Impact des pesticides sur l'agrégation des amyloïdes dans différents modèles de maladies neurodégénératives

Pierre-André Lafon

▶ **To cite this version:**

Pierre-André Lafon. Impact des pesticides sur l'agrégation des amyloïdes dans différents modèles de maladies neurodégénératives. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT005 . tel-02868156

HAL Id: tel-02868156
https://theses.hal.science/tel-02868156

Submitted on 15 Jun 2020

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé spécialité Neurosciences

Préparée au sein de l'école doctorale CBS2 (Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé)

Et de l'unité de recherche INSERM U1198
Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives (MMDN)

Impact des pesticides sur l'agrégation des amyloïdes dans différents modèles de maladies neurodégénératives

Présentée par Pierre-André LAFON
Le 02 Avril 2019

Sous la direction du Dr. Véronique PERRIER

Devant le jury composé de

Pr. Michel VIGNES, PH, CNRS UMR5247 - IBMM, Montpellier	Président du jury
Dr. Anna BENCSIK, DR2, ANSES, Lyon	Rapporteur
Dr. Benoît SCHNEIDER, DR2, INSERM U1124 - TPCS, Paris	Rapporteur
Dr. Laurence GAMET - PAYRASTRE, CRCN, INRA U1331 - Toxalim, Toulouse	Examinateur
Dr. Carole CROZET, CRCN, INSERM U1183 – IRMB, Montpellier	Examinateur
Dr. Véronique PERRIER, CRCN, INSERM U1198 - MMDN, Montpellier	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé spécialité Neurosciences

Préparée au sein de l'école doctorale CBS2 (Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé)

Et de l'unité de recherche INSERM U1198
Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives (MMDN)

Impact des pesticides sur l'agrégation des amyloïdes dans différents modèles de maladies neurodégénératives

Présentée par Pierre-André LAFON
Le 02 Avril 2019

Sous la direction du Dr. Véronique PERRIER

Devant le jury composé de

Pr. Michel VIGNES, PH, CNRS UMR5247 - IBMM, Montpellier	Président du jury
Dr. Anna BENCSIK, DR2, ANSES, Lyon	Rapporteur
Dr. Benoît SCHNEIDER, DR2, INSERM U1124 - TPCS, Paris	Rapporteur
Dr. Laurence GAMET - PAYRASTRE, CRCN, INRA U1331 - Toxalim, Toulouse	Examinateur
Dr. Carole CROZET, CRCN, INSERM U1183 – IRMB, Montpellier	Examinateur
Dr. Véronique PERRIER, CRCN, INSERM U1198 - MMDN, Montpellier	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Financeurs

Mon financement de thèse a été octroyé par l'école doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (ED 168, CBS2) au travers d'une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, pour une durée de 3 ans et le Centre d'Excellence sur les maladies neurodégénératives de Montpellier (CoEN) pour un financement de 6 mois supplémentaires.

Les recherches effectuées au cours de ma thèse ont été financées par l'INSERM, la fondation Alliance Biosecure (AAP 2010 et APP 2012) ainsi que par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) sous les programmes « d'Investissements d'Avenir » (ANR-11-LABX-0021-LipSTIC et ANR-16-IDEX-0006, I-Site MUSE STEMPest).

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Anna BENCSIK et le Dr. Benoît SCHNEIDER d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Dr. Laurence GAMET-PAYRASTRE et le Dr. Carole CROZET d'être présentes en tant qu'examinatrices. Pr. Michel VIGNES je vous sais gré de présider mon jury de thèse.

Aux Drs. Audrey GABELLE DELOUSTAL, Carole CROZET et Freddy JEANNETEAU je vous suis très reconnaissant d'avoir suivi ce projet dès le début et de l'avoir enrichi grâce aux discussions lors des différents comités de thèse.

Je veux aussi remercier l'école doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (ED 168, CBS2) et le Centre d'excellence sur les maladies neurodégénératives de Montpellier (CoEN) qui ont permis le financement de ma thèse au sein du laboratoire Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives (MMDN - INSERM U1198).

Je remercie chaleureusement le Pr. Jean-Michel VERDIER, ancien directeur du MMDN, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de l'intérêt et du soutien qu'il a apporté à mon travail ainsi qu'à ma formation.

Je remercie infiniment le Dr. Véronique PERRIER, ma directrice de thèse. Merci beaucoup pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ces quatre années, si on compte le stage de master. Ta joie et ta bonne humeur au quotidien ont été un immense atout pour ma thèse sans lesquelles il aurait été difficile d'avancer. Merci d'avoir été à mon écoute et de m'avoir fait grandir scientifiquement, tes conseils ont été inestimables. Tu as toujours été très investie et disponible quand j'en avais besoin. Avec toutes les péripéties que nous avons connues ensemble, tu as toujours cru en moi, on a formé un bon binôme. Grâce à toi cette étape de ma vie scientifique a été une très belle aventure humaine.

Je remercie évidemment les Drs. Catherine DESRUMAUX et Laurent GIVALOIS dont les conseils au sein de leur équipe (EiAlz) ont été pertinents et bénéfiques pour ma

formation. Je remercie également toutes les personnes de l'équipe qui étaient présentes à mes côtés pendant cette thèse :

- Un très grand merci à Mme la Baronne du MMDN avec qui j'ai travaillé depuis le début. Ta présence au quotidien a été primordiale. Merci pour toutes les expertises que tu m'as transmises et de tous tes conseils qui m'ont été très utiles. Ta curiosité insatiable m'a permis d'avancer et de ne pas rester sur mes acquis. Nos soirées PET-blot jusqu'à 20h me manqueront énormément et surtout nos délires: « You wash it. You wash it. Three times… It smells like a flower… ».
- Merci à toi Joan, ça m'a fait plaisir d'apprendre qu'un catalan rejoignait l'équipe. Merci pour ta franchise, tes conseils scientifiques et ta grande franchise sur les dernières années de ma thèse.
- Marine, merci pour ta bonne humeur communicative. Travailler avec toi en début de thèse a été très formateur et très appréciable.
- Un grand merci à Yunyun pour son soutient. Malgré le choc culturel, que nous avons vite dépassé, nos deux années de travail ensemble nous ont permis de nous faire évoluer mutuellement. C'est avec un grand plaisir que je te rejoindrai dans ton laboratoire en Chine pour y effectuer mon post-doc. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite.
- Au « bleu » de l'équipe, Geoffrey, je te remercie pour les bons moments passés au laboratoire mais aussi ceux à l'extérieur. Merci pour ta bonne humeur quotidienne et les moments de rigolade. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite et une bonne fin de thèse qui je suis sûr sera grandiose.
- A Lucie, nouvelle doctorante de l'équipe, qui reprend le flambeau. Ta très bonne humeur pendant ces 6 derniers mois a été d'un très grand soutient pendant la rédaction de mon manuscrit de thèse. Travailler avec toi a été un grand plaisir. Je te souhaite le meilleur pour la suite et pour ta thèse.

Je voudrais aussi remercier tous les autres doctorants, postdoctorants et amis du laboratoire, avec qui j'ai partagé mon quotidien : Lucie C., Célia, Charleine, Clément et Simon mais aussi à ceux qui sont déjà partis comme Mireille et Marisa. Nos réunions doctorants, les soirées et pauses café avec vous me manqueront énormément. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Un immense merci à Chantal et Nathalie les gestionnaires du laboratoire. Je me souviendrai de toutes nos discussions et fou-rires durant ces années. Les moments passés avec vous, pendant nos repas, pauses café et soirées ont été des bons moments de convivialité et surtout de grands fous rires. Votre permanente bonne humeur va beaucoup me manquer. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je souhaite aussi remercier nos collaborateurs :

- Les Drs. Freddy JEANNETEAU et Margarita ARANGO avec la plateforme IPAM de l'IGF de Montpellier, qui nous ont permis de réaliser le suivi longitudinal d'aparition des agrégats par microscopie biphotonique.
- Le Dr. Josep-Vicent MERCADER pour nous avoir fournit les anticorps permettant la détection des anilinipyrimidines sur coupes de tissus.

La vie au laboratoire ne s'est pas simplement résumée à des expériences scientifiques au quotidien mais a aussi été une formidable aventure humaine. Je souhaiterais remercier l'ensemble des membres du laboratoire MMDN. J'aurais tant de gens de l'unité à remercier qu'il me faudrait presque une thèse entière pour tous les citer. Un immense merci à vous qui m'avez si bien accueilli au laboratoire et pour votre bienveillance à mon égard. Je n'oublierai pas les très bons moments passés avec vous au laboratoire.

Spéciale dédicace à Laetitia amie qui a suivi le même parcours que moi et qui depuis la L3 me supporte (presque) sans broncher. Ma petite NNH tant de péripéties vécut ensemble. Mais au final on s'en est très bien sortis. Merci pour ta bonne humeur, ta bienveillance, tes encouragements et tes conseils. Je te souhaite beaucoup de courage pour la suite.

Mention spéciale à toi Sylvain qui était présent au quotidien et qui a supporté tant de choses : les soirées et les weekends travaillés, mes sautes d'humeur,… Ton soutien moral et psychologique sont inestimables à mes yeux.

Pour finir, je tiens à remercier mes parents et mes beaux-parents. Vous avez toujours cru en moi et vous m'avez toujours soutenu dans mes choix. Si j'en suis là où j'en suis c'est grâce à vous.

Table des matières

Financeurs 3

Remerciements 4

Résumé en français 12

Résumé en anglais 14

Liste des figures 16

Liste des tableaux 20

Liste des abréviations 21

Avant-propos 24

Introduction 27

Chapitre I. Les maladies à prions 28

I. Les formes animales 28

I.1. La tremblante du mouton ou scrapie 28

I.2. L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) 31

I.3. Le dépérissement chronique des cervidés ou Chronic Wasting Disease (CWD) 34

II. Les formes humaines. 38

II.1. Les formes sporadiques 39

II.2. Les formes génétiques ou familiales 40

II.3. Les formes acquises ou infectieuses 41

II.3.1. Le kuru 41

II.3.2. Le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) 42

II.3.3. Les cas iatrogènes 44

III. Les lésions tissulaires 45

IV. Nature de l'agent infectieux 47

IV.1. Les différentes hypothèses 47

IV.2. Les rôles physiologiques de la PrP^C 49

IV.2.1. Rôle dans le métabolisme du cuivre et le stress oxydant 51

IV.2.2. Rôle dans la survie cellulaire 52

IV.2.3. Rôle dans la signalisation transmembranaire 54
IV.2.4. Rôle dans le développement des synapses 55
IV.3. Structures de la PrP 57
IV.3.1. Structure primaire 57
IV.3.2. Structure secondaire et tertiaire de la PrP^{C} 59
IV.3.3. Structure secondaire et tertiaire de la PrP^{Sc} 61
IV.3.4. Structure quaternaire de la PrP^{Sc} 62
IV.4. Propriétés physico-chimiques de la PrP^{C} et PrP^{Sc} 64
IV.5. Phénomène d'ensemencement 66
IV.6. Modèles de conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc} 67
IV.6.1. Modèle de conversion auto-catalytique 67
IV.6.2. Modèle de nucléation-polymérisation 68
IV.6.3. Modèle de nucléation assistée 69
IV.7. Propagation inter-cellules 71
IV.7.1. Propagation par contact cellule-cellule 71
IV.7.2. Endocytose des protéines prions 71
IV.7.3. Propagation par l'excrétion de vésicules 73
IV.7.4. Propagation par des nanotubes 74
IV.8. Propagation des prions : de la périphérie à la neuro-invasion 74
IV.9. Actions neurotoxiques de la PrP^{Sc} par perte ou gain de fonction de la PrP^{C} 78

V. Modèles murins des maladies à prions 79
V.1. Les souris consanguines 80
V.2. Les modèles de knock-out du gène *Prnp* (*$Prnp^{-/-}$*) 80
V.3. Les modèles transgéniques 81

Chapitre II. La maladie d'Alzheimer 82

I. La maladie d'Alzheimer 82
I.1. Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer 83
I.2. Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer 86
I.3. Les lésions tissulaires 89
I.3.1. Les plaques séniles 90
I.3.2. Les enchevêtrements neurofibrillaires 91
I.3.3. Localisation des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires 93

I.4. Hypothèses majeures sur l'origine de la maladie d'Alzheimer 95
I.4.1. L'hypothèse de la cascade amyloïde 95
I.4.2. L'hypothèse Tau 97

II. La protéine précurseur de l'amyloïde (APP) 99
II.1. Le gène de l'APP 99
II.2. Structure et domaines fonctionnels de l'APP 100
II.3. Trafic intracellulaire de l'APP 102
II.4. Métabolisme de l'APP 103
II.5. Les voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique 110
II.6. Rôles de l'APP et de ses produits de clivage 111
II.6.1. Rôles des fragments solubles sAPP 111
II.6.2. Rôles des fragments C-terminaux CTF83 et 99 113
II.6.3. Rôles du peptide P3 115
II.6.4. Rôles de l'AICD 116
II.6.5. Rôles du peptide $A\beta_{1-42}$ 116
II.7. Les récepteurs de l'Aβ 118
II.8. Clairance des peptides Aβ 123
II.8.1. La dégradation enzymatique des peptides Aβ 124
II.8.2. Elimination des peptides Aβ 127

III. Angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) 128

IV. Caractéristiques prion-like des peptides Aβ 131
IV.1. De l'Aβ soluble à l'Aβ insoluble 131
IV.2. Propagation des agrégats 133
IV.3. Phénomène d'ensemencement 134

V. Modèles transgéniques de la maladie d'Alzheimer 136

Chapitre III. Les pesticides : facteurs de risque pour les maladies neurodégénératives 139

I. Généralités 139
I.1. Marché des pesticides 140
I.2. Les différentes classes de pesticides 146

I.3. Tests toxicologiques et limites règlementaires 150
I.3.1. Toxicité aiguë (DL50) 151
I.3.2. Toxicité chronique (NOAEL) 152
I.3.3. Dose journalière admissible (DJA) 153
I.3.4. Limite maximale de résidus (LMR) 153

II. Les sources d'exposition aux pesticides 154
II.1. Pollution de l'air 156
II.2. Pollution des sols 158
II.3. Pollution des eaux 159
II.4. Résidus de pesticides dans les aliments 161

III. Impact des pesticides dans les maladies neurodégénératives 167
III.1. La maladie de Parkinson : cas de référence de l'exposition aux pesticides 167
III.2. Les maladies à prions 171
III.3. La maladie d'Alzheimer 173

Résultats 176

I. Dualité d'effet d'un herbicide biologique sur l'agrégation et la propagation des prions 177

II. Des résidus de fongicides exacerbent les dépôts amyloïdes chez les souris J20 en jouant sur la production et la clairance des peptides Aβ 210

Discussion et perspectives 280

I. Le bioherbicide A6 modifie l'agrégation et la propagation des prions 282

II. L'exposition chronique à un cocktail de résidus de fongicides exacerbe les marqueurs de la maladie d'Alzheimer 290

Annexes 299

I. Impact du cholestérol plasmatique dans la propagation des prions 300

II. Publications et communications 321

Bibliographie.....323

Résumé en français

La contamination des ressources en eau potable et des terres agricoles par les pesticides qui entrent dans la chaine alimentaire est un problème environnemental et sanitaire majeur. Des études épidémiologiques ont montré un lien entre l'exposition aux pesticides et la maladie de Parkinson, mais peu d'études sont disponibles sur les autres pathologies neurodégénératives. Notre hypothèse est que les pesticides pourraient être des facteurs déclencheurs ou aggravants, communs aux maladies neurodégénératives.

