



Office de la Propriété
Intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An agency of
Industry Canada

CA 2184635 C 2008/11/18

(11)(21) **2 184 635**

(12) **BREVET CANADIEN**
CANADIAN PATENT

(13) **C**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1995/03/06
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1995/09/14
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2008/11/18
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1996/08/30
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1995/000259
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1995/024504
(30) Priorité/Priority: 1994/03/07 (FR94 02603)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/68* (2006.01),
C12N 15/11 (2006.01), *C12P 19/34* (2006.01),
C07K 14/775 (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
AMOUYEL, PHILIPPE, FR;
CHARTIER-HARLIN, MARIE-CHRISTINE, FR

(73) Propriétaires/Owners:
INSTITUT PASTEUR DE LILLE, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM), FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : MARQUEURS GENETIQUES UTILISES CONJOINTEMENT POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE
D'ALZHEIMER, METHODE ET KIT DE DIAGNOSTIC
(54) Title: COMBINED USE OF GENETIC MARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE,
DIAGNOSTIC KIT AND METHOD

(57) Abrégé/Abstract:

L'invention a pour objet l'utilisation conjointe d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, D19S178 et APO CII pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, en particulier les allèles APO ε4, APO CII long (30+/-3 motifs répétitifs (CA)) et D19S178 court (moins de 167+/-4 nucléotides). L'invention a également pour objet un procédé de diagnostic de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'un kit pour la mise en oeuvre du procédé.



2184635

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/24504 (43) Date de publication internationale: 14 septembre 1995 (14.09.95)
---	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00259 (22) Date de dépôt international: 6 mars 1995 (06.03.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/02603 7 mars 1994 (07.03.94) FR (71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur-Calmette, F-59019 Lille Cédex (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): AMOUYEL, Philippe [FR/FR]; 75, rue du Quesne, F-59700 Marcq-en-Barœul (FR). CHARTIER-HARLIN, Marie-Christine [FR/FR]; 53/27, chemin des Crieurs, F-59650 Villeneuve-d'Asq (FR). (74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
--	--

(54) Title: COMBINED USE OF GENETIC MARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE, DIAGNOSTIC KIT AND METHOD

(54) Titre: MARQUEURS GENETIQUES UTILISES CONJOINTEMENT POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER, METHODE ET KIT DE DIAGNOSTIC

(57) Abstract

Combined use of at least two genetic markers selected from apolipoprotein E, D19S178 and apolipoprotein CII, for the diagnosis of Alzheimer's disease, especially apolipoprotein ϵ 4, long apolipoprotein CII (30+/-3 repeat patterns (CA) and short D19S178 (less than 167+/-4 nucleotides) alleles. The invention also concerns a method for the diagnosis of Alzheimer's disease and a kit for carrying out said method.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet l'utilisation conjointe d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, D19S178 et APO CII pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, en particulier les allèles APO ϵ 4, APO CII long (30+/-3 motifs répétitifs (CA)) et D19S178 court (moins de 167+/-4 nucléotides). L'invention a également pour objet un procédé de diagnostic de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'un kit pour la mise en œuvre du procédé.

- 1 -

Marqueurs génétiques utilisés conjointement pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, méthode et kit de diagnostic.

La présente invention concerne des marqueurs génétiques utilisés conjointement pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est une pathologie encéphalique caractérisée par une démence précoce avec une perte de neurones corticaux associée à des plaques de β -amyloïde, des enchevêtrements de neurofibrilles et dans la plupart des cas une angiopathie amyloïde. Il existe de fortes présomptions pour une influence génétique dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (WO 94/01772).

Cette composante génétique a été mis en évidence depuis de nombreuses années par des observations indirectes qui suggèrent une hérédité sur le mode autosomique dominant et une pénétrance dépendante de l'âge pour expliquer les liens familiaux entre des individus atteints par la maladie. Des études de génétique moléculaire récentes ont permis d'isoler des gènes putatifs de la maladie d'Alzheimer par la recherche de marqueurs génétiques polymorphes spécifiques de chromosomes (Bird et al., 1989, *Neurobiology of Aging* 10, 432-434).

