun, A.R., & McPherson, P.S. (1998). Multiple amphipysin II splice variants display differential clathrin binding: Identification of two distinct clathrin-binding sites. *Journal of Neurochemistry*, 70, 2369-2376.

270. Rebeck, G.W., Reiter, J.S., Strickland, D.K., & Hyman, B.T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: Allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, 11, 575–580.
271. Reiman, E.M., Chen, K., Liu, X., Bandy, D., Yu, M., Lee, W., ... Caselli, R.J. (2009). Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 106, 6820–6825.
272. Reisberg, B., Ferris, S.H., de Leon, M.J., & Crook, T. (1982). The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *The American Journal of Psychiatry*, 139, 1136-1139.
273. Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J.S., Winsor, B., & Munn, A.L. (2006). The BAR domain proteins: Molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 37–120.
274. Rey-Campos, J., Rubinstein, P., & Rodriguez de Cordoba, S. (1987). Decay-accelerating factor. Genetic polymorphism and linkage to the RCA (regulator of complement activation) gene cluster in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 166, 246-252.
275. Rey-Campos, J., Rubinstein, P., & Rodriguez de Cordoba, S. (1988). A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *Journal of Experimental Medicine*, 167, 664-669.
276. Reynes, M., Aubert, J.P., Cohen, J.H., Audouin, J., Tricottet, V., Diebold, J., & Kazatchkine, M.D. (1985). Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens. *Journal of Immunology*, 135, 2687-2694.
277. Riedel-Heller, S.G., Schork, A., Matschinger, H., & Angermeyer, M.C. (2000). Recruitment procedures and their impact on the prevalence of dementia. Results from the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+). *Neuroepidemiology*, 19, 130-140.

278. Ripoché, J., & Sim, R.B. (1986). Loss of complement receptor type 1 (CR1) on ageing of erythrocytes. Studies of proteolytic release of the receptor. *Biochemical Journal*, 235, 815-821.
279. Rødgaard, A., Christensen, L.D., Thomsen, B.S., Wiik, A., & Bendixen, G. (1991). Complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression on peripheral T lymphocytes: both CD4- and CD8-positive cells express CR1. *Complement and Inflammation*, 8, 303-309.
280. Rødgaard, A., Thomsen, B.S., Bendixen, G., & Bendtzen, K. (1995). Increased expression of complement receptor type 1 (CR1, CD35) on human peripheral blood T lymphocytes after polyclonal activation in vitro. *Immunology Research*, 14, 69-76.
281. Rodríguez de Córdoba, S., Dykman, T.R., Ginsberg-Fellner, F., Ercilla, G., Aqua, M., Atkinson, J.P., & Rubinstein, P. (1984). Evidence for linkage between the loci coding for the binding protein for the fourth component of human complement (C4BP) and for the C3b/C4b receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 81, 7890-7892.
282. Rodríguez de Córdoba, S., Lublin, D.M., Rubinstein, P., & Atkinson, J.P. (1985). Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *Journal of Experimental Medicine*, 161, 1189-1195.
283. Rodríguez de Córdoba, S., & Rubinstein, P. (1986). Quantitative variations of the C3b/C4b receptor (CR1) in human erythrocytes are controlled by genes within the regulator of complement activation (RCA) gene cluster. *Journal of Experimental Medicine*, 164, 1274-1283.
284. Rogaeva, E., Kawarai, T., & St George-Hyslop, P. (2006). Genetic complexity of Alzheimer's disease: successes and challenges. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9, S381-S387
285. Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., ... St George-Hyslop, P. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genetics*, 39, 168-177.