Au laboratoire, nous avons identifié par criblage sur la protéine prion, PrP, un composé nommé A6 décrit pour ses propriétés herbicides. A6 est un dérivé de l'α-terthiényl, molécule naturelle extraite des œillets d'inde. Le composé A6 a la capacité de promouvoir des formes oligomériques de la protéine prion sur une lignée cellulaire infectée par des prions. Mon projet de recherche visait à étudier les effets du bio-herbicide A6 sur l'agrégation et la propagation des prions *in vivo*. Des souris infectées par les prions ont été traitées avec différentes doses de cette molécule (5, 10 et 20 mg/kg). A la dose de 5 mg/kg, le composé A6 diminue le temps de survie des animaux avec une augmentation de la charge amyloïde. Tandis qu'aux plus fortes doses le traitement par A6 augmente la survie des souris avec une diminution de la charge amyloïde. Par un test de centrifugation rapide (RCA), nous avons montré que les faibles concentrations d'A6 favorisent la formation d'oligomères solubles de PrP^{Sc} SDS résistants (rSDS-PrP^{Sc}), alors que les plus fortes concentrations induisent des formes insolubles. L'analyse des cerveaux montre que seules les souris traitées avec 10 et 20 mg/kg d'A6 présentent des formes dimériques de rSDS-PrP^{Sc}. Cette étude montre une dualité d'effet du composé A6 : à de faibles doses, il favorise la pathologie probablement via des formes oligomériques solubles favorisant la réplication des prions. A de plus fortes doses, le composé A6 piègerait une partie de l'infectiosité des prions sous forme d'agrégats

amorphes SDS résistants, bloquant la réplication des prions, et ayant un effet « protecteur ».

Une recherche d'analogues structurels au composé A6 a permis l'identification d'une classe d'antifongiques commercialisés : les anilinopyrimidines. Cette famille est composée de 3 molécules : cyprodinil, mépanipyrim et pyriméthanil, qui luttent contre des champignons responsables de la pourriture grise des fruits. L'analyse de nombreux rapports a révélé que nous sommes chroniquement exposés à des résidus d'anilinopyrimidines. Dans cette deuxième étude, nous avons étudié l'effet de ces 3 fongicides dans plusieurs modèles de la maladie d'Alzheimer (MA) et les conséquences sur les marqueurs de la pathologie. Des études d'incubation *ex vivo* associées à des expériences de cinétique d'agrégation de peptides $A\beta_{1-42}$ ont montré que ces composés interagissent directement avec les peptides et accélèrent sa cinétique d'agrégation. Afin de déterminer leurs effets *in vivo*, nous avons exposé chroniquement des souris J20 à un cocktail des 3 fongicides via l'eau de boisson. Les souris ont été traitées à 0,1 µg/L (0,44 nM) de chaque composé, correspondant à la concentration maximale autorisée dans l'eau potable. Après 9 mois de traitement, l'analyse des souris J20 a montré une augmentation du nombre et de la surface des plaques amyloïdes au niveau de l'hippocampe et du cortex. Pour déterminer à quel moment se produit l'effet proagrégant du cocktail, une étude longitudinale d'apparition des agrégats à 3, 6 et 9 mois par microscopie biphotonique, a montré que les plaques amyloïdes augmentent entre 6 et 9 mois et que les pesticides exacerbent les agrégats vasculaires. Les anilinopyrimidines modifient la production et la clairance des peptides Aβ en augmentant l'expression de BACE1 et en diminuant l'expression de la néprilysine. Nos travaux montrent que les antifongiques aggravent la MA.

Résumé en anglais

Contamination of the drinking water and agricultural lands by the use of pesticides entering into the food chain is a major environmental and health problem. Epidemiological studies have shown a link between pesticide exposure and Parkinson's disease, but few studies are available on other neurodegenerative disorders. Our hypothesis is that pesticides may be triggering or aggravating factors common to neurodegenerative diseases.

In the laboratory, we identified by a screening on the prion protein, PrP, a compound named A6 described for its herbicidal properties. A6 is a derivative of α-terthienyl, a natural molecule extracted from marigolds. A6 compound has the ability to promote oligomeric forms of the prion protein on a prion-infected cell line. My research project aimed to study the effects of the bioherbicide A6 on prion aggregation and propagation *in vivo*. Mice infected with prions were treated with different doses of this molecule (5, 10 and 20 mg/kg). At the dose of 5 mg/kg, A6 compound decreases the survival time of animals with an increase of the amyloid load. While at the higher doses, A6 treatment increases survival of mice with a decreased amyloid burden. Using a rapid centrifugation assay (RCA), we have shown that low concentrations of A6 promote soluble SDS-resistant oligomers of PrP^{Sc} (rSDS-PrP^{Sc}), while higher concentrations favour insoluble forms. Brain analysis shows that only mice treated with 10 and 20 mg/kg of A6 exhibit dimeric forms of rSDS-PrP^{Sc}. This study shows a dual effect of A6 compound: at low doses, it strenghtens the pathology probably via soluble oligomeric forms favouring the replication of prions. At higher doses, A6 compound would trap part of the infectivity of prions as SDS resistant amorphous aggregates, blocking prion replication, and thus having a “protective” effect

A search for structural analogs of A6 compound allowed the identification of a class of commercial antifungals: anilinopyrimidines. This family is composed of 3 molecules:

cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil, used to fight against fungi responsible for the gray mold of fruits. Analysis of many reports have revealed that we are chronically exposed to residues of anilinopyrimidines. In this second study, we evaluated the impact of the 3 fungicides in several models of Alzheimer's disease (AD) and their consequences on pathological markers. *Ex vivo* incubation studies associated to kinetics of fibril formation of $A\beta_{1-42}$ peptides have shown that these compounds interact directly with Aβ peptides and accelerate its kinetics of aggregation. To determine their effects *in vivo*, we chronically exposed J20 mice to a cocktail of the 3 fungicides through drinking water. Mice were treated with 0.1 µg/L (0.44 nM) of each compound, corresponding to the maximal concentration allowed in the tap water. After 9 months of treatment, analysis of J20 mice showed an increase in the number and surface of plaques in the hippocampus and cortex. To determine the moment when the pro-aggregative effect occurs, a longitudinal study of appearance of aggregates at 3, 6 and 9 months by 2-photon microscopy was done. Our results showed that amyloid plaques increase between 6 and 9 months, and exacerbate vascular amyloid aggregates. Anilinopyrimidines modified the production and clearance of Aβ peptides by increasing BACE1 expression and by decreasing neprilysin expression. Our researches show a role of fungicides in the aggravation of AD.

Liste des figures

Figure 1. Mouton atteint de la tremblante. Cet animal présente un prurit au niveau de la tête et du dos. 28
Figure 2. Schéma des profils électrophorétiques de la PrP^{Sc} après digestion à la PK de la souche de tremblante classique et de la souche Nor98. 31
Figure 3. Bovin atteint par l'ESB.. 33
Figure 4. Western blot après digestion à la PK d'homogénats de cerveaux de bovins atteints de C, H ou L-ESB. 34
Figure 5. Carte de la répartition des cas de CWD en Amérique du Nord en 2018 35
Figure 6. Cervidés atteints de CWD. 36
Figure 7. Carte de la répartition des cas de CWD en Norvège en 2016 37
Figure 8. Schéma représentant les différentes mutations ou polymorphismes retrouvés sur la protéine prion humaine 41
Figure 9. Lésions tissulaires caractéristiques des ESST. 46
Figure 10. Schéma représentant deux hypothèses sur la nature de l'agent infectieux. 49
Figure 11. Schéma illustrant les étapes de maturation de la PrP^{C} et la localisation cellulaire de la PrP^{C} et de la PrP^{Sc}. 50
Figure 12. Schéma de la régulation de la S-nitrosylation du récepteur NMDA par la PrP^{C}. . 53
Figure 13. Illustration de la structure primaire de la PrP^{C} humaine. 58
Figure 14. Représentation des différents clivages de la protéine prion. 59
Figure 15. Structure tertiaire de la PrP^{C} 60
Figure 16. Modélisation du changement de structure précoce de la PrP^{C} en PrP^{Sc}. D..... 61
Figure 17. Structure tertiaire de la PrP^{Sc}. 62
Figure 18. Structure quaternaire de la PrP^{Sc} 63
Figure 19. Schéma du modèle d'élongation des fibres de PrP^{Sc}. 64
Figure 20. Western blot avant et après digestion à la PK.. 66
Figure 21. Modèle de conversion auto-catalytique. 68
Figure 22. Modèle de nucléation-polymérisation. 69
Figure 23. Modèle de nucléation assistée. 69
Figure 24. Synthèse de quelques voies de propagation des prions entre cellules. 73
Figure 25. Schéma de la neuro-invasion des prions à partir du système digestif 76
Figure 26. Construction des souris knock-out pour le gène *Prnp* de la protéine prion. 81
Figure 27. Les différentes mutations de l'APP. I 87
Figure 28. Mutations retrouvées au niveau de la PSEN1 (467 AA). 88
Figure 29. Mutations retrouvées au niveau de la PSEN2 (448 AA). 89
Figure 30. Les plaques séniles 91
Figure 31. Représentation des différentes isoformes de la protéine Tau 92
Figure 32. Les enchevêtrements neurofibrillaires. 93
Figure 33. Propagation des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires au cours de la MA 94

Figure 34. Hypothèse de la cascade amyloïde. 97
Figure 35. Hypothèse Tau. 99
Figure 36. Les 3 isoformes majoritaires de l'APP chez l'Homme 100
Figure 37. Structure 3D de l'APP et représentation des différents domaines fonctionnels... 102
Figure 38. Trafic intracellulaire de l'APP 103
Figure 39. Clivage de l'APP par l'α-sécrétase. 104
Figure 40. Clivage de l'APP par la β-sécrétase. 106
Figure 41. Clivage de l'APP par la γ-sécrétase. 108
Figure 42. Représentations du complexe de la γ-sécrétase.. 109
Figure 43. Voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique de l'APP 110
Figure 44. Schéma présentant différentes protéines adaptatrices se liant au domaine intracellulaire de l'APP, du CTF83 ou du CTF99. 114
Figure 45. Schéma représentant le rôle des récepteurs LRP1 et RAGE dans le transport des peptides Aβ à travers la BHE 127
Figure 46. Schématisation des dépôts amyloïdes autour des vaisseaux sanguins leptoméningiaux et corticaux 129
Figure 47. Structure primaire et secondaire du peptide $A\beta_{1-42}$ soluble 132
Figure 48. Structure quaternaire de l'$A\beta_{1-42}$ 133
Figure 49. Synthèse de quelques voies de propagation des peptides Aβ entre cellules.. 134
Figure 50. Evolution du tonnage total de pesticides vendus en France entre 1990 et 2016. . 141
Figure 51. Valeurs monétaires de la vente de pesticides en 2009, en millions d'euros, pour les 6 principaux pays agricoles européens 142
Figure 52. Evolution du tonnage de l'Union Européenne des produits phytosanitaires vendus entre 1990 et 2016. 142
Figure 53. Evolution du tonnage des produits phytosanitaires rapporté à la surface agricole (kg/ha) entre 1990 et 2016 en France 143
Figure 54. Evolution du tonnage des produits phytosanitaires rapporté à la surface agricole (kg/ha) entre 1990 et 2016 au niveau de l'Union Européenne 144
Figure 55. Evolution du tonnage mondial des produits phytosanitaires vendus entre 1990 et 2016 144
Figure 56. Classement des 10 pays achetant le plus de pesticides dans le monde en 2016... 145
Figure 57. Prévisions d'évolution du marché des biopesticides. 146
Figure 58. Evolution du tonnage de fongicides vendu en France entre 1990 et 2016 148
Figure 59. Evolution du tonnage d'herbicides vendu en France entre 1990 et 2016 149
Figure 60. Evolution du tonnage d'insecticides vendu en France entre 1990 et 2016 150
Figure 61. Schématisation du cycle des pesticides 155
Figure 62. Epandage aérien pouvant conduire à la pollution de l'atmosphère 156
Figure 63. Concentration moyenne en pesticides, en 2014 pour les eaux de surface (à gauche) et les eaux souterraines (à droite) en France 160
Figure 64. Liste des 15 pesticides ou résidus de pesticides les plus fréquemment détectés dans l'eau potable (%) 161
Figure 65. Résidus de pesticides quantifiés sur les fraises 162
Figure 66. Echantillons de fraises contenant des résidus de pesticides inférieurs ou égaux aux LMR (bleu) ou supérieurs aux LMR (orange). 164