Trois localisations chromosomiques ont été décrites comme étant impliquées dans les formes familiales à survenue précoce (âge de survenue inférieur à 60 ans) : le chromosome 21, le chromosome 14 et le chromosome 19. Deux études de liaison ont suggéré que la région chromosomique 19q13.2 était associée à des formes de maladie d'Alzheimer familiales à survenue tardive (Pericak-Vance et al, *Am. J. Hum. Genet.* (1991), 48, 1034-1050 ; Schellenberg et al., *Ann. Neurol.* (1992), 31, 223-227). Au sein de cette région chromosomique, le groupe de gènes d'apolipoprotéines (APO) E-CI-CI'-CII est une

zone candidate. Parmi les produits de ces gènes, l'apolipoprotéine E (APOE) est particulièrement impliquée dans le système nerveux : APOE est présente dans les plaques séniles et possède une affinité de liaison avec le peptide β -A4. Strittmatter et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (1993) 90, 177-181) ont décrit une fréquence augmentée de l'allèle $\epsilon 4$ du gène APOE dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer à survenue tardive. Cette observation a été confirmée pour les formes familiales (Corder et al., Science (1993), 261, 921-923) et les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer (Corder et al., Science (1993), 261, 921-923 ; Saunders et al., Neurology -(1993), 13, 1467-1472).

D'autre part, Schellenberg et al. (Ann. Neurol. 1992, 31:223-227) ont rapporté une association génétique entre l'allèle F du gène de l'apolipoprotéine CII (allèle du polymorphisme de longueur de fractions de restriction de TaqI (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism)) et la forme familiale de la maladie d'Alzheimer.

Les auteurs de la présente invention ont réalisé une étude portant sur deux populations d'origine différentes atteintes l'une d'une forme à survenue tardive de la maladie d'Alzheimer (après 65 ans), l'autre d'une forme à survenue précoce de la maladie d'Alzheimer (avant 65 ans), qui a permis d'établir une augmentation significative dans les deux groupes d'au moins deux des marqueurs génétiques suivants : allèle APOE $\epsilon 4$, allèle D19S178 court et allèle APO CII long.

La localisation sur le chromosome 19 des marqueurs APOE, APO CII (APO C2) et D19S178 est connue et décrite notamment par Williamson et al. (Cyto Genetic and Cell Genetic 1991, vol. 58, p. 1678).

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation conjointe d'au moins deux marqueurs

génétiques choisis parmi APOE, D19S178 et APO CII pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, les marqueurs génétiques étant de préférence constitués par APOE et D19S178 et/ou APO CII, de préférence encore par APOE, D19S178 et APO CII.

Plus spécifiquement, la présente invention a pour objet une utilisation conjointe d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, D19S178 et APO CII pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Les marqueurs génétiques utilisés sont avantageusement l'allèle APOE ε4, l'allèle D19S178 court et l'allèle APO CII long.

Le gène APOE possède trois allèles : ε2, ε3 et ε4.

Par allèle APO CII long, on entend un allèle comprenant plus de 30 ± 3 , de préférence plus de 30 répétitions consécutives des bases cytosine-adénine.

Par allèle D19S178 court, on entend un allèle comprenant moins de 167 ± 4 , de préférence moins de 167 nucléotides.

L'invention a également pour objet un procédé de diagnostic de la maladie d'Alzheimer caractérisé en ce que l'on recherche dans un échantillon biologique d'un patient la présence de deux au moins des marqueurs suivants : allèle APOE ε4, allèle D19S178 court et allèle APO CII long.