286. Rogers, J., Cooper, N.R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P.L., Styren, S.D., ... Ward, P. (1992). Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 89, 10016–10020.
287. Rogers, J., Li, R., Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Ahern, G., ... Sabbagh, M. (2006). Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiology of Aging*, 27, 1733–1739.
288. Ross, G.D., Winchester, R.J., Rabellino, E.M., & Hoffman, T. (1978). Surface markers of complement receptor lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 62, 1086-1092.
289. Ross, G.D., Yount, W.J., Walport, M.J., Winfield, J.B., Parker, C.J., Fuller, C.R., ... Lachmann PJ. (1985). Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. *Journal of Immunology*, 135, 2005-2014.
290. Roussel, M., & Godefroy, O. (2008). La batterie GREFEX: Données normatives. In O. Godefroy, & le GREFEX (Eds.), *Fonctions exécutives et pathologies neurologiques et psychiatriques* (pp.231-252). Marseille, France : Solal.
291. Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerrière, A., Vital, A., ... Campion, D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genetics*, 38, 24-26.
292. Rubenstein, L.Z., Harker, J.O., Salvà, A., Guigoz, Y., & Vellas, B. (2001). Screening for undernutrition in geriatric practice: developing the short-form mini-nutritional assessment (MNA-SF). *The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 56, M366–372.
293. Sadallah, S., Lach, E., Lutz, H.U., Schwarz, S., Guerne, P.A., & Schifferli, J.A. (1997). CR1, CD35 in synovial fluid from patients with inflammatory joint diseases. *Arthritis and Rheumatism*, 40, 520-526.

294. Sager, K.L., Wu, J., Leurgans, S.E., Rees, H.D., Gearing, M., Mufson, E.J., ... Lah, J.J. (2007). Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 62, 640–647.
295. Sakamoto, A., Sugamoto, Y., Tokunaga, Y., Yoshimuta, T., Hayashi K., Konno, T., ... Yamaqishi, M. (2011). Expression profiling of the ephrin (EFN) and Eph receptor (EPH) family of genes in atherosclerosis-related human cells. *The Journal of International Medical Research*, 39, 522–527.
296. Sambamurti, K., Granholm, A.C., Kindy, M.S., Bhat, N.R., Greig, N.H., Lahiri, D.K., & Mintzer, J.E. (2004). Cholesterol and Alzheimer's disease : clinical and experimental models suggest interactions of different genetic, dietary and environmental risk factors. *Current Drug Targets*, 5, 517–528.
297. Schellenberg, G.D., Deeb, S.S., Boehnke, M., Bryant, E.M., Martin, G.M., Lampe, T.H., & Bird, T.D. (1987). Association of an apolipoprotein CII allele with familial dementia of the Alzheimer type. *Journal of Neurogenetics*, 4, 97-108.
298. Scherzer, C.R., Offe, K., Gearing, M., Rees, H.D., Fang, G., Heilman, C.J., ... Lah, J.J. (2004). Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 61, 1200–1205.
299. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., ... Younkin, S. (1996). Secreted amyloid betaprotein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 2, 864–870.
300. Schifferli, J.A., Ng, Y.C., Estreicher, J., & Walport, M.J. (1988). The clearance of tetanus toxoid/anti-tetanus toxoid immune complexes from the circulation in humans. Complement- and erythrocyte complement receptor 1-dependent mechanisms. *Journal of Immunology*, 140, 899–904.
301. Schifferli, J.A., Ng, Y.C., Paccaud, J.P., & Walport, M.J. (1989). The role of hypocomplementaemia and low erythrocyte complement receptor type 1 numbers in

determining abnormal immune complex clearance in humans. *Clinical and Experimental Immunology*, 75, 329-335.

302. Schjeide, B.M., Schnack, C., Lambert, J.C., Lill, C.M., Kirchheiner, J., Tumani, H., ... Bertram, L. (2011). The role of clusterin, complement receptor 1, and phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein in Alzheimer disease risk and cerebrospinal fluid biomarker levels. *Archives of General Psychiatry*, 68, 207–213.
303. Schmidt, V., Sporbert, A., Rohe, M., Reimer, T., Rehm, A., Andersen, O.M., & Willnow, T.E. (2007). SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 32956–32964.
304. Schrijvers, E.M., Koudstaal, P.J., Hofman, A., & Breteler, M.M. (2011). Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA*, 305, 1322–1326.
305. Schrijvers, E.M., Verhaaren, B.F., Koudstaal, P.J., Hofman, A., Ikram, M.A., & Breteler, M.M. (2012). Is dementia incidence declining?: Trends in dementia incidence since 1990 in the Rotterdam Study. *Neurology*, 78, 1456-1463.
306. Schurmann, B., Wiese, B., Bickel, H., Weyerer, S., Riedel-Heller, S.G., Pentzek, M., ... Jessen, F. (2011). Association of the Alzheimer's disease clusterin risk allele with plasma clusterin concentration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 25, 421–424.
307. Seshadri, S., Fitzpatrick, A.L., Ikram, M.A., DeStefano, A.L., Gudnason, V., Boada, M., ... Breteler, M.M. (2010). Genome wide-analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*, 303, 1832–1840.
308. Shen, Y., Yang, L., & Li, R. (2013). What does complement do in Alzheimer's disease? Old molecules with new insights. *Translational Neurodegeneration*, 2, 21.
309. Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., ... St George-Hyslop, P.H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375, 754-760.