Figure 67. Schéma illustrant les différents mécanismes moléculaires de la roténone et du paraquat..... 170
Figure 68. Hypothèse détaillée des effets intracellulaires possibles induits par un stress durant le stade adulte, après exposition à de fortes doses de phosmet *in utero*..... 172
Figure 69. Schéma illustrant la conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc} et le mécanisme de réplication de la PrP^{Sc}..... 177
Figure 70. Schéma décrivant les différents stratégies de criblage de composés anti-prions dans des cultures cellulaires infectées (N2a58/22L) 178
Figure 71. Criblage des composés identifiés *in sillico* dans des cellules N2a58/22L..... 179
Figure 72. Augmentation du temps de survie des souris inoculées avec des homogénats de cerveaux infectés avec la souche de prions 22L et prétraités avec le composé P30. 180
Figure 73. Schéma de la structure du composé MR100. 181
Figure 74. Schématisation du protocole RCA et précipitation induite par le composé MR100. 181
Figure 75. Détection d'oligomères rSDS-PrP^{Sc} sur des homogénats de cerveaux de patients atteints de formes sporadiques de la MCJ, avec le test RCA. 182
Figure 76. Criblage des 23 composés analogues au P30 dans des cultures cellulaires chroniquement infectées par des prions (N2a58/22L). 183
Figure 77. Représentation de la structure de l'α-terthiényl (A) et du composé A6 (B) 184
Figure 78. Etudes d'interaction du composé A6 avec des protéines recombinantes de souris (A) solubles (α-MoPrP) ou fibrillaires (MoPrP fibrils), et des fibrilles de hamster (B) de type R ou S 184
Figure 79. Diminution du temps de survie des souris inoculées avec la souche de prions 22L et traitées avec 5 mg/kg du composé A6..... 185
Figure 80. Augmentation du temps de survie des souris inoculées avec la souche de prions 22L et traitées avec 10 et 20 mg/kg du composé A6 186
Figure 81. Western blots d'homogénats de cerveaux des souris traitées avec 5, 10 ou 20 mg/kg du composé A6. 186
Figure 82. Le composé A6 induit des formes oligomériques rSDS-PrP^{Sc} solubles ou insolubles de manière dose-dépendant..... 187
Figure 83. Structures chimiques du composé A6 (A), du cyprodinil (B), du mépanipyrim (C) et du pyriméthanil (D)..... 210
Figure 84. Analyse des résidus de pesticides contenus dans des échantillons de fraises. 212
Figure 85. Le cyprodinil, le mépanipyrim et le pyriméthanil interagissent avec les plaques amyloïdes *ex vivo*..... 216
Figure 86. Accélération de la cinétique d'agrégation des peptides $A\beta_{1-42}$ en présence d'un cocktail de cyprodinil, mépanipyrim et pyriméthanil 217
Figure 87. Le traitement avec un cocktail de fongicides augmente les dépôts amyloïdes chez les souris J20..... 219
Figure 88. Augmentation de l'angiopathie amyloïde cérébrale chez les souris J20 traitées aux pesticides. 221
Figure 89. Augmentation du volume des plaques amyloïdes chez les souris J20 traitées..... 222
Figure 90. Le traitement aux fongicides augmente l'expression de BACE1 et diminue celle de la néprilysine des souris J20 223

Figure 91. Schéma de la structure du composé MR100 (A) et du composé A6. 284
Figure 92. Schéma de la structure du p-FTAA (A) et du composé A6 (B). 285
Figure 93. Marquage de fibrilles recombinantes de hamster de type S par la ThT (A) et par la composé A6 (B).. 286
Figure 94. Distribution du composé A6 dans le système nerveux central des larves de poisson zèbre. 289
Figure 95. Schéma récapitulatif global des effets obtenus par les composés anti-fongiques ou le bioherbicide A6 dans les différents modèles, prions et Alzheimer. 298
Figure 96. Taux plasmatiques en cholestérol et triglycérides des souris WT et PLTP$^{-/-}$ sous un régime standard.....302
Figure 97. Courbes de survie des souris WT et PLTP$^{-/-}$ après inoculation de la souche prion 22L par voie intracérébrale (A) ou intrapéritonéale (B). 302
Figure 98. Analyse des taux plasmatiques de cholestérol (A), de triglycérides (B), de cholestérol HDL (C) et de cholestérol non-HDL (D) de souris WT et PLTP$^{-/-}$ soumises à un régime standard (chow) ou enrichi en cholestérol (western). 303
Figure 99. Courbes de survie des souris WT et PLTP$^{-/-}$ après inoculation de la souche prion 22L en intrapéritonéal et soumises à un régime standard ou un régime riche en cholestérol. 304

Liste des tableaux

Tableau 1. Nombre de cas en France et dans le monde de transmissions par voie iatrogène de la MCJ en fonction du type de contamination. 45
Tableau 2. Récapitulatif des fonctions physiologiques de la PrP^{C}..... 55
Tableau 3. Différences de propriétés physico-chimiques entre la PrP^{C} et la PrP^{Sc}..... 65
Tableau 4. Rôles des fragments solubles sAPPα et sAPPβ. 112
Tableau 5. Rôles des fragments C-terminaux CTF83 et CTF99.....115
Tableau 6. Rôles et récepteurs des peptides $A\beta_{1-42}$. 122
Tableau 7. Classement des substances en différentes catégories de danger et estimation de la toxicité aiguë (ETA) en fonction des voies d'exposition.....152
Tableau 8. Exemples d'aliments sur lesquels des résidus de cyprodinil, mépanipyrim et de pyriméthanil ont été retrouvés 211
Tableau 9. Fréquences de détection des résidus de cyprodinil, de mépanipyrim et de pyriméthanil, et concentrations maximales mesurées (Cmax) dans l'alimentation et l'environnement européen.....213
Tableau 10. Exemples d'augmentation des seuils maximum de LMR du cyprodinil, du mépanipyrim et du pyriméthanil entre 2013 et 2018, pour certains fruits et légumes ...295

Liste des abréviations

5xFAD : souris transgénique contenant 5 mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA (APP : K670M/N671L, I716V, V717I et PSEN1 : M146L, L286V)

A

A : Alanine

AA : Acide Aminé

AAC : Angiopathie Amyloïde Cérébrale

ADAM : A Desintegrin And Metalloprotease.

AICD : APP intracellular domain

APH1 : Antrior pharynx-defective 1

ApoB : Apolipoprotéine B

ApoE : Apolipoprotéine E

APP : protéine précurseur de l'amyloïde

APP23 : Souris transgénique exprimant un hAPP contenant la mutation Swedish

Aβ : peptide β-amyloïde

$A\beta_{1-42}$: peptide β-amyloïde 1-42

B

BACE1 : Beta-site APP Cleaving Enzyme 1

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B cell lymphoma-2

C

C-ESB : Forme classique de l'ESB

CDF : Cellules dendritiques folliculaires

CDI : Conformation Dependent Immunoassay

chPrP : PrP de poulet

CL50 : Concentration létale médiane

CRND8 : Souris transgénique exprimant un hAPP contenant les mutations Swedish et Indiana

CWD : Chronic wasting disease ou dépérissement chronique des cervidés

D

DJA : Dose journalière admissible

DL50 : Dose létale médiane

E

EEG : Electroencéphalogramme

EGF : Epidermal growth factor

EGR-1 : Early Growth Response protein 1

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

ESB : Encéphalopathie spongiforme bovine

ESST : Encéphalopathie spongiforme subaigüe transmissible

F

fMCJ : Forme familiale de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

G

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

Grb2 : Growth fractor Receptor-bound protein 2

GSS : Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

H

H : Histidine

H-ESB : Forme atypique d'ESB

hAPP : forme humaine de l'APP

HBD1 : Heparin binding domain 1

HBD2 : Heparin binding domain 2

HDL : High density lipoprotein

hPrP^{C} : Forme humaine de la PrP^{C}

I

IFF : Insomnie fatale familiale

IDE : Insulin Degrading Enzyme

J

JIP1 : JNK-interacting protein 1b

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

K

K : Lysine

KHC : Kynesin heavy chain

KLC : Kynesin light chain

KPI : Kunitz-type protease inhibitor

L

L-ESB : Forme atypique d'ESB

LDL : Low density lipoprotein

LTP : Potentialisation à long terme

LMR : Limite maximale de résidus

M

M : Méthionine

MA : Maladie d'Alzheimer

MAP : Mitogen activated protein

MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob

MP : Maladie de Parkinson

N

N : Asparagine

NADPH oxydase : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase

NCAM : Neural cell adhesion molecule

NEP : Néprilysine

NMDA : N-méthyl-D-Aspartate

NO : Monoxyde d'azote

NOAEL : Non observable adverse effect level

NSC : Cellules souches neurales

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PCR : Polymerase chain reaction

PEN2 : Presinilin enhancer 2

PI3K : Phosphainositide3 kinase

PK : Protéinase K

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLTP : Phospholipid transfer protein

PMCA : Protein misfolding cyclic amplification

PRNP : Gène codant pour la protéine prion

PrP_{27-30} : Partie de la PrP^{Sc} résistante à la protéinase K

PrP^{C} : PrP cellulaire, isoforme physiologique de la protéine prion

PrP^{res} : Partie de la PrP^{Sc} résistante à la protéinase K

PrP^{Sc} : PrP scrapie, isoforme pathologique de la protéine prion

PSEN1 : préséniline 1

PSEN2 : préséniline 2

PTB : PhosphoTyrosine Binding domain

Q

Q : Glutamine

QuIC : Quaking induced conversion assay

R

R : Arginine

RC : Random coil

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RE : Réticulum endoplasmique

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RNAi : ARN interférant

ROS : Reactive oxygen species

$rPrP^{Sc}$: Partie de la PrP^{Sc} résistante à la protéinase K

RT-QuIC : Real-time quaking induced conversion assay

S

S : Sérine

SAF : Scrapie associated fibrils

SH2 : Src Homology 2 domain

Shc : Src homology 2 domain containing

sIF : Forme sporadique d'insomnie fatale

siRNA : petit ARN interférant

sMCJ : Forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

SNA : Système nerveux autonome

SNC : Système nerveux central

SOD : Superoxyde dismutase

SPR : Surface plamon resonance

$sPrP^{Sc}$: Partie de la PrP^{Sc} sensible à la protéinase K

STI1 : Stress induced phosphoprotein 1

T

TACE : Tumor necrosis factor-α-converting enzyme

Tg : Transgénique

Tg9949 : souris transgéniques surexprimant la $MoPrP^{C}$

ThS : Thioflavine S

ThT : Thioflavine T

TNFR1 : Tumor necrosis factor receptor type 1

TNFα : Tumor necrosis factor alpha

V

V : Valine

VLDL : Very low density lipoprotein

vMCJ : Nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

$wPrP^{C}$: PrP^{C} de wapiti

W

WT : Wild-type

Avant-propos

Durant la dernière décennie, un nouveau concept de mécanisme de propagation de type prion pour les maladies conformationnelles a émergé. De nombreuses études menées sur les protéines amyloïdes telles que la protéine Tau, le peptide $A\beta_{1-42}$ ou l'α-synucléine suggèrent qu'elles partagent des caractéristiques physiopathologiques avec les prions (Frost and Diamond, 2010; Kim and Holtzman, 2010). Tout comme la protéine prion pathologique, la PrP^{Sc}, le peptide $A\beta_{1-42}$ a la capacité d'exister sous une forme monomérique soluble, d'adopter une structure fibrillaire insoluble via des oligomères neurotoxiques (Aguzzi and Polymenidou, 2004), de produire des phénomènes d'ensemencements (Baskakov et al., 2002) et de se propager entre cellules (Gousset et al., 2009). Si ce concept est avéré et qu'il s'applique à un grand nombre de maladies conformationnelles, l'identification de facteurs causals communs impliqués dans les mécanismes d'agrégation et de propagation est une piste thérapeutique possible.

Les formes sporadiques de ces pathologies ont une origine multifactorielle et il est clair que nos conditions environnementales et notre mode de vie impactent sur leur développement. Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace pour soigner ces protéinopathies, et identifier les causes ou les facteurs aggravants représente une alternative intéressante pour prévenir leur développement. En effet, des études de projections sur l'incidence de la maladie d'Alzheimer entre 2010 et 2050 ont montré que retarder l'apparition de la maladie de 1, 2 ou 5 ans, pourrait réduire sa prévalence à moyen terme d'environ 10, 20 et 50%, respectivement (Mura et al., 2010).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux pesticides comme facteur environnemental susceptible d'influencer la physiopathologie des maladies neurodégénératives. Les pesticides sont des substances chimiques utilisées contre des

nuisibles pour garantir un rendement maximal des cultures. L'utilisation massive des produits phytosanitaires entraîne la pollution de notre environnement (eau, air, sols) mais aussi de notre alimentation. Les études visant à établir un lien entre les pathologies neurodégénératives et les pesticides se basent sur des expositions professionnelles à de fortes doses, et le plus souvent pour un composé précis. Cette corrélation est très bien établie pour la maladie de Parkinson, pour laquelle de nombreuses études épidémiologiques ont montré l'influence de la roténone et du paraquat dans l'étiologie de la maladie chez les populations agricoles exposées à de fortes doses (van der Mark et al., 2012). En 2012, la Mutualité Sociale Agricole (MSA) a reconnu la maladie de Parkinson comme maladie professionnelle pour les agriculteurs. Cependant, peu d'études sont disponibles concernant d'autres pathologies neurodégénératives. Ainsi, notre hypothèse de départ est que les pesticides peuvent être des facteurs aggravants pour d'autres maladies neurodégénératives telles que les maladies à prions et la maladie d'Alzheimer.