La méthode selon l'invention comprend avantageusement les étapes suivantes :

a) mise en contact de l'échantillon biologique contenant de l'ADN avec un couple d'amorces spécifiques permettant l'amplification de tout ou d'une partie des gènes APOE, D19S178 et/ou APO CII, l'ADN humain contenu dans l'échantillon ayant été éventuellement rendu accessible à l'hybridation et dans des conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN humain contenu dans l'échantillon biologique ;

b) amplification de l'ADN humain ;

c) révélation des produits d'amplification par les techniques appropriées ;

d) détection de la présence éventuelle des allèles APOE $\epsilon 4$, D19S178 court et APO CII long par les techniques appropriées.

5 Par diagnostic, au sens de la présente invention, on entend la confirmation de la présence d'au moins deux marqueurs choisis parmi ceux décrits ci-dessus chez des patients dont le tableau clinique fait état d'une symptomatologie pouvant être attribuée à la maladie 10 d'Alzheimer, ou encore une probabilité accrue chez des sujets de développer la maladie d'Alzheimer par rapport à l'ensemble d'une population, l'accroissement de la probabilité étant d'au moins un facteur 4.

15 L'échantillon biologique peut être le sang total, la fraction leucocytaire du sang ou encore un tissu à partir duquel de l'ADN peut être extrait, ou un fluide biologique.

20 Les amorces spécifiques utilisées dans le cadre de la présente invention peuvent être notamment celles décrites dans Roppers et al. (1991), Cytogenet. Cell Genet. 58, 751-784) pour D19S178, Hixson et al. (1990), J. Lipid. Res. 31, 545-548 pour APOE et Weber et al., Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396 pour APO CII.

25 D'autres amorces peuvent convenir, le critère de sélection des amorces étant qu'elles permettent l'amplification des parties des gènes APOE, D19S178 et APO CII comportant les polymorphismes respectifs : région 112-158 de APOE, extrémité 5' de APO CII.

30 Les allèles recherchés, notamment D19S178 et APO CII long, peuvent être mis en évidence par détermination de la longueur des fragments amplifiés, par exemple par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou par détermination de la séquence du fragment amplifié.

35 Les allèles recherchés, notamment APO $\epsilon 4$, peuvent également être détectés par la technique d'ana-

lyse de polymorphisme conformationnel de simples brins ("Single-Strand Conformation Polymorphism" (SSCP) telle que décrite par Masato Ozita et al., ou encore par hybridation de sonde à l'aide d'une sonde spécifique.

La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention, dans un échantillon comprenant les éléments suivants:

- des couples d'amorces spécifiques des gènes APOE, D19S178 et APO CII,
- les réactifs nécessaires pour effectuer une amplification d'ADN,
- éventuellement les réactifs permettant la détection des allèles APOE c4, D19S178 court et/ou APO CII long, par exemple des réactifs nécessaires à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la révélation des fragments après migration
- éventuellement des standards de référence constitués par les allèles sauvages des gènes mutants.

La présente invention a également pour objet des produits d'amplification de tout ou partie d'au moins deux gènes choisis parmi APOE, APO CII et D19S178.

Elle vise également une composition de diagnostic constituée d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, APO CII et D19S178.

Plus spécifiquement, l'invention a pour objet une composition comprenant les produits d'amplification de tout ou partie d'au moins deux gènes choisis parmi APOE, APO CII et D19S178, dans laquelle le produit d'amplification de APOE comprend la région 112-158 de APOE, le produit d'amplification de APO CII comprend l'extrémité 5' de APO CII, et le produit d'amplification de D19S178 comprend la totalité de D19S178.

On rapportera ci-après les résultats de l'étude des inventeurs auteurs de la présente invention, montrant l'implication des marqueurs APOE, APO CII et D19S178 dans la fréquence de survenue de la maladie d'Alzheimer.

5 . L'étude a porté sur deux groupes de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un groupe français composé de 36 patients atteints d'une forme à survenue tardive de la maladie d'Alzheimer (78 ± 9 ans ; intervalle 65-91 ans) et un groupe britannique composé de 34 patients présentant une forme à survenue précoce de la maladie d'Alzheimer (57 ± 4 ans ; intervalle : 49-64 ans) diagnostiquées par la clinique.