310. Shobab, L.A., Hsiung, G.Y., & Feldman, H. (2005). H. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*, 4, 841–852.
311. Signoret, J.L. (1991). Batterie d'Efficiencé Mnésique (BEM 144). Paris, France : Collection Esprit & Cerveau, Fondation IPSEN, Elsevier.
312. Sleegers, K., Lambert, J.C., Bertram, L., Cruts, M., Amouyel, P., & Van Broeckhoven, C. (2010). The pursuit of susceptibility genes for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends in Genetics*, 26, 84–93.
313. Small, S.A., & Duff, K. (2008). Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron*, 60, 534–542.
314. Song, W.C., Sarrias, M.R., & Lambris, J.D. (2000). Complement and innate immunity. *Immunopharmacology*, 49, 187–198
315. Spoelgen, R., Von Arnim, C.A., Thomas, A.V., Peltan, I.D., Koker, M., Deng, A., ... Hyman, B.T. (2006). Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *The Journal of Neuroscience*, 26, 418–428.
316. Steinbuch, M., & Audran, R. (1969). The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 134, 279–284.
317. St George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., Watkins, P.C., ... Drachman, D. (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*, 235, 885-890.
318. Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., & Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 90, 1977-1981.
319. Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Goedert, M., Saunders, A.M., Huang, D., Corder, E.H., ... Gilbert, J.R. (1994). Hypothesis: microtubule instability and paired

helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Experimental Neurology*, 125, 163-171, discussion 172-174.

320. Suh, J., Choi, S.H., Romano, D.M., Gannon, M.A., Lesinski, A.N., Kim, D.Y., & Tanzi, R.E. (2013). ADAM10 missense mutations potentiate β -amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron*, 80, 385-401.
321. Szymanski, M., Wang, R., Bassett, S.S., & Avramopoulos, D. (2011). Alzheimer's risk variants in the clusterin gene are associated with alternative splicing. *Translational Psychiatry*, 1, pii:e18.
322. Tanaka, N., Abe-Dohmae, S., Iwamoto, N., Fitzgerald, M.L., & Yokoyama, S. (2011). HMG-CoA reductase inhibitors enhance phagocytosis by upregulating ATP-binding cassette transporter A7. *Atherosclerosis*, 217, 407-414.
323. Tanaka, N., Abe-Dohmae, S., Iwamoto, N., & Yokoyama, S. (2011). Roles of ATP-binding cassette transporter A7 in cholesterol homeostasis and host defense system. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18, 274-281.
324. Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., ... Neve, R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 235, 880-884.
325. Tanzi, R.E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, pii:a006296.
326. Taylor, R.P., Martin, E.N., Reinagel, M.L., Nardin, A., Craig, M., Choice, Q., ... Ochs, H.D. (1997). Bispecific monoclonal antibody complexes facilitate erythrocyte binding and liver clearance of a prototype particulate pathogen in a monkey model. *Journal of Immunology*, 159, 4035-4044.
327. Thambisetty, M., Simmons, A., Velayudhan, L., Hye, A., Campbell, J., Zhang, Y., ... Lovestone, S. (2010). Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Archives in General Psychiatry*, 67, 739-748.