Dans ce contexte, nous nous sommes d'abord intéressés à un composé, nommé A6, un analogue structurel des α-terthiényls, des pesticides naturels à large spectre extraits des plantes (Nivsarkar et al., 2001). Ce composé A6 a été décrit comme possédant une activité herbicide (Friedman and Friedman, 1995). Des études préliminaires au laboratoire ont montré que le composé A6 est capable d'induire des formes multimériques de la protéine prion pathologique, PrP^{Sc}, dans des cultures de neuroblastomes infectés (Ayrolles-Torro et al., 2011). **Mon premier objectif de thèse a été de tester différentes doses de ce composé (5, 10 et 20 mg/kg) dans un modèle murin de maladie à prions et d'étudier leur impact sur l'agrégation et la propagation de la PrP^{Sc}.**

Par analogie de structure au composé A6 nous avons identifié une famille de pesticides, les anilinopyrimidines, qui sont des fongicides commercialisés depuis une vingtaine d'années. De nombreuses études ont montré la présence de résidus des 3 molécules

actives (le cyprodinil, le mépanipyrim et le pyriméthanil) dans l'ensemble de notre environnement (eau, air, sols, aliments) (Bermúdez-Couso et al., 2007; EFSA, 2018). L'analyse de l'étude TDS2 conduite par l'ANSES en 2011 a montré que le cyprodinil et le pyriméthanil faisaient partie des cinq résidus les plus fréquemment détectés dans l'alimentation française (ANSES, 2011). Les études associant l'exposition à de multiples résidus de pesticides et la maladie d'Alzheimer sont rares, voire inexistantes. **L'objectif de ce deuxième projet a été d'évaluer l'effet d'un cocktail des 3 anilinopyrimidines à de très faibles doses (0,1µg/L), sur la maladie d'Alzheimer, ainsi que leur impact sur l'agrégation des protéines amyloïdes.**

Dans l'introduction de la thèse, trois chapitres seront abordés : les maladies à prions, la maladie d'Alzheimer et les pesticides comme facteurs de risque pour les maladies neurodégénératives.

Introduction

Chapitre I. Les maladies à prions

Les maladies à prions ou encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles (ESST) sont des maladies neurodégénératives à évolution lente rencontrées majoritairement chez les mammifères dont l'issue est fatale. Ces maladies touchent aussi bien l'Homme que l'animal et, à ce jour aucun traitement curatif n'est disponible.

I. Les formes animales

I.1. La tremblante du mouton ou scrapie

La tremblante du mouton est la première ESST animale découverte. Décrite au XVIII^{ème} siècle au Royaume-Uni, elle touche essentiellement les ovins et les caprins. Le nom français de « tremblante du mouton » fait référence aux tremblements liés à cette maladie alors que le terme anglo-saxon « scrapie » fait référence au mot anglais « scrape » signifiant « gratter », car les animaux sont atteints de prurit (Pattison and Jones, 1967) (**Figure 1**). La période d'incubation, asymptomatique, est longue et peut s'étendre de 10 mois jusqu'à plusieurs années. Les signes cliniques de la pathologie sont variés : troubles du comportement, tremblements, perte d'équilibre, ataxie, prurit,… (Chelle, 1942; Pattison and Millson, 1961). La mort de l'animal survient 6 à 12 mois après l'apparition des premiers symptômes (Brugère-Picoux and Chatelain, 1995).

Figure 1. Mouton atteint de la tremblante. Cet animal présente un prurit au niveau de la tête et du dos (American Veterinary Medical Association).

Une des caractéristiques de la tremblante du mouton est l'accumulation de la protéine pathologique, la PrP^{Sc} dans les tissus périphériques tels que les follicules lymphoïdes associés au tractus digestif avant l'accumulation dans le cerveau conduisant à une neurodégénérescence (Aguilar-Calvo et al., 2014). Ces maladies sont infectieuses.

La transmission de la tremblante au sein des ovins a été montrée par des expériences d'inoculations intracérébrales d'extraits de cerveaux de moutons atteints de cette maladie chez la chèvre, qui a développé par la suite des symptômes identiques (Cuille and Chelle, 1939). Pattison et ses collaborateurs ont recueilli des membranes placentaires de brebis atteintes de tremblante et ont inoculé par voie intracérébrale ou orale des extraits de ces membranes à des chèvres et des moutons. Trente mois après l'inoculation, presque tous les animaux ont développé des symptômes de tremblante, montrant la transmission horizontale de la pathologie (Pattison et al., 1972). Cette transmission peut aussi se produire par l'intermédiaire du lait de mouton ou de chèvre (Konold et al., 2013, 2016), des fécès (Terry et al., 2011), de la salive (Tamgüney et al., 2012) ou encore de l'urine (Rubenstein et al., 2011).

Une autre étude a montré la possibilité de transmission inter-espèces de la tremblante du mouton. Ainsi, des macaques inoculés en intracérébral avec des extraits de cerveaux de moutons atteints de la tremblante ont présenté des symptômes de cette ESST après 10 ans d'incubation asymptomatique (Comoy et al., 2015). Cette étude a donc relancé le débat sur la possibilité de transmission de la tremblante du mouton à l'Homme.

Au sein d'un même troupeau de moutons, tous les animaux ne développent pas la tremblante. Afin de comprendre ces différences envers la maladie, des études de génotypage ont été réalisées sur le gène de la protéine prion. Les résultats ont montré qu'il existait plusieurs polymorphismes de la protéine prion (PrP), notamment aux codons 136 (A/V), 154 (R/H) et 171 (Q/R/H) expliquant les différences de sensibilité à la « scrapie ». Ainsi, Belt et ses collaborateurs ont montré qu'au sein d'un troupeau de Texels, les animaux possédant les

polymorphismes VRQ/VRQ, ARQ/VRQ ou AHQ/ARQ (aux codons 136, 154 et 171) sont plus sensibles à la maladie, avec une fréquence de détection de ces polymorphismes dans 79% des animaux malades et seulement dans 6% des animaux sains (Belt et al., 1995). Au contraire, les animaux homozygotes ARR/ARR sont tous sains montrant que ce polymorphisme confère une résistance envers la maladie (Belt et al., 1995). Ces résultats ont été confirmés sur d'autres races de moutons (Clouscard et al., 1995; Goldmann et al., 1994). Afin de limiter la propagation de cette pathologie, une politique de croisement de moutons « résistants » (polymorphisme ARR) a été mise en place en Europe.

Cependant, des formes atypiques de la pathologie ont été isolées, comme la souche Nor98 (Benestad et al., 2003). Au niveau des symptômes, la souche Nor98 se différencie principalement de la souche classique de la tremblante par une ataxie plus marquée et surtout par l'absence de prurit. L'âge d'apparition de la maladie est aussi modifié. En effet, les symptômes pour la souche classique apparaissent entre 2 et 5 ans, alors que pour les cas de Nor98, l'âge des animaux est supérieur à 4 ans (Benestad et al., 2008). Le profil électrophorétique de la PrP^{Sc} est aussi modifié dans cette souche atypique (Arsac et al., 2007) (**Figure 2**), lié à une sensibilité accrue à la digestion par la protéinase K (PK). Les animaux possédant le polymorphisme résistant à la tremblante du mouton classique (ARR) sont préférentiellement atteints par la souche Nor98 (Benestad et al., 2008). Des études de génotypage chez les moutons ARR ont conduit à l'identification d'un nouveau codon (141) qui serait impliqué dans la susceptibilité à cette nouvelle souche (Laude and Béringue, 2009; Moum et al., 2005). L'hypothèse majeure, à ce jour, est que la souche Nor98 serait une forme sporadique de la tremblante du mouton (Benestad et al., 2008).

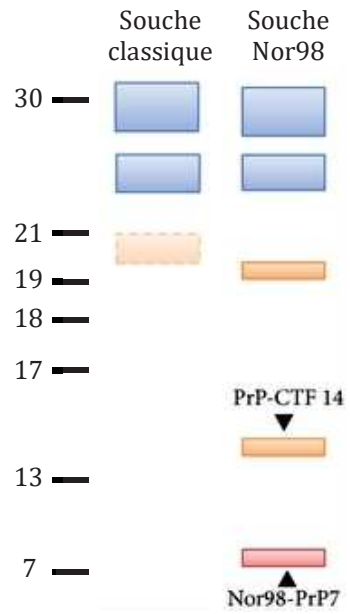


Figure 2. Schéma des profils électrophorétiques de la PrP^{Sc} après digestion à la PK de la souche de tremblante classique et de la souche Nor98. Le profil de la souche classique est composé de 3 bandes représentant les formes non-, mono- et bi-glycosylées de la protéine prion. Le profil de la souche Nor98, présente 2 bandes supplémentaires entre 7 et 17 kDa, représentant des fragments plus courts de la protéine prion, dus à une sensibilité accrue à la PK (adapté de Poggiolini et al., 2013).

I.2. L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

Les premiers cas d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ont été découverts au Royaume-Uni en 1986 (Wells et al., 1987). Cette épidémie est liée à l'utilisation de farines animales produites à partir de carcasses d'animaux morts ou malades afin d'enrichir le taux de protéines dans le lait des vaches laitières (Wilesmith, 1994; Wilesmith et al., 1988). Ces farines animales, contaminées par l'ESB, ont joué un rôle important dans la propagation et l'amplification de l'agent infectieux. L'origine de l'apparition de cette pathologie n'a pas été clairement identifiée, mais plusieurs hypothèses ont été proposées. L'hypothèse la plus admise par la communauté scientifique est que l'ESB proviendrait du passage de la tremblante du mouton aux bovins. L'ESB aurait débuté au Royaume-Uni et pas ailleurs car l'incidence de la tremblante du mouton était très importante et la quantité de carcasses de moutons utilisée pour la fabrication des farines animales y était élevée (Brown, 1997; Wilesmith et al., 1991). D'autres hypothèses ont été formulées comme le fait que l'ESB

pourrait provenir d'une apparition spontanée chez un bovin (forme sporadique), résulter de l'exposition aux organophosphorés (Purdey, 1994) ou encore être liée à la présence de bactéries dans le sol (*Acinetobacter*) capables de transmettre l'agent infectieux (Tiwana et al., 1999). Le fait que le foyer d'apparition de l'ESB se concentre uniquement au Royaume-Uni a invalidé ces différentes hypothèses car dans aucun autre pays des formes sporadiques d'ESST chez les bovins sont apparues, de même que les animaux traités avec des organophosphorés n'ont pas développé de pathologie. Concernant l'hypothèse bactérienne, il est peu probable que ces bactéries puissent résister aux traitements de décontamination (Brown, 2001).

Cette épidémie d'ESB ou encore appelée épidémie de la « vache folle » s'est répandue à l'ensemble de l'Union Européenne via l'exportation des farines animales contaminées, entraînant une crise sanitaire, économique et sociétale dans l'ensemble de l'Union Européenne (Wells and Wilesmith, 1995). Au total, 28 pays ont été touchés par cette épidémie avec 190 659 cas répertoriés dont 97% au Royaume-Uni, avec un pic de 37 280 cas en 1992 (organisation mondiale de la santé animale, www.oie.int). En France 1027 cas ont été répertoriés entre 1989 et 2016, dont 1 cas en 2016, ce qui en fait le deuxième pays le plus touché par cette épidémie (organisation mondiale de la santé animale, www.oie.int). Au niveau des signes cliniques, on peut remarquer l'apparition d'une hypersensibilité sonore et tactile des animaux atteints par l'ESB entraînant une modification de leur comportement tels que nervosité, agressivité ou au contraire anxiété et isolement des autre membres du troupeau. Avec la progression de la maladie, des troubles moteurs apparaissent avec une ataxie du train postérieur de l'animal couplée à une perte de poids significative liée à une fonte musculaire (**Figure 3**). L'animal décède 3 à 8 semaines après l'apparition des premiers symptômes.

Figure 3. Bovin atteint par l'ESB. Une ataxie musculaire des membres postérieurs et un amaigrissement sont visibles sur cette photographie (extrait de Larousse.fr).

Plusieurs formes d'ESB ont été décrites : une forme dite classique (C-ESB) liée à la contamination des farines animales et deux formes atypiques (L- et H-ESB) (Balkema-Buschmann et al., 2011; Biacabe et al., 2004; Boujon et al., 2016; Casalone et al., 2004). Ces formes atypiques sont nommées H pour « higher » et L pour « lower » par rapport à leur profil de migration électrophorétique après digestion à la protéinase K (PK), en comparaison avec le profil de la C-ESB (**Figure 4**). Une spécificité des formes atypiques est l'âge d'apparition des symptômes. En effet, les animaux atteints de C-ESB lors de l'épidémie avaient un âge moyen de 5 ans lors de l'apparition des premiers symptômes, alors que les animaux atteints de formes atypiques d'ESB sont plus âgés (âge moyen de 12 ans) (Boujon et al., 2016). Il semblerait qu'il n'y ait pas de lien entre la C-ESB et les L/H-ESB, ce qui suggère qu'il s'agirait plus de formes sporadiques d'ESST que de contaminations d'origine extérieure (Boujon et al., 2016).

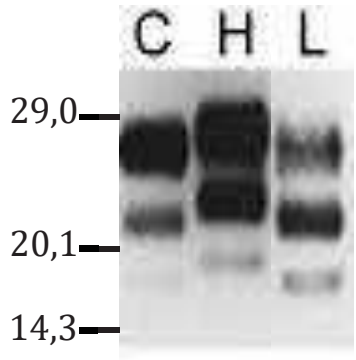


Figure 4. Western blot après digestion à la PK d'homogénats de cerveaux de bovins atteints de C, H ou L-ESB. Le profil de migration de la souche H-ESB migre à un poids moléculaire plus élevé que la souche C-ESB, et à l'inverse la souche L-ESB migre a un poids moléculaire plus faible par rapport à la souche classique (d'après Tester et al., 2009).