10 Ces deux groupes ont été comparés à deux groupes témoins de mêmes origine et âges, composés respectivement de 36 et 36 sujets dont l'environnement était identique à celui des patients atteints de la

maladie d'Alzheimer.

L'ADN génomique des patient a été extrait des leucocytes selon la méthode décrite par Marcadet et al. (Standardized Southern-Blot Workshop Technique-Histocompatibility Testing, Springer Verlag, New-York, Vol. 1). L'ADN génomique a été amplifié par PCR à l'aide d'un appareil d'amplification Perkin Elmer Cetus*.

Cinq marqueurs localisés dans la région chromosomique 19q13.2 ont été étudiés comme décrit dans les références correspondantes : deux marqueurs anonymes contenant des motifs (CA)_n, D19S47 (référencé sous Mfd 9 (Weber et al. (1989), Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396)) et D19S178 (référencé sous Mfd 139 (Ropers et al. (1991) Cytogenet. Cell Genet. 58, 751-784)), le polymorphisme APOE (Hixson et al. (1990) J. Lipid. Res. 31, 545-548), le polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) pour HpaI de l'extrémité 5' du locus du gène Apo CI (Nillesen et al. (1990), Nucleic Acids Res. 18, 3428) et le polymorphisme de motifs répétitifs (CA)_n dans le gène APO CII (référencé sous Mfd 5) (Weber et al., Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec un logiciel SAS version 6,04. Des analyses "Univariate" ont été réalisées à l'aide du test χ^2 de Pearson et du test exact de Fisher si nécessaire. Compte tenu de la rareté de la fréquence de certains allèles observée pour des polymorphismes microsatellites, les allèles ont été regroupés en deux groupes en fonction de leur nombre de nucléotides. Ainsi, D19S178 a été partagé en allèles longs (167 nucléotides et au-delà) et allèles courts (moins de 167 nucléotides), les allèles de l'extrémité 5' de APO CII à motifs répétitifs ont été divisés en allèles longs (30 motifs répétitifs et au-delà) et allèles courts (moins de 30 motifs répétitifs).

Les fréquences alléliques ont été calculées

* (marque de commerce)

WO 95/24504

par comptage des allèles.

Les résultats recueillis ont été traités par informatique en utilisant un modèle de régression logistique par étape à l'aide de tests statistiques de vraisemblance comme décrit par Breslow N.E. et al., Statistical Methods in Cancer Research, Vol. 1, pp. 192-247. L'analyse des déséquilibres de liaison a été faite comme décrit par Thompson E.A. et al., Am. J. Hum. Genet., 42, 113-124 et Hill, W.G., 1974, Hereditary, 33, 10 229-239.

Les fréquences des marqueurs D19S178, APOE, APO CI et APO CII ont été estimées à l'aide de l'algorithme décrit par McLean et Morton, Genet. Epidemiol. 2, 15 263-272, mis sous forme de programme informatique, comme décrit par Cox et al., Am. J. Hum. Genet., 43, 495-501.

Les fréquences estimées ont été comparées à celles attendues sur la base de l'équilibre du χ^2 de Pearson ou du test exact de Fischer.

Les résultats sont rapportés aux Tableaux I 20 à IV ci-après.

Le tableau I rapporte les distributions de fréquence allélique des polymorphismes génomiques pour des sujets sporadiques atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport à des témoins.

Aucune différence significative n'apparaît 25 entre les sujets et les témoins dans la distribution de l'allèle D19S47 pour les différentes populations. Dans la population à survenue tardive de la maladie, les fréquences des polymorphismes des gènes APOE et APO CII 30 étaient significativement différentes entre les sujets et les témoins : l'allèle APOE ε4 et les allèles APO CII longs étaient observés plus fréquemment chez les sujets à survenue tardive de la maladie d'Alzheimer que chez les témoins.