328. Thambisetty, M., An, Y., Nalls, M., Sojkova, J., Swaminathan, S., Zhou, Y., ... for the Baltimore Longitudinal Study of Aging and the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2013). Effect of complement CR1 on brain amyloid burden during aging and its modification by APOE genotype. *Biological Psychiatry*, 73, 422–428.
329. Thinakaran, G., & Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 29615–29619.
330. Tian, Y., Chang, J.C., Fan, E.Y., Flajolet, M., & Greengard, P. (2013). Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 110, 17071–17076.
331. Tinetti, M.E., McAvay, G.J., Murphy, T.E., Gross, C.P., Lin, H., & Allore, H.G. (2012). Contribution of individual diseases to death in older adults with multiple diseases. *Journal of the American Geriatrics Society*, 60, 1448-1456.
332. Tohyama, Y., & Yamamura, H. (2006). Complement-mediated phagocytosis— the role of Syk. *IUBMB Life*, 58, 304–308.
333. Tombaugh, T.N. (2004). Trail Making Test A and B Normative Data stratified by age and education. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 19, 203-214.
334. Tsutsui, K., Maeda, Y., Seki, S., & Tokunaga, A. (1997). cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue-specific expression of its multiple splice variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 178–183.
335. Van Der Linden, M., Coyette, F., Poitrenaud, J., Kalafat, M., Calicis, F., Wyns, C., ... les membres du GREMEM. (2004). L'épreuve de rappel libre / Rappel indicé à 16 items (RI/RI-16). In M. Van Der Linden, et les membres du GREMEM (Eds.), *L'évaluation des troubles de la mémoire* (pp. 25-47). Marseille, France : Solal.
336. Vasquez, J.B., Fardo, D.W., & Estus, S. (2013). ABCA7 expression is associated with Alzheimer's disease polymorphism and disease status. *Neuroscience Letters*, 556, 58–62.

337. Vedeler, C.A., Matre, R., Sadallah, S., & Schifferli, J. (1996). Soluble complement receptor type 1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with Guillain-Barré syndrome and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 67, 17-20.
338. Verghese, J., Lipton, R.B., Katz, M.J., Hall, C.B., Derby, C.A., Kuslansky, G., ... Buschke, H. (2003). Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. *New England Journal of Medicine*, 348, 2508–2516.
339. Verghese, P.B., Castellano, J.M., Garai, K., Wang, Y., Jiang, H., Shah, A., ... Holtzman D.M. (2013). ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 110, E1807–E1816.
340. Vik, D.P., & Wong, W.W. (1993). Structure of the gene for the F allele of complement receptor type 1 and sequence of the coding region unique to the S allele. *Journal of Immunology*, 151, 6214-6224.
341. Walker, E.S., Martinez, M., Brunkan, A.L., & Goate, A. (2005). Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios. *Journal of Neurochemistry*, 92, 294-301.
342. Walport, M.J. (2001a). Complement. First of two parts. *New England Journal of Medicine*, 344, 1058-1066.
343. Walport, M.J. (2001b). Complement. Second of two parts. *New England Journal of Medicine*, 344, 1140-1144.
344. Wang, L., Larson, E.B., Bowen, J.D., & Van Belle, G. (2006). Performance- based physical function and future dementia in older people. *Archives of Internal Medicine*, 166, 1115–1120.
345. Webster, S., Bradt, B., Rogers, J., & Cooper, N. (1997). Aggregation state-dependent activation of the classical complement pathway by the amyloid beta peptide. *Journal of Neurochemistry*, 69, 388-398.

346. Wechsler, D. (2001). MEM-III. Echelle Clinique de Mémoire de Wechsler - 3e édition. Paris, France : ECPA, Les Editions du Centre de Psychologie Appliquée.
347. Wechsler, D. (2008). WAIS-IV. Echelle d'Intelligence de Wechsler pour Adultes - 4e édition. Paris, France : ECPA, Les Editions du Centre de Psychologie Appliquée.
348. Weiner, M.W., Veitch, D.P., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Cairns, N.J., Green, R.C., ... Trojanowski, J.Q. (2013). The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimer's and Dementia*, 9, e111–e194.
349. Weis, J.H., Morton, C.C., Bruns, G.A., Weis, J.J., Klickstein, L.B., Wong, W.W., & Fearon, D.T. (1987). A complement receptor locus: genes encoding C3b/C4b receptor and C3d/Epstein-Barr virus receptor map to 1q32. *Journal of Immunology*, 138, 312–315.
350. Weisman, H.F., Bartow, T., Leppo, M.K., Marsh, H.C.Jr., Carson, G.R., Concino, M.F., ... Fearon, D.T. (1990). Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*, 249, 146-151.
351. Wijsman, E.M., Pankratz, N.D., Choi, Y., Rothstein, J.H., Faber, K.M., Cheng, R., ... Mayeux, R. (2011). Genome-wide association of familial late-onset Alzheimer's disease replicates BIN1 and CLU and nominates CUGBP2 in interaction with APOE. *PLoS Genetics*, 7, e1001308.
352. Wildsmith, K.R., Holley, M., Savage, J.C., Skerrett, R., & Landreth, G.E. (2013). Evidence for impaired amyloid beta clearance in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 5, 33.
353. Wilson, J.G., Murphy, E.E., Wong, W.W., Klickstein, L.B., Weis, J.H., & Fearon, D.T. (1986). Identification of a restriction fragment length polymorphism by a CR1 cDNA that correlates with the number of CR1 on erythrocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 164, 50-59.