Des modèles primates non-humains ont été inoculés avec un homogénat de cerveau bovin positif pour la souche L-ESB par voie intracérébrale ou orale. Les résultats montrent l'apparition de symptômes neurologiques 19 mois après l'inoculation en intracérébral et environ 30 mois par voie orale (Mestre-Francés et al., 2012). Cette forme atypique d'ESB peut donc être transmise à d'autres espèces plus proches de l'Homme.

I.3. Le dépérissement chronique des cervidés ou Chronic Wasting Disease (CWD)

Le dépérissement chronique des cervidés est une ESST décrite pour la première fois en 1969 en Amérique du Nord touchant différentes espèces de cervidés tels que le wapiti, le cerf mulet, le cerf de Virginie ou encore l'élan et le renne. Depuis sa description, le nombre de cas répertoriés augmente chaque année résultant notamment de l'intensification des contrôles. Ainsi, 21 états américains et 2 provinces du Canada (**Figure 5**) sont touchés, et plus récemment le premier cas de CWD européen a été répertorié en Norvège (Benestad et al., 2016). Cette maladie peut aussi bien toucher des cervidés d'élevage que des animaux sauvages. Dans certaines régions américaines, la prévalence de CWD chez les cerfs peut avoisiner localement les 40%, avec une période d'incubation asymptomatique comprise entre 3 et 4 ans (Haley and Hoover, 2015). La mort de l'animal survient environ 1 à 8 mois après

l'apparition des premiers symptômes. Cette pathologie se caractérise par : un amaigrissement (cachexie), des troubles locomoteurs, des modifications du comportement ou encore une hypersalivation (Gilch et al., 2011) (**Figure 6**).

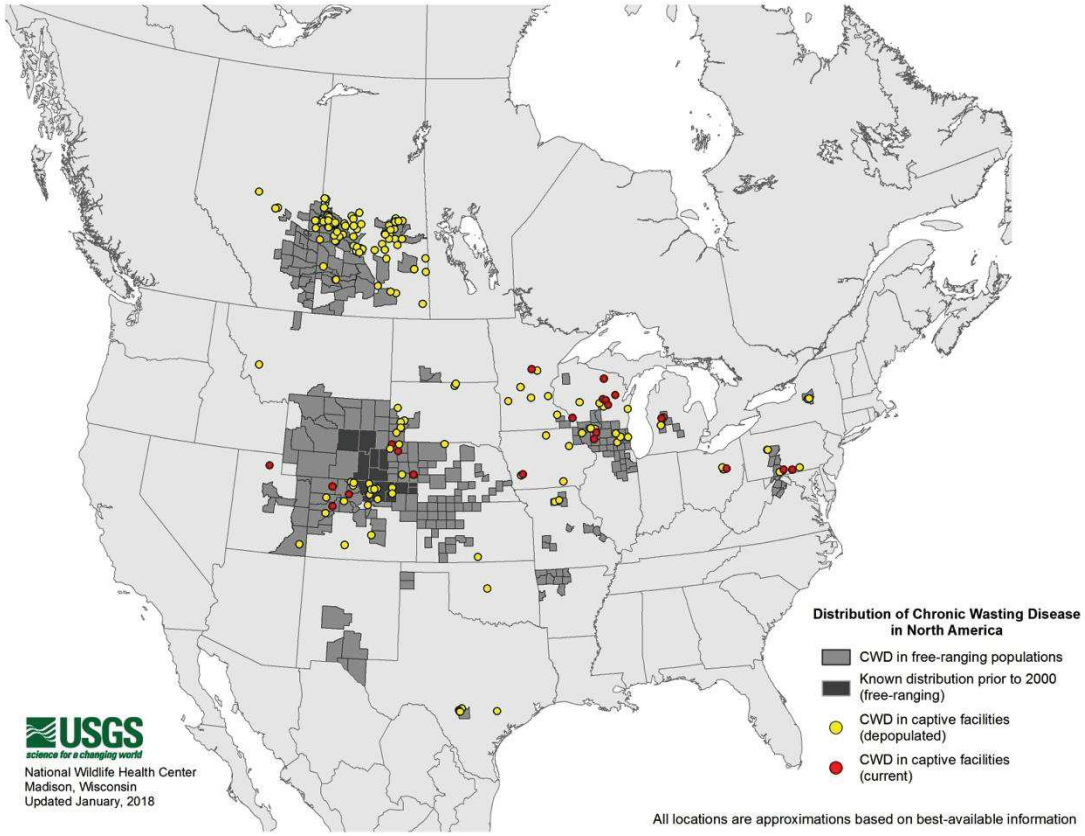


Figure 5. Carte de la répartition des cas de CWD en Amérique du Nord en 2018 (extrait de www.nwhc.usgs.gov).

Les ESST sont caractérisées par la présence majoritaire de la PrP^{Sc}, dans le système nerveux central (SNC). Cependant, dans le cas du CWD, l'agent infectieux est aussi présent dans les fluides biologiques tels que la salive, le sang, l'urine, les fécès et les tissus périphériques (muscles, rate,…) pouvant conduire à une transmission horizontale de la maladie. Des études de transmission réalisées sur des cervidés « naïfs » exposés à de la salive, du sang, de l'urine et des fécès de cervidés atteints de CWD, ont montré que l'exposition à la salive (par voie orale) et au sang (par transfusion sanguine) contaminés étaient capables de transmettre la pathologie (Mathiason et al., 2006). A ce jour, il n'a pas été observé de transmission de la pathologie à d'autres espèces sauvages (félins, oiseaux,…).

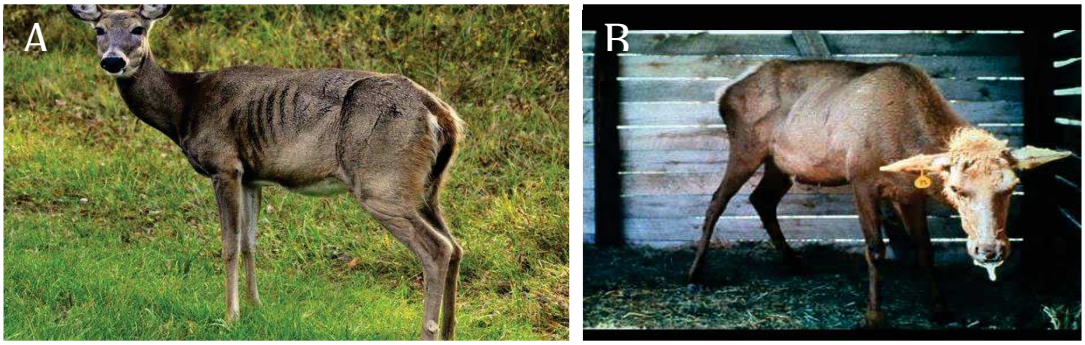


Figure 6. Cervidés atteints de CWD. A. Image d'un cerf mulet présentant une cachexie (www.uaotv.com). **B**. Illustration de l'amaigrissement et de l'hypersalivation chez un wapiti atteint de CWD (Photo du Dr. Elizabeth Williams, University of Wyoming. C/O CWD Alliance).

Aucun cas de transmission de CWD à l'Homme n'est connu, même dans la population de chasseurs ou de consommateurs de viande de cervidés (Belay et al., 2001; Xie et al., 2006). Le risque de transmission à l'Homme semble être très faible. Il a été démontré *in vitro*, par la technique de la PMCA (semblable à la technique de PCR, mais appliquée à l'amplification de protéines, en particulier la PrP^{Sc}) que le taux de conversion de la PrP^{C} humaine par la PrP^{Sc} du CWD était très faible (Barria et al., 2011). Cependant, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) recommande par précaution de ne pas consommer de viande provenant d'animaux contaminés (Haley et al., 2011). Des expériences complémentaires *in vivo*, ont été conduites sur des souris transgéniques exprimant soit la PrP^{C} de wapiti ($wPrP^{C}$) soit la PrP^{C} humaine ($hPrP^{C}$) sur un fond génétique knock-out (KO) pour la PrP murine ($Prnp^{-/-}$). Ces souris ont été inoculées en intracérébral avec un homogénat de cerveau de wapiti atteint de CWD. Les résultats ont montré qu'après 657 jours post-inoculation les souris exprimant la $hPrP^{C}$ n'ont pas développé les caractéristiques des maladies à prions, tandis que les souris exprimant la $wPrP^{C}$ ont développé des symptômes après 118 à 142 jours (Kong et al., 2005). Cependant, il aurait été intéressant dans cette étude de réaliser une PMCA afin de vérifier que les souris transgéniques $hPrP^{C}$ asymptomatiques n'avaient pas produit de $hPrP^{Sc}$. De même, il aurait été intéressant de vérifier cette hypothèse en réalisant un second passage de cette souche, c'est-à-dire l'inoculation d'homogénats de cerveaux de souris transgéniques $hPrP^{C}$ asymptomatiques

dans des souris de même fond génétique. Dans ce contexte, nous aurions pu observer l'apparition de symptômes. Ces résultats semblent conforter l'hypothèse qu'il existe une barrière inter-espèces de la transmission du CWD à l'Homme (Haley and Hoover, 2015).

La récente détection de cas de CWD en Norvège dans la région de Nordfjella (Benestad et al., 2016), relance l'inquiétude liée aux maladies à prions. Trois cas de CWD ont été confirmés dans cette région sur des rennes sauvages mais aussi 2 cas sur des élans sauvages d'une région plus lointaine, aux alentours de Trondhelm (**Figure 7).**

Figure 7. Carte de la répartition des cas de CWD en Norvège en 2016 (www.sciencemag.org).

En 2017, le ministère de l'Agriculture norvégien a donné l'autorisation d'abattre les 2000 rennes présents dans la région de Nordfjella (représentant 6% de la population sauvage) pour éviter la propagation de la maladie. L'analyse de différents tissus (cerveaux et ganglions) provenant des rennes et des élans malades a mis en évidence plusieurs différences (S. Benestad, communication orale, congrès Prion 2018, Saint-Jacques de Compostelle ; Pirisinu et al., 2018) :

- L'âge de détection du CWD : chez les rennes, la pathologie semble se déclarer chez les animaux jeunes/adultes alors que les élans atteints de CWD étaient âgés.
- La distribution des prions : principalement dans les tissus lymphoïdes et dans le cerveau pour les rennes et exclusivement cérébrale pour les élans.

- La distribution des prions dans le cerveau : les plaques sont disséminées et retrouvées majoritairement au niveau du tronc cérébral chez les rennes atteints de CWD alors que les plaques sont plutôt intraneuronales dans l'ensemble du cerveau des élans infectés.
- Les profils électrophorétiques : les rennes malades ont le même profil que les animaux atteints de CWD d'Amérique du Nord. Le profil électrophorétique des élans présente plusieurs bandes de poids moléculaire plus faibles avec un segment N-terminal tronqué.

L'ensemble de ces éléments permet de montrer que les cas de CWD détectés chez les rennes et les élans n'ont pas les mêmes caractéristiques et que, par conséquent, il s'agirait de souches différentes de la maladie. L'expérience et les données accumulées ces 50 dernières années en Amérique du Nord sur le CWD ne pourront pas être directement appliquées sur les souches de CWD norvégiennes. De nouvelles expériences devront être conduites concernant l'infectiosité, la transmission inter-espèces, la génétique, le potentiel zoonotique et la pathogenèse de cette maladie. Si la Norvège se préoccupe beaucoup de cette « nouvelle maladie », les autres pays de l'Union Européenne en font peu de cas.

II. Les formes humaines.

Les formes humaines des maladies à prions sont rares et leur prévalence est estimée à 1 à 2 cas par an par million d'habitants. Il existe plusieurs formes d'ESST chez l'Homme. La plus connue d'entre elles est la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) décrite en même temps par le docteur Creutzfeldt (Creutzfeldt, 1920) et le docteur Jakob (Jakob, 1921). Ces pathologies sont classées en trois catégories : les formes sporadiques (les plus fréquentes avec 85% des cas), les formes génétiques ou familiales (10 à 15% des cas) et les formes acquises ou infectieuses (minoritaires pouvant aller jusqu'à 5% des cas). Le point commun entre ces

différentes formes d'ESST est une phase asymptomatique longue (de quelques années à plusieurs décennies) et une phase symptomatique courte (en moyenne 13 mois).

II.1. Les formes sporadiques

Les formes d'ESST dites sporadiques sont les plus fréquemment retrouvées dans la population et représentent 85% des cas. Elles atteignent des individus de manière isolée entre 45 et 75 ans (âge moyen 60 ans), sans prévalence sur le sexe. Les causes de l'apparition de ces formes d'ESST restent inconnues mais plusieurs hypothèses ont été formulées comme une mutation somatique du gène *PRNP* codant pour la protéine prion (PrP^{C}) ou la conversion spontanée de la PrP^{C} en PrP^{Sc} (protéine prion pathologique) (Wadsworth and Collinge, 2007). Le polymorphisme qui existe au codon 129 du gène *PRNP* (MM, VV ou MV) joue un rôle dans la susceptibilité au développement de formes sporadiques de maladie à prions. Ainsi, 38% de la population européenne est homozygote MM, 11% VV et 51% hétérozygote MV (Wadsworth and Collinge, 2007). D'après les cas recensés, 88% des patients atteints de formes sporadiques de MCJ (sMCJ) sont homozygotes pour le codon 129 (71% MM et 17% VV), soulignant que l'homozygotie MM au codon 129 est un facteur de risque pour la sMCJ (Alperovitch et al., 1999; Head and Ironside, 2012; Palmer et al., 1991). Il existe deux formes d'encéphalopathies sporadiques :

- La forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob : les symptômes observés sont une modification du comportement, une démence progressive, une myoclonie, une ataxie et des tremblements. La mort survient 3 à 6 mois après l'‘apparition des premiers signes cliniques (Wadsworth and Collinge, 2007).
- La forme sporadique de l'insomnie fatale (sIF) se traduit par des troubles du sommeil (insomnie) couplés à une démence. Seulement 9 cas ont été répertoriés (Gambetti et al., 2003).