35 Les mêmes analyses ont été réalisées pour une

population indépendante du Royaume-Uni de sujets sporadiques à survenue précoce par rapport à des témoins. Cette population a été étudiée pour les deux limites d'âge de survenue généralement acceptées, c'est-à-dire moins de 5 65 ans et moins de 60 ans. Pour le groupe de sujets dont l'âge de survenue était inférieur à 65 ans, les distributions alléliques des polymorphismes des gènes D19S178, APOE et APOCI étaient significativement différentes entre les sujets et les témoins : les allèles D19S178 courts, 10 l'allèle APOE ε4 et la présence du site de restriction de HpaI dans APO CI (allèle 2) ont été plus fréquemment observés chez les malades où la survenue de la maladie était précoce que chez les témoins. Pour les groupes de sujets avec un âge de survenue de la maladie inférieure 15 à 60 ans, les distributions alléliques des polymorphismes des gènes D19S178, APOE et APO CI étaient similaires à celles du groupe de sujets avec un âge de survenue de la maladie inférieur à 65 ans.

Pour les analyses suivantes, la limite de 20 séparation en fonction de l'âge entre le groupe à survenue précoce et le groupe à survenue tardive était de 65 ans.

La fréquence observée pour l'allèle APOE ε4 dans le groupe de malades à survenue précoce n'était pas 25 significativement différente de celle observée dans le groupe de malades à survenue tardive, et dans les deux populations, l'allèle APOE ε2 était rare chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer.

Une corrélation inverse entre l'âge de 30 survenue et le nombre de copies de l'allèle APOE ε4 était observée dans la population à survenue tardive ($p < 0,026$), mais non dans la population à survenue précoce. Les âges moyens de survenue des sujets ayant deux allèles APO ε4, un allèle ε4 ou sans l'allèle APO ε4 étaient 35 respectivement de 70,5, 75,0 et 81,2 ans dans le groupe

à survenue tardive, et 58,5, 56,6 et 57,3 ans dans le groupe à survenue précoce.

Les résultats d'études de déséquilibre de liaison deux à deux entre les polymorphismes D19S178, 5 APOE, APO CI et APO CII sont rapportés au Tableau II.

Aucune déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg n'était observée. Un déséquilibre de liaison complet était retrouvé entre l'allèle APO ε4 et l'allèle 10 2 du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de APO CI dans les deux populations.

Dans la population témoin, un déséquilibre de liaison non significatif était retrouvé entre les polymorphismes D19S178 et APOE et à l'intérieur de l'ensemble APOE-CI-CI'-CII.

15 Les fréquences haplotypiques des 4 marqueurs (D19S178, APOE, APO CI et APO CII) ont été estimées comme rapporté au Tableau III ci-après.

Parmi les 24 haplotypes théoriques, seuls 15 étaient retrouvés avec l'algorithme par la méthode 20 décrite par McLean et Morton. Certains haplotypes étaient observés seulement chez les malades (n° 1, 2 et 7) et d'autres seulement chez les témoins (n° 12 et 13) à la fois dans la population à survenue tardive et celle à survenue précoce. L'haplotype n° 10 était deux fois plus 25 fréquent dans la population de malades à survenue tardive que dans la population à survenue précoce.

Le contenu d'informations du polymorphisme (Polymorphism Information Content (PIC)) et le degré 30 d'hétérozygotie obtenus en combinant ces 4 marqueurs étaient élevés dans les deux groupes.

Les différences dans la distribution des fréquences d'haplotypes estimées entre les malades et les témoins ont été testées à l'aide du test de rapport de probabilité (likelihood ratio test) avec un nombre de 35 degré de liberté égal à 15. Les résultats étaient de 88,4

10

et 93,2 respectivement pour le groupe de malades à survenue tardive et le groupe de malades à survenue précoce.

Pour estimer la tendance à développer la maladie ("odds ratio") pour les porteurs d'au moins un des allèles des différents génotypes, on a utilisé des modèles de régression logistique multiple par étapes, qui ont été adaptés aux observations.