354. Wilson, R.S., Mendes De Leon, C.F., Barnes, L.L., Schneider, J.A., Bienias, J.L., Evans, D.A., ... Bennett, D.A. (2002). Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *JAMA*, 287, 742-748.
355. Winblad, B., Palmer, K., Kivipelto, M., Jelic, V., Fratiglioni, L., Wahlund, L.O., ... Petersen, R.C. (2004). Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *Journal of Internal Medicine*, 256, 240-246.
356. Wixler, V., Laplantine, E., Geerts, D., Sonnenberg, A., Petersohn, D., Eckes, B., ... Aumailley, M. (1999). Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains. *FEBS Letters*, 445, 351-355.
357. Wolfsberg, T. G., Bazant, J. F., Blobel, C. P., Myles, D. G., Primakoff, P., & Whitt, J. M. (1993). The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: Structural, functional, and evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 90, 10783-10787.
358. Wong, W.W., Wilson, J.G., & Fearon, D.T. (1983). Genetic regulation of a structural polymorphism of human C3b receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 72, 685-693.
359. Wong, W.W., Kennedy, C.A., Bonaccio, E.T., Wilson, J.G., Klickstein, L.B., Weis, J.H., & Fearon, D.T. (1986). Analysis of multiple restriction fragment length polymorphisms of the gene for the human complement receptor type 1. Duplication of genomic sequences occurs in association with a high molecular mass receptor allotype. *The Journal of Experimental Medicine*, 164, 1531-1546.
360. Wong, W.W., Cahill, J.M., Rosen, M.D., Kennedy, C.A., Bonaccio, E.T., Morris, M.J., ... Fearon, D.T. (1989). Structure of the human CR1 gene. Molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. *The Journal of Experimental Medicine*, 169, 847-863.

361. Wyss-Coray, T., Yan, F., Lin, A.H., Lambris, J.D., Alexander, J.J., Quigg, R.J., & Masliah, E. (2002). Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99, 10837–10842.
362. Xiao, Q., Gil, S.C., Yan, P., Wang, Y., Han, S., Gonzales, E., ... Lee, J.M. (2012). Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 21279–21289.
363. Xing, Y.Y., Yu, J.T., Cui, W.Z., Zhong, X.L., Wu, Z.C., Zhang, Q., ... Tan, L. (2012). Blood clusterin levels, rs9331888 polymorphism, and the risk of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 29, 515–519.
364. Yamazaki, T., Masuda, J., Omori, T., Usui, R., Akiyama, H., & Maru, Y. (2009). EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility. *Journal of Cell Science*, 122, 243–255.
365. Yankner, B.A. (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*, 16, 921–932.
366. Yoon, S.H., & Fearon, D.T. (1985). Characterization of a soluble form of the C3b/C4b receptor (CR1) in human plasma. *Journal of Immunology*, 134, 3332–3338.
367. Zetzsche, T., Rujescu, D., Hardy, J., & Hampel, H. (2010). Advances and perspectives from genetic research: development of biological markers in Alzheimer's disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10, 667–690.
368. Zhang, Q., Yu, J.T., Zhu, Q.X., Zhang, W., Wu, Z.C., Miao, D., & Tan, L. (2010). Complement receptor 1 polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1348, 216–221.
369. Zhou, J., Fonseca, M.I., Pisalyaput, K., & Tenner, A.J. (2008). Complement C3 and C4 expression in C1q sufficient and deficient mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 106, 2080–2092.