II.2. Les formes génétiques ou familiales

Les formes familiales de maladies à prions humaines représentent 10 à 15% des ESST. Elles se caractérisent par une mutation autosomique dominante du gène *PRNP* codant pour la protéine prion. En fonction des symptômes rencontrés, ces formes sont classées différemment : la forme familiale de la MCJ (fMCJ), le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) ou l'insomnie fatale familiale (IFF).

Plusieurs mutations ont été recensées pour la fMCJ mais la majorité des cas sont dus à trois mutations : la D178N, la E200K et la V210I (Mastrianni, 2010). Les symptômes observés dans ces formes familiales sont très proches de la sMCJ. Selon le polymorphisme au codon 129 certaines mutations donneront une maladie à prions différente. Ainsi, la mutation D178N sur la protéine prion associée à un génotype MM au codon 129 conduira à une IFF (Sun et al., 2015), alors qu'un génotype homozygote VV ou hétérozygote MV conduira plutôt à une fMCJ (Goldfarb et al., 1992; Marcon et al., 2014). Les symptômes de l'IFF sont très proches de la sIF mais des troubles moteurs y sont associés. Pour le GSS, plusieurs mutations ont été décrites, mais la plus fréquente est la mutation P102L. La symptomatologie de cette pathologie est difficile à préciser et selon la mutation concernée le tableau clinique sera modifié. Les seuls signes cliniques communs aux différentes mutations du GSS sont une démence et un syndrome pyramidal (Hainfellner et al., 1995; Mead, 2006; Yamada et al., 1999).

En plus de ces mutations, des insertions ou des délétions dans la région des répétitions d'octapeptides peuvent conduire à des formes familiales d'ESST. En condition non mutée, cette région contient 5 répétitions de 24-27 paires de bases. L'augmentation, au-delà de 6, ou la diminution, en dessous de 3, du nombre de répétitions provoque une forme fMCJ (Kumar et al., 2011). Contrairement aux autres mutations du gène *PRNP*, les patients atteints d'une modification du nombre de répétitions d'octapeptides ont un âge d'apparition des premiers

symptômes plus précoce associée à une phase symptomatique plus longue. De manière générale, ces patients sont moins susceptibles de développer des syndromes extrapyramidaux, des ataxies cérébelleuses et/ou des myoclonies (Cochran et al., 1996; Goldfarb et al., 1991).

Sur la **Figure 8**, sont représentées les différentes mutations de la protéine prion :

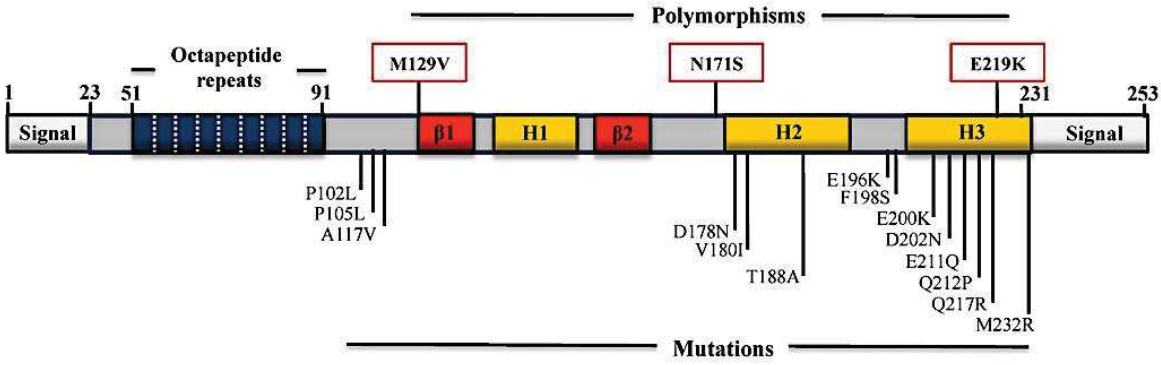


Figure 8. Schéma représentant les différentes mutations ou polymorphismes retrouvés sur la protéine prion humaine (d'après Acevedo-Morantes and Wille, 2014).

II.3. Les formes acquises ou infectieuses

Ces formes se caractérisent par l'introduction accidentelle de la protéine prion pathologique chez un sujet sain provenant d'une contamination par voie orale (ingestion de viande bovine contaminée par l'ESB, cannibalisme) ou par des actes médicaux (greffes, injections d'hormone de croissance ou transfusions sanguines provenant de patients atteints d'ESST).

II.3.1. Le kuru

Le kuru est la première ESST découverte chez l'Homme, uniquement retrouvée dans la tribu des Fores en Papouasie-Nouvelle-Guinée. La répartition de cette maladie au sein de la population était assez hétérogène : elle touchait 60% des femmes, 38% des enfants et adolescents, et 2% des hommes adultes. Le dernier patient mort du kuru date de 2005 (Alpers, 2008), et aucun nouveau cas n'est connu à ce jour. La transmission de cette maladie s'effectuait par voie orale lors de rites funéraires cannibales (Gajdusek and Zigas, 1957). Les

parties nobles (muscles, cœur), contenant peu de prions, étaient réservées aux hommes tandis que les organes internes, comportant une concentration en agent infectieux beaucoup plus importante, étaient donnés aux femmes et aux enfants (cerveau, rate, intestins). Cette répartition explique donc la plus forte proportion de femmes et d'enfants ayant développé la maladie par rapport aux hommes. La transmission du kuru fût démontrée par l'inoculation d'extraits de cerveaux de patients morts de la pathologie à des chimpanzés par voie intracérébrale (Beck et al., 1966; Gajdusek et al., 1966). L'interdiction des rites cannibales par les autorités australiennes a permis l'éradication de la maladie sur l'île. D'un point de vue médical, le kuru se caractérise par une atteinte du système nerveux central (SNC), plus prononcée pour le cervelet conduisant à une ataxie cérébelleuse (Hornabrook, 1968; Simpson et al., 1959; Zigas and Gajdusek, 1957). Le temps d'incubation de la maladie est assez long, pouvant aller jusqu'à 50 ans (en moyenne 12 ans) avec une phase symptomatique courte d'environ 12 mois (Collinge et al., 2006). Au niveau histologique, la pathologie se caractérise par une mort neuronale, la présence de vacuoles, une hypertrophie et une augmentation de la prolifération des astrocytes et par la présence de plaques de type uni-centriques (Fowler and Robertson, 1959; Klatzo et al., 1959). Les différents travaux menés sur le kuru ont valu le prix Nobel de physiologie ou de médecine au Dr. Carlson Gajdusek en 1976.

II.3.2. Le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ)

Les premiers cas ont été identifiés en 1996 sur des patients diagnostiqués MCJ mais présentant des symptômes inhabituels tels qu'une démence, une altération de l'humeur, une ataxie et une myoclonie (Will et al., 1996). Les premiers cas décrits étaient des personnes très jeunes avec un âge de décès aux alentours de 20 ans, ce qui a alerté les autorités sanitaires. Plus généralement, les personnes atteintes étaient plutôt jeunes (<45 ans) avec un âge médian de la mort survenant à 29 ans et une phase symptomatique de 14 mois (Collinge et al., 2006).

Par comparaison, l'âge médian de décès pour la forme sporadique de la MCJ est de 65 ans. Un autre élément inquiétant est que la protéine infectieuse a été détectée au niveau du système lymphoïde et du système nerveux sympathique, ce qui facilite sa transmission (Hill et al., 1997a). Les symptômes de cette nouvelle ESST sont apparentés au kuru plutôt qu'à la sMCJ, avec une atteinte cérébelleuse. Les plaques retrouvées dans le tissu cérébral sont de type floride c'est à dire des plaques entourées de vacuoles (Chazot et al., 1996; Will et al., 1996), caractéristiques de l'ESB. Au vu de cet élément histologique et toute cause génétique ayant été écartée, l'hypothèse que cette ESST pouvait avoir un lien avec l'ESB a été émise. Cette nouvelle ESST a été appelée le nouveau variant de la MCJ (vMCJ) (Will et al., 1996). Depuis son identification en 1996 on a dénombré 176 cas au Royaume-Uni (www.cjd.ed.ac.uk) et 25 en France (www.invs.sante.fr/publications/mcj/donneesmcj.html).

Des expériences de transmission de la souche de l'ESB à des modèles animaux tels que des primates (Lasmézas et al., 1996), des souris WT (Bruce et al., 1997) ou transgéniques exprimant la $hPrP^{C}$ (Hill et al., 1997b), ainsi que des analyses biochimiques (Collinge et al., 1996) ont montré que l'ESB et la souche de vMCJ étaient quasiment identiques. Ces résultats ont confirmé l'hypothèse de la transmission de l'ESB à l'Homme par voie orale.

La présence de la protéine prion pathologique dans le système lymphoïde chez les personnes atteintes du vMCJ a posé un problème de sécurité sanitaire des produits sanguins et de leurs dérivés. En 2004, des cas de transmissions secondaires Homme-Homme du vMCJ ont été répertoriés. En effet, 4 patients ont été diagnostiqués vMCJ après avoir reçu des transfusions sanguines de donneurs asymptomatiques diagnostiqués vMCJ postérieurement (Hewitt et al., 2006; Peden et al., 2004; Turner and Ludlam, 2009; Wroe et al., 2006).

II.3.3. Les cas iatrogènes

Les cas iatrogènes correspondent à la transmission de la pathologie par l'intermédiaire d'actes médicaux. On dénombre plusieurs causes qui peuvent être regroupées en deux groupes : les contaminations d'origine centrale et celles d'origine périphérique.

Les contaminations centrales sont liées à des opérations chirurgicales réalisées avec des outils chirurgicaux contaminés, des greffes de cornée ou de dure-mère infectées (Wadsworth and Collinge, 2007). Du matériel chirurgical contaminé, telles que des électrodes pour électroencéphalogramme (EEG), des aiguilles de ponction ou de biopsie, a dans un premier temps été utilisé sur des patients atteints de MCJ, puis réutilisé ultérieurement chez d'autres patients qui ont été contaminés à leur tour (El Hachimi et al., 1997; Will and Matthews, 1982). A ce jour, 6 cas ont été répertoriés. Il fût démontré que les procédés classiques de stérilisation n'étaient pas suffisants pour éliminer cet agent infectieux (Bernoulli et al., 1977), et que même plusieurs années après la stérilisation, le matériel était encore capable de transmettre la maladie aux chimpanzés (Gibbs et al., 1994). Concernant les greffes de cornée, seulement 2 cas ont été répertoriés à ce jour et 1 cas suspecté mais non confirmé. Les symptômes développés sont une ataxie, une démence à progression lente, une phase d'incubation de 15 à 18 mois et une phase symptomatique courte (Heckmann et al., 1997). Finalement, les greffes de dure-mère représentent la plus grande contamination centrale avec 228 cas répertoriés (Brown et al., 2012) dont 60% au Japon. Ces cas sont dus à la fabrication de lots contaminés de dure-mère provenant de patients sMCJ. Pour toutes les contaminations centrales les symptômes développés sont très proches de la sMCJ (Haïk and Brandel, 2014).

Les contaminations périphériques sont principalement dues à des injections d'hormones de croissance humaine contaminées par les prions (226 cas). Le problème est venu du fait que les hormones de croissance étaient extraites d'hypophyses humaines. Les prélèvements ont été effectués sur des personnes en *post-mortem* dont certains « donneurs »

étaient atteints de MCJ (Appleby et al., 2013; Billette de Villemeur et al., 1992). Les lots d'hormones « extractives » ont été principalement utilisés pour traiter des enfants atteints de nanisme conduisant à un scandale sanitaire en France où 119 enfants ont été contaminés sur les 226 répertoriés dans le monde. La voie sanguine est une autre voie de contamination par les prions lors de transfusions sanguines (Wroe et al., 2006). Les cas observés lors de contaminations périphériques sont plutôt associés au vMCJ (Haïk and Brandel, 2014).

Quelle que soit l'origine de la contamination, il semblerait que les génotypes homozygotes MM et VV sur le codon 129 soient un facteur de susceptibilité accrue au développement de la maladie (Brown et al., 2000; Collinge et al., 1991).

Le tableau ci-dessous récapitule les cas de contaminations iatrogènes.

Tableau 1. Nombre de cas en France et dans le monde de transmissions par voie iatrogène de la MCJ en fonction du type de contamination (Brown et al., 2012).

Origine de la contamination	Nombre de cas en France	Nombre de cas dans le monde
Matériel chirurgical infecté	0	2
Electrodes pour EEG	1	4
Greffes de cornée	0	2
Greffes de dure-mère	13	228
Injection d'hormones de croissance	119	226

III. Les lésions tissulaires

Les maladies à prions se caractérisent par trois types de lésions tissulaires :

- Une spongiose, résultant d'une vacuolisation du cytoplasme des neurones et des prolongements dendritiques. Cette spongiose va s'étendre progressivement au niveau des couches médianes du cortex entraînant une perte neuronale importante au sein des neurones corticaux des couches profondes. L'aspect spongieux que prend alors le cortex a donné le nom de « spongiforme » aux ESST (Hauw et al., 1995) (**Figure 9A**).

- Une gliose essentiellement d'origine astrocytaire due à une prolifération des astrocytes. La protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), constitutive des astrocytes, se retrouve surexprimée en cas d'astrogliose et est considérée comme un marqueur de l'inflammation (DeArmond et al., 1992; Dormont et al., 1981; Williams et al., 1994) (**Figure 9B**).