Dans le groupe à survenue tardive, les "odds ratios" estimés étaient de 6,49 pour l'allèle APOE ε4 (intervalle de confiance à 95% = [1,68 ; 25,03]), 0,10 pour l'allèle APOE 2 (intervalle de confiance à 95% = [1,19 ; 10,70]).

Dans le groupe à survenue précoce, les "odds ratios" estimés obtenus étaient de 3,80 pour l'allèle APO ε4 (intervalle de confiance à 95% = [0,01 ; 0,85]) et 4,44 pour les allèles courts de D19S178 (intervalle de confiance à 95% = [1,27 ; 15,49]).

L'odds ratio (approximation du risque) ajusté pour les porteurs d'au moins un allèle APOE ε4 de développer une maladie d'Alzheimer sporadique de type à survenue précoce ou à survenue tardive était de 4.10 (intervalle de confiance à 95% = [1.84 ; 9.16]), comme estimé dans un modèle de régression, logistique adapté pour les données se rapportant à la population totale.

Pour les porteurs d'au moins un allèle, APOE ε2, l'odds ratio était de 0.11 (intervalle de confiance à 95% = [0,02 ; 0,50]), suggérant ainsi un effet protecteur de cet allèle.

Le risque de développer une maladie d'Alzheimer pour les porteurs d'au moins un allèle ε4 et d'au moins un des deux marqueurs : allèle D19S178 court et allèle APO CII long est rapporté au tableau IV ci-dessous.

Dans les deux populations, les risques "odds

"ratios" étaient significativement augmentés lorsque l'un de ces deux marqueurs était considéré en même temps que l'allèle APOE ε4.

Par exemple, le risque de déclarer une maladie d'Alzheimer à survenue tardive pour un sujet porteur d'au moins un allèle APOE ε4 et d'au moins un allèle APO CII long est maximal, cette configuration n'étant jamais retrouvée chez les témoins. Dans cette même population à début tardif, pour les porteurs d'au moins un allèle APOE ε4 et d'au moins un allèle D19S178 court, l'odds ratio s'élève à 14 (14.23). Cet odds est également augmenté (supérieur à 8 (8.68)) pour ces mêmes allèles dans le cas d'une maladie d'Alzheimer à début précoce.

Dans l'ensemble de la population, le risque de développer une maladie d'Alzheimer indépendamment de l'âge de survenue est augmenté pour les porteurs d'au moins un allèle APOE ε4 et d'au moins un allèle D19S178 court comme en témoigne l'élévation de l'odds ratio supérieur à 12 (12.46) ainsi que pour les porteurs d'au moins un APOE ε4 et d'au moins un allèle APO CII long (odds ratio supérieur à 9 (9.72)).

TABLEAU I

Distribution de fréquence allélique de polymorphismes génomiques pour des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport à des témoins

	D19S178			APOE			APOCI			APOCII		
	Allèle ^a	M.A.	Témoins	Allèle	M.A.	Témoins	Allèle*	M.A.	Témoins	Allèle†	M.A.	Témoins
Survenue tardive	n	.72	.76	n§	.72	.76	n	.72	.76	n‡	.72	.76
Age de survenue ≥ 66	Court	.43	.38	2	.01	.15	1	.71	.79	Court	.62	.78
	Long	.57	.62	3	.75	.80	2	.29	.21	Long	.38	.22
Survenue précoce	n†	.68	.72	n‡	.68	.72	n‡	.68	.72	n	.68	.72
Age de survenue < 66	Court	.57	.40	2	.01	.14	1	.56	.72	Court	.75	.75
	Long	.43	.60	3	.70	.72	2	.44	.28	Long	.25	.25
Survenue précoce	n	.50	.72	n#	.50	.72	n	.50	.72	n	.50	.72
Age de survenue < 60	Court	.56	.40	2	.02	.14	1	.56	.72	Court	.72	.75
	Long	.44	.60	3	.66	.72	2	.44	.28	Long	.28	.25