370. Zhu, X.C., Yu, J.T., Jiang, T., Wang, P., Cao, L., & Tan, L. (2015). CR1 in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 51, 753-765.

Résumé :

Les études d'association pangénomiques ont permis d'identifier de nouveaux loci, dont le gène *CR1* comme associé au risque de maladie d'Alzheimer (MA). Le récepteur du complément de type 1 (CR1) est une glycoprotéine transmembranaire, présente notamment à la surface des érythrocytes (CR1E), mais également dans le plasma sous forme soluble (CR1s). Le CR1 peut prendre des formes fonctionnelles différentes, qui pourraient conférer des niveaux de risque différents, voire suggérer des mécanismes physiopathologiques de la MA. Si la relation entre *CR1* et MA est aujourd'hui connue, son mécanisme reste énigmatique. L'objectif principal de cette thèse était de corrélérer aux données génétiques (single nucleotide polymorphisms, polymorphismes de longueur, polymorphismes de densité), des éléments phénotypiques acquis comme la densité du CR1E ou le CR1s. D'une part, notre étude a montré grâce à deux méthodes différentes, que la MA était associée à une densité basse de l'isoforme long de CR1 (CR1*2) et suggérait l'existence d'allèle silencieux de *CR1*. D'autre part, nous avons montré que même si les critères génétiques étaient respectés, certains phénotypes pourraient être acquis au cours de la maladie. Nos résultats suggèrent que la MA résulterait plus d'une insuffisance d'épuration des dépôts amyloïdes, que d'une réponse excessive dont la réaction inflammatoire serait délétère. Bien que cette recherche génotypique et phénotypique, à potentiel physiopathologique, nécessite des investigations à plus grande échelle, elle pourra ouvrir la voie à des nouvelles pistes thérapeutiques qui ne peuvent être envisagées aujourd'hui faute de vue claire du ou des mécanismes en cause.

Titre en anglais

Genotype and Phenotype study of complement receptor type 1 polymorphisms (CR1,CD35) in Alzheimer's disease.

Abstract

Genome-wide association studies have identified new loci, including the *CR1* gene, as being associated with Alzheimer's disease (AD) risk. The complement receptor type 1 (CR1) is a transmembrane glycoprotein found on the surface of erythrocytes (CR1E), and also in the plasma in soluble form (CR1s). CR1 can have different functional forms that may confer different risk levels, or even suggest pathophysiological mechanisms of AD. Indeed, the relation between *CR1* and AD is now well established, the mechanism of this association remains to be elucidated. The main objective of this thesis was to correlate acquired phenotype elements, such as density of CR1E (number of CR1 antigenic sites per erythrocyte) or CR1s with genetic data (single nucleotide polymorphisms, length and density polymorphisms). Firstly, our study showed using two different methods that AD is associated with low density of the long CR1 isoform (CR1*2) and suggested the possible existence of silent *CR1* alleles. Secondly, we showed that although genetic criteria were met, some phenotypes could be acquired during the course of the disease. Our findings suggest that AD stems more from insufficient clearance of amyloid deposits than from excessive response whose inflammatory reaction might be deleterious. Although this genetic and phenotypic study with pathophysiological potential still require further investigation on a larger scale, she could pave the way towards new therapeutic avenues that currently remain elusive in the absence of a clear overview of the mechanisms involved.

Mots-clés

Maladie d'Alzheimer, Récepteur du complément type I, Complément, Risque génétique, Polymorphisme de longueur, Polymorphisme de densité, Single nucleotide polymorphisms, Inflammation, Plaques amyloïdes, Démence, Physiopathologie, Génotypes, Phénotypes.

Keywords

Alzheimer's disease, Complement receptor type I, Complement, Genetic risk, Length polymorphisms, Density polymorphisms, Single nucleotide polymorphisms, inflammation, Amyloid plaque, Dementia, Pathophysiology, Phenotypes, Genotypes.

Discipline

Médecine Interne, Gériatrie et Biologie du Vieillissement.

Intitulé et adresse de l'unité de recherche

EA 3797 (Santé publique, Vieillissement, Qualité de Vie et Réadaptation des sujets fragiles).
URCA – Faculté de Médecine. 51, rue Cognacq Jay - 51095 Reims Cedex.