- Une accumulation de dépôts amyloïdes due à l'agrégation de la protéine prion pathologique. Cette accumulation peut être détectée par immunoblot après homogénéisation du tissu ou par immunohistochimie sur des coupes de cerveau. Ces dépôts peuvent avoir une forme et une taille variables en fonction de la pathologie. Ainsi, chez des personnes atteintes de GSS les plaques seront plutôt multicentriques et disséminées dans le cerveau, alors que pour le kuru elles sont plutôt de type unicentrique. Concernant le vMCJ, les plaques sont dites de type floride car elles sont entourées par des vacuoles et sont caractéristiques de cette ESST. Pour la sMCJ les plaques sont plutôt unicentriques. Cependant, les dépôts amyloïdes ne sont pas retrouvés dans les cas d'IFF (**Figure 9C**).

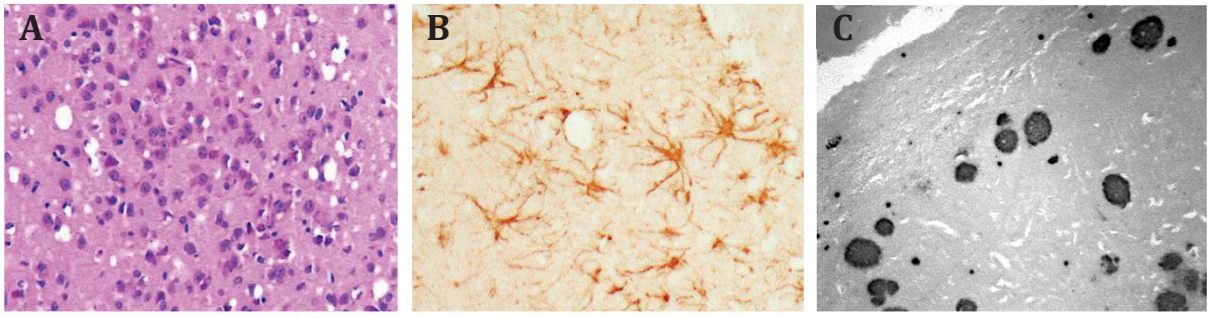


Figure 9. Lésions tissulaires caractéristiques des ESST. A. Coupe de cerveau illustrant la vacuolisation du tissu avec une coloration Eosine-Hématoxyline. **B.** Gliose astrocytaire détectée par un marquage anti-GFAP sur une coupe de cerveau de patient atteint de sMCJ. **C.** Coupe de cervelet de patient atteint de GSS contenant des plaques amyloïdes de type multicentrique marquées par du SAF62 (images fournies par le Dr. Mestre-Francés, MMDN).

IV. Nature de l'agent infectieux

IV.1. Les différentes hypothèses

Différentes théories ont été émises concernant la nature de l'agent infectieux impliqué dans les ESST. La découverte du kuru par le Dr. C. Gajdusek, dans les années 50, et la possibilité de transmission de la pathologie à des primates ont suscité un fort engouement pour identifier la nature de l'agent infectieux responsable de cette maladie (Beck et al., 1966). A partir de ce constat, plusieurs hypothèses ont été formulées :

- L'hypothèse virologique fût la première à être émise. L'agent infectieux serait un virus ou un rétrovirus dont le génome serait capable de coder pour la protéine infectieuse : la PrP^{Sc} (Gajdusek and Gibbs, 1968; Manuelidis and Fritch, 1996; Merz et al., 1981). Cependant aucune particule virale n'a pu être isolée. D'autres études ont montré que l'agent infectieux ne pouvait pas être inactivé par des irradiations aux ultraviolets ni par des radiations ionisantes (Alper et al., 1967; Griffith, 1967) et qu'il ne pouvait pas s'agir d'un virus classique d'où l'appellation de l'agent infectieux « Agent Transmissible Non Conventionnel ». Plusieurs arguments s'opposent à cette hypothèse virale : l'impossibilité d'identifier des structures virales en microscopie électronique, une résistance des échantillons infectieux aux nucléases, l'absence de réaction immunitaire et l'échec des tentatives pour trouver un acide nucléique dans la molécule.
- Une autre hypothèse virale est celle du virino. Il a été proposé qu'un acide nucléique exogène d'origine virale utiliserait une enveloppe composée de PrP^{Sc} provenant de l'hôte (Dickinson and Outram, 1988; Kimberlin, 1982). Le complexe formé serait à l'origine de lésions neuropathologiques et la composition de l'acide nucléique serait responsable du phénomène de souche (**Figure 10A**). Cette hypothèse a fait beaucoup d'adeptes dans la communauté scientifique.

- L'hypothèse de l'holoprion émise par le Dr. Weissmann (Weissmann, 1991) dérive de celle du virino. L'agent infectieux, appelé holoprion, serait composé d'un acide nucléique provenant de l'hôte (coprion) et d'une enveloppe protéique composée de PrP^{Sc} (apoprion). Dans cette hypothèse, la PrP^{C} est convertit en PrP^{Sc} par l'apoprion et le coprion est répliqué par une polymérase cellulaire. Ainsi de nouveaux holoprions peuvent se former et se propager. Différents travaux dont ceux réalisés par Simoneau (Simoneau et al., 2009) tendent à soutenir cette hypothèse en montrant l'importance de la présence de petits ARN de 27 et 55 nucléotides dérivant de la PrP^{Sc}.
- L'hypothèse de la protéine seule émise par le Dr. Prusiner est la plus répandue (**Figure 10B**). Dans ce modèle, la PrP^{C} subirait des modifications conformationnelles pour devenir PrP^{Sc}, ce qui confèrerait son infectiosité, sans que la présence d'acide nucléique soit nécessaire à sa propagation (Prusiner, 1982). Même si l'hypothèse a eu du mal à être acceptée, de nombreuses études sont en faveur de celle-ci. En particulier celles réalisées par le Dr. Legname où des fibrilles « synthétiques » ont été préparées à partir de protéines recombinantes tronquées (recMoPrP(89-230)) exprimées par E. Coli et purifiées. L'inoculation de ces fibrilles en intracérébral à des souris transgéniques Tg9949, *Prnp*$^{-/-}$ et surexprimant une forme tronquée de MoPrP(89-231) développent des symptômes entre 380 et 660 jours post-inoculation (en moyenne 500 jours post-inoculation) (Legname et al., 2004). Lors d'un second passage, le temps d'incubation observé est beaucoup plus court, en moyenne 250 jours. Par ailleurs, l'inoculation d'extraits de cerveaux de souris Tg9949 du premier passage, à des souris WT ou Tg4053 (surexprimant la MoPrP(23-231)) déclenche aussi une maladie à prions chez ces souris avec un temps d'incubation moyen de 154 et 90 jours, respectivement (Legname et al., 2004). Cette théorie de la protéine seule a valu le prix Nobel de physiologie et de médecine au Dr. Stanley Prusiner en 1997.

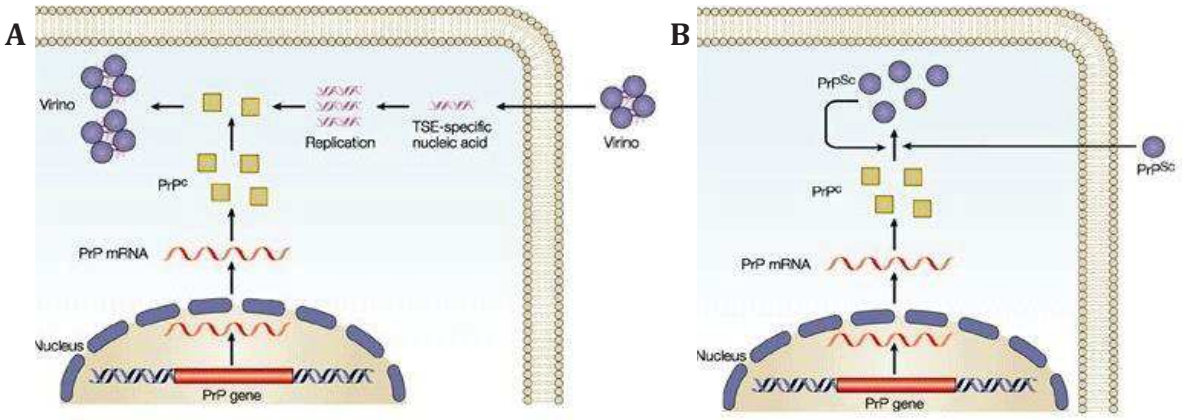


Figure 10. Schéma représentant deux hypothèses sur la nature de l'agent infectieux. A. Schéma représentant l'hypothèse du virino où l'agent infectieux est composé d'un acide nucléique exogène contenu dans une enveloppe de PrP^{Sc} endogène. **B.** Hypothèse de la protéine seule proposée par Prusiner. Selon cette hypothèse l'agent infectieux est la PrP^{Sc} seule. Elle est capable de convertir la PrP^{C} en PrP^{Sc} (extrait de Weissmann, 2004).

IV.2. Les rôles physiologiques de la PrP^{C}

La protéine prion cellulaire ou PrP^{C} est une protéine ubiquitaire fortement exprimée dans le cerveau par les neurones et en plus faible proportion par les cellules gliales. On la retrouve aussi au niveau périphérique dans des organes tels que le rein, la rate, les poumons ou encore le tube digestif. Elle est principalement retrouvée à la surface externe de la membrane plasmique rattachée par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) mais aussi, dans différents compartiments cellulaires (**Figure 11**). La création de lignées *Prnp*$^{-/-}$ n'a pas conduit à un phénotype létal suggérant que cette protéine n'est pas essentielle au développement (Büeler et al., 1992; Tobler et al., 1996).

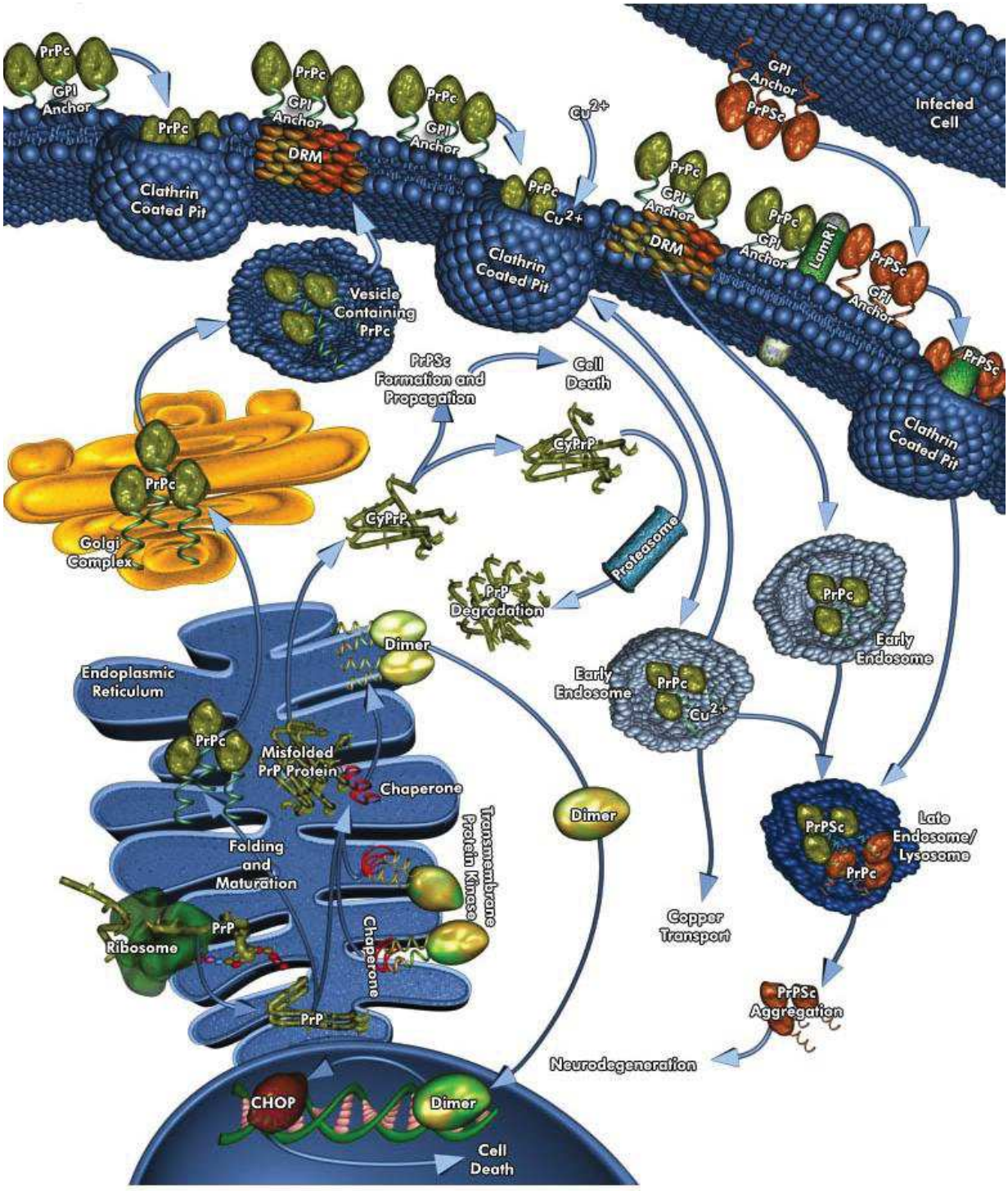


Figure 11. Schéma illustrant les étapes de maturation de la PrP^C et la localisation cellulaire de la PrP^C et de la PrP^{Sc}. Après transcription du gène *Prnp*, l'ARNm est traduit et permet la synthèse de la protéine prion physiologique PrP^C dans le RER (réticulum endoplasmique rugueux). Dans le RER et dans l'appareil de Golgi, la PrP^C va subir des modifications post-traductionnelles et sera adressée à la membrane plasmique. Le processus d'infection est déclenché par l'interaction de la PrP^{Sc} avec la PrP^C provoquant son changement de conformation. L'infection se propage par la génération exponentielle de PrP^{Sc} qui, par endocytose, peut se propager à l'ensemble de la cellule et aux cellules voisines, provoquant une perturbation des rôles physiologiques de l'isoforme cellulaire (extrait de www.qiagen.com pathway n°369).