M.A. : Sujets atteints de la Maladie d'Alzheimer
n = nombre de chromosomes

* = Polymorphisme d'unités répétitives (CA)_n de D19S178
Court = nombre de nucléotides < 167 ; Long = nombre de nucléotides ≥ 167

† Site de restriction APO CI Hpa 1 = absence de site de restriction; 2 = présence de site de restriction

‡ Polymorphisme d'unités répétitives APO CII (CA)_n
Court = nombre d'unités répétitives < 30 ; Long = nombre d'unités répétitives ≥ 30

M.A. contre témoins = † p < .04 ; #p < .01 ; § p < .004 ; \$ p < .0001

TABLEAU II

Déséquilibres de liaisons deux à deux dans la région chromosomale 19Q13.2

Sujets survenue tardive	D19S178	APOE	APOCI	APOCII	Témoins survenue précoce D19S178		APOE	APOCI	APOCII
					D19S178	—	.185	—	.067
D19S178	—	.092	.069	.040	—	—	—	—	.160
APOE	3	18.5	—	0.89*	.254	APOE	100.0	—	.461*
APOCI	12.7	98.9	—	—	.348	APOCI	16.3	100.0	—
APOCII	3.7	33.9	42.3	—	—	APOCII	10.6	100.0	27.3

Sujets survenue précoce	D19S178	APOE	APOCI	APOCII	Témoins survenue tardive D19S178		APOE	APOCI	APOCII
					D19S178	—	.141	—	.046
D19S178	—	.171	.033	.030	—	—	—	—	.004
APOE	13.0	—	.726*	.114	APOE	42.9	—	—	.648*
APOCI	4.3	100.0	—	.050	APOCI	0.8	100.0	—	.232
APOCII	1.9	10.4	3.3	—	APOCII	9.6	100.0	48.6	.178

Polymorphisme APOE analysé en tant que marqueur bialélique (allèle 4 contre allèle 2 ou 3)

Au-dessus de la diagonale * représentant le coefficient standardisé de déséquilibre de liaisons

Au-dessous de la diagonale D' représentant le pourcentage du coefficient de déséquilibre de liaisons maximum des valeurs possibles aux fréquences alléliques données

TABLEAU III

Estimations du polymorphisme d'haplotype dans la région chromosome 19q13.2

Nombre	Polymorphismes	'Haplotypes										TOTAL
		D1S1358	APOE	APOCI	APOCH	Survenue tardive estimée	Survenue précoce estimée	Sujets Témoins	Sujets Témoins	Sujets Témoins	TOTAL estimée	attendu
1	S	4	2	L	.045	.000	.050	.000	.055	.000	.002	
2	L	4	2	L	.103	.000	.048	.000	.067	.000	.003	
3	S	4	2	S	.040	.000	.063	.032	.032	.016	.007	
4	L	4	2	S	.062	.053	.133	.107	.097	.079	.011	*
5	S	3	3	L	.103	.119	.052	.051	.097	.085	.052	
6	S	3	3	S	.214	.162	.261	.223	.215	.200	.176	
7	S	3	3	L	.014	.000	.026	.000	.006	.000	.017	
8	S	3	2	S	.000	.013	.106	.000	.061	.007	.056	
9	L	3	2	L	.083	.053	.074	.169	.073	.104	.081	
10	L	3	1	S	.308	.456	.172	.281	.251	.368	.271	
11	L	3	2	L	.014	.000	.000	.000	.012	.000	.026	
12	L	2	2	L	.000	.039	.000	.002	.000	.029	.005	
13	L	2	2	S	.000	.018	.000	.039	.000	.029	.016	
14	S	2	2	L	.014	.000	.000	.029	.004	.012	.003	
15	S	2	2	S	.000	.088	.015	.069	.010	.072	.010	*
H					.82	.74	.87	.82	.85	.85	.79	
PIC					.80	.71	.86	.80	.84	.84	.77	
Nombre de chromosomes					72	76	68	72	140	148		

H = degré d'hétérozygotie ; PIC = Information Contenue dans le Polymorphisme ;

Les fréquences attendues ont été calculées pour des témoins présentant le produit correspondant aux fréquences alléliques pour chaque polymorphisme.

Differences entre les fréquences d'haplotypes estimées et attendues, dans l'hypothèse d'un équilibre des liaisons (* p<0.01)

Estimation des "odds ratio" pour des sujets ayant au moins un allèle ε4 avec le polymorphisme de l'allèle D19S178 court ou le polymorphisme de l'allèle APO CII long

TABLEAU IV

		Maladie d'Alzheimer	Témoins	"Odds ratio"	p
Survenue tardive	n	36	38	14.23	< .002
	Avec au moins 1 allèle D19S178 court	.28	.03	∞	< .0002
Survenue précoce	n	31	.00		
	Avec au moins 1 allèle APOCII Long				
Total	n	34	36	8.68	< .0006
	Avec au moins 1 allèle D19S178 court	.44	.08	4.41	< .06
	Avec au moins 1 allèle APOCII Long	.21	.06		
		70	74	12.46	< .0001
	Avec au moins 1 allèle D19S178 court	.26	.03	9.72	< .00001
	Avec au moins 1 allèle APOCII Long	.36	.05		

REVENDICATIONS

1. Utilisation conjointe d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, D19S178 et APO CII pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

2. Utilisation selon la revendication 1 des marqueurs APOE et APO CII ou APOE et D19S178.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2 des marqueurs APOE, D19S178 et APO CII.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les marqueurs sont l'allèle APOE ε4, l'allèle D19S178 court et l'allèle APO CII long.

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'allèle D19S178 court comporte moins de 167 ± 4 nucléotides.

6. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'allèle D19S178 court comporte moins de 167 nucléotides.

7. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'allèle APO CII long comporte plus de 30 ± 3 motifs répétitifs (CA).

8. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'allèle APO CII long comporte plus de 30 motifs répétitifs (CA).

9. Méthode de diagnostic de la maladie d'Alzheimer, caractérisée en ce que l'on recherche dans un échantillon biologique d'un patient la présence de deux au moins des marqueurs suivants : allèle APOE ε4, allèle D19S178 court, et allèle APO CII long.

10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée par les étapes suivantes :

a) mise en contact de l'échantillon biologique contenant de l'ADN avec un couple d'amorces spécifiques permettant l'amplification de tout ou partie d'au moins deux des gènes APOE, D19S178 et APO CII, dans des conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN humain contenu dans l'échantillon biologique;

b) amplification de l'ADN humain;

c) révélation des produits d'amplification par les techniques appropriées;

d) détection de la présence éventuelle des allèles APOE ε4, D19S178 court et APO CII long par les techniques appropriées.

11. Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'ADN humain contenu dans l'échantillon a été rendu accessible à l'hybridation.

12. Méthode selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en ce que la présence des allèles APOE ε4, D19S178 court et APO CII long est mise en évidence par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

13. Kit pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des couples d'amorces spécifiques de deux au moins des gènes APOE, D19S178 et APO CII, et

- les réactifs nécessaires pour effectuer une amplification d'ADN.

14. Kit selon la revendication 13, comprenant en outre les réactifs permettant la détection des allèles APOE ε4 et D19S178 court ou APOE ε4 et APO CII.

15. Kit selon la revendication 13 ou 14, comprenant en outre des réactifs nécessaires à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la révélation des fragments après migration.

16. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, comprenant en outre des standards de référence constitués par les allèles sauvages des gènes mutants.

17. Composition comprenant les produits d'amplification de tout ou partie d'au moins deux gènes choisis parmi APOE, APO CII et D19S178, dans laquelle le produit d'amplification de APOE comprend la région 112-158 de APOE, le produit d'amplification de APO CII comprend l'extrémité 5' de APO CII, et le produit d'amplification de D19S178 comprend la totalité de D19S178.

18. Composition constituée d'au moins deux marqueurs génétiques choisis parmi APOE, APO CII et D19S178.