La PrP^C semble être impliquée dans plusieurs processus physiologiques, dont certains sont décrits ci-dessous.

IV.2.1. Rôle dans le métabolisme du cuivre et le stress oxydant

La PrP^C possède des séquences consensus répétées d'octapeptides au niveau de sa région N-terminale permettant de lier des ions bivalents tels que le cuivre (Cu^{2+}) ou le zinc (Zn^{2+}) (Brown et al., 1997a; Hornshaw et al., 1995; Jackson et al., 2001). L'affinité envers ces ions est réduite lorsque le milieu est acidifié suggérant donc que la PrP^C réaliserait le transport de cuivre de la membrane plasmique vers les endosomes et les lysosomes, et s'assurerait du contrôle de l'homéostasie du cuivre (Wells et al., 2006). Cette régulation du Cu^{2+} a été montrée par des modèles de souris KO pour la PrP^C (Alfaidy et al., 2013; Brown et al., 1997a, 1998; Flechsig et al., 2000; Kralovicova et al., 2009).

Cependant, il semblerait que le cuivre joue également un rôle dans la régulation et le trafic intracellulaire de la PrP^C. Des études menées sur des lignées cellulaires de neuroblastomes (SH-SY5Y) ont montré que de fortes concentrations en cuivre provoquaient une endocytose de la protéine prion. De plus, lorsque la région des octapeptides est délétée ou mutée, on observe une absence d'endocytose de la PrP^C suggérant que le cuivre régulerait les processus d'internalisation de la protéine prion (Perera and Hooper, 2001).

Le cuivre lié à la PrP^C participerait dans des réactions d'oxydo-réduction comme cofacteur. La PrP^C se lie à la superoxyde dismutase (SOD), enzyme permettant de catalyser des anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en dioxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Vassallo and Herms, 2003). Le cuivre de la PrP^C interagirait avec les radicaux libres et conduirait à l'élimination des espèces oxygénées réactives (ROS) intracellulaires en s'associant à la SOD (Brown et al., 1997b, 2002), conférant à la PrP^C un rôle dans la protection contre le stress oxydant. Ce rôle a été confirmé sur des lignées cellulaires KO pour la PrP^C, où une

diminution de l'activité de la SOD en absence de la PrP^C a été constatée, augmentant la sensibilité des cellules au stress oxydant (Brown et al., 1997b).

IV.2.2. Rôle dans la survie cellulaire

Des études réalisées sur la levure ont montré que la protéine PrP^C a la capacité d'interagir avec Bcl-2, un facteur anti-apoptotique, suggérant son rôle potentiel dans la survie cellulaire (Kurschner and Morgan, 1995). L'expression de la PrP de mammifères dans les levures provoque une diminution de la mort cellulaire induite par Bax (Li and Harris, 2005). La voie de régulation de l'apoptose par Bax/Bcl-2 est prépondérante dans les neurones. Lorsque Bax, un facteur pro-apoptotique, est activée, sa conformation est modifiée permettant sa translocation dans la mitochondrie. Ce changement de conformation conduit au relargage du cytochrome C et à l'activation de caspases pro-apoptotiques. Des expériences menées sur des cultures de neurones primaires humains et de lignées hippocampiques murines qui expriment ou non la PrP^C, ont montré que la protéine prion est capable de bloquer le changement de conformation de Bax et donc d'inhiber l'apoptose de ces neurones (Roucou et al., 2005). De même, en interagissant avec la protéine STI1 (Stress Induced Phosphoprotein 1), la PrP^C active la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA) anti-apoptotique et stimulerait la neuritogenèse (Beraldo et al., 2010; Lopes et al., 2005).

La PrP^C régulerait l'activité du récepteur NMDA (N-méthyl-D-Aspartate), un canal ionique impliqué dans les potentiels post-synaptiques (Khosravani et al., 2008). Dans le cadre des maladies neurodégénératives, une sur-activation des récepteurs NMDA provoque une entrée massive de Ca^{2+} dans les neurones et conduit à une mort cellulaire par excitotoxicité (Parsons and Raymond, 2014). Il a été constaté, que les souris *Prnp*$^{-/-}$ présentaient une excitotoxicité liée à ces récepteurs (Khosravani et al., 2008). Des études ont montré que la PrP^C est capable de réguler la S-nitrosylation des récepteurs NMDA. Au niveau mécanistique,

lors de la libération de glutamate, les récepteurs NMDA post-synaptiques sont activés conduisant à l'entrée de calcium. Par des mécanismes intracellulaires, des ions Cu^{2+}/Cu^{+} et du monoxyde d'azote (NO) sont libérés dans la synapse. Le Cu^{2+}/Cu^{+} va être capté par la PrP^{C} grâce aux répétitions d'octapeptides en N-terminal, au niveau des radeaux lipidiques où se retrouvent aussi les récepteurs NMDA. Le NO libéré va réagir avec les thiols des cystéines des sous-unités GluN1 et GluN2A des récepteurs NMDA, conduisant à leur S-nitrosylation. Cette réaction nécessite la présence d'accepteurs d'électrons, provenant du domaine N-terminal flexible de la PrP^{C} via le positionnement des ions Cu^{2+}/Cu^{+} proche des cystéines. Cette S-nitrosylation va conduire à l'inhibition du récepteur NMDA et à sa fermeture, empêchant les phénomènes d'excitotoxicité (**Figure 12**) (Gasperini et al., 2015; Stys et al., 2012).

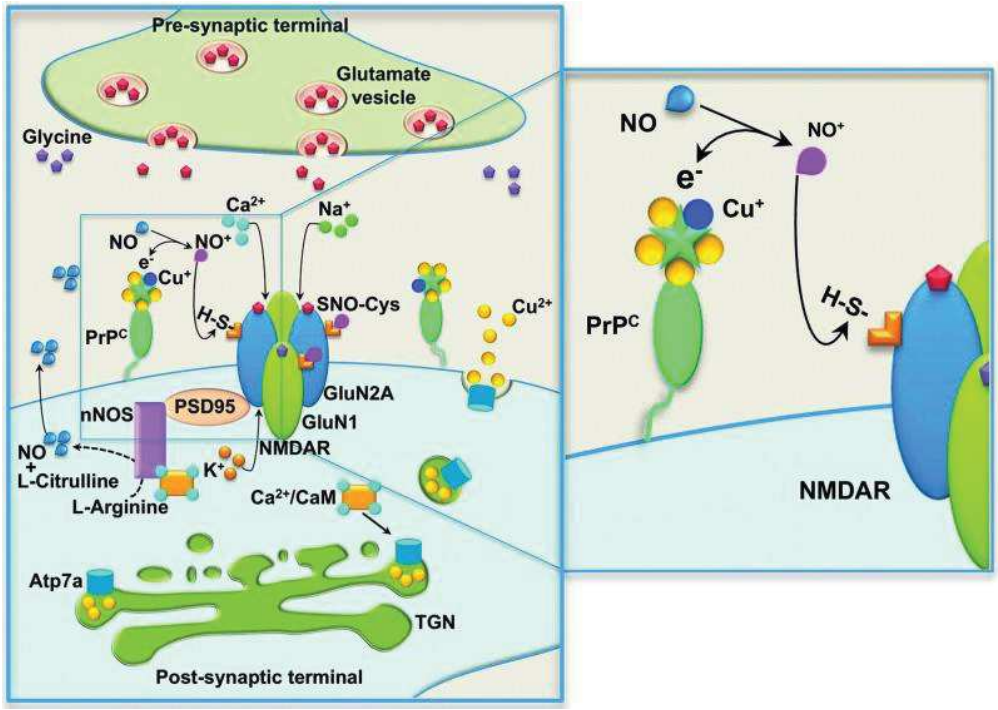


Figure 12. Schéma de la régulation de la S-nitrosylation du récepteur NMDA par la PrP^{C}. Après libération de glutamate dans la fente synaptique, la fixation d'ions Cu^{2+}/Cu^{+} au niveau du domaine N-terminal de la PrP^{C} et la présence de NO conduisent à la S-nitrosylation des récepteurs NMDA, empêchant des phénomènes d'excitotoxicité (extrait de Gasperini et al., 2015).

IV.2.3. Rôle dans la signalisation transmembranaire

De par son ancrage à la membrane plasmique via une ancre GPI, l'hypothèse que la PrP^C pouvait avoir un rôle de signalisation transmembranaire a été rapidement émise (Mouillet-Richard et al., 2000; Taylor and Hooper, 2006; Tsui-Pierchala et al., 2002). Cependant, la protéine prion ne possédant pas de domaine intracellulaire il est donc nécessaire qu'elle interagisse avec une protéine transmembranaire pour effectuer la transduction du signal. Mouillet-Richard et ses collaborateurs ont montré que la PrP^C neuronale est capable d'activer la tyrosine kinase Fyn (Mouillet-Richard et al., 2000). L'activation de Fyn par la PrP entraîne l'activation de la NADPH oxydase conduisant à la production de ROS et à l'activation des kinases ERK1/2 (Schneider et al., 2003) impliquées dans la division, la prolifération et la croissance cellulaire. Les ROS générés ne sont pas toxiques et agissent comme un second messager permettant l'activation de l'α-sécrétase TACE (Pradines et al., 2009). Il a été récemment démontré sur des lignées cellulaires neuroectodermiques (1C11) et sur des cultures primaires de neurones de souris *Prnp*$^{-/-}$, que l'activation de l'α-sécrétase TACE par la voie de signalisation PrP^C-Fyn-NADPH oxydase provoque le clivage du récepteur TNFR1, diminuant ainsi l'effet toxique lié au TNF-α (Ezpeleta et al., 2017). La présence de la PrP^C est requise pour que TACE reste dans un état activé au niveau de la membrane plasmique. En effet, l'internalisation de TACE est régulée par la kinase PDK1 qui nécessite une activation préalable par la kinase ROCK. En conditions physiologiques, la PrP^C régule négativement la kinase ROCK limitant la formation de complexes ROCK/PDK1. La diminution de ces complexes induit une diminution de l'activation de la PDK1 et donc empêche l'endocytose de TACE (Alleaume-Butaux et al., 2015).

IV.2.4. Rôle dans le développement des synapses

Des expériences de traitement avec de la PrP recombinante sur des cultures de neurones ont montré une stimulation de la croissance neuritique et une augmentation de la survie neuronale notamment par l'activation de kinases telles que Fyn, PKC, PKA, ERK et la voie PI3K/Akt (Chen et al., 2003; Kanaani et al., 2005). En parallèle, la PrP recombinante stimulerait la croissance axonale et dendritique et augmenterait aussi le nombre de synapses formées (Kanaani et al., 2005), suggérant une implication de la PrP^C dans la formation des synapses. Le **tableau 2** résume plusieurs rôles physiologiques de la PrP^C.

Tableau 2. Récapitulatif des fonctions physiologiques de la PrP^C.

Rôle de la PrP^C	Implication	Modèles utilisés	Bibliographie
Survie cellulaire	Interaction entre PrP^C et Bcl-2, rôle anti-apoptotique	Levures	(Kurschner and Morgan, 1995)
	Expression de la PrP^C dans les levures diminue la mort cellulaire induite par Bax		(Li and Harris, 2005)
	Inhibition du changement de conformation de la protéine Bax par la PrP^C et inhibition de l'apoptose	Cultures de neurones primaires humains et lignées hippocampiques murines	(Roucou et al., 2005)
	Interaction PrP^C-STI1 active la PKA pour un rôle neuroprotecteur	Cultures cellulaires	(Zanata et al., 2002) (Lopes et al., 2005)
	Interaction PrP^C – récepteurs NMDA entraîne une régulation de l'excitotoxicité	Lignés de souris $PrP^{-/-}$	(Black et al., 2014) (Gasperini et al., 2015) (Stys et al., 2012)
Métabolisme du cuivre et stress oxydant	La région des octapeptides de la PrP^C interagit avec le cuivre (Cu^{2+}) participant à son homéostasie	Peptides synthétiques	(Hornshaw et al., 1995)
		Souris $PrP^{-/-}$	(Brown et al., 1998)
		Protéines recombinantes	(Jackson et al., 2001)
		Souris WT, $PrP^{-/-}$, Tg20 et cultures placentaires humaines	(Alfaidy et al., 2013)

Rôle de la PrP^C	Implication	Modèles utilisés	Bibliographie
Métabolisme du cuivre et stress oxydant	Le complexe PrP^C-Cu^{2+} aurait un rôle antioxydant	Souris $PrP^{-/-}$ et cultures de neurones de souris $PrP^{-/-}$	(Brown et al., 1997b) (Brown et al., 2002)
Signalisation transmembranaire	Anticorps anti-PrP stimule l'activité de Fyn tyrosine kinase	Cellules neurectodermales	(Roucou et al., 2005)
	La PrP^C est impliquée dans la transduction du signal par la kinase Fyn	Cultures de neurones	(Mouillet-Richard et al., 2000) (Tsui-Pierchala et al., 2002) (Taylor and Hooper, 2006)
	Stimulation de Fyn par la PrP^C entraîne l'activation de la NADPH oxydase et des kinases ERK1/2 et la production de ROS	Cultures cellulaires	(Schneider et al., 2003)
	La voie de signalisation PrP^C-Fyn-NADPH oxydase active l'α-sécrétase TACE clivant le récepteur TNFR1	Cultures cellulaires	(Pradines et al., 2009) (Ezpeleta et al., 2017)
Développement des synapses	Activation de kinases (Fyn, PKC, PKA, ERK,…)	Culture de neurones PrP recombinante	(Chen et al., 2003)
	La PrP^C stimule la formation des axones, dendrites et augmente le nombre de synapses	Culture de neurones hippocampiques PrP recombinante	(Kanaani et al., 2005)
Adhésion cellulaire	Redistribution des N-CAM au niveau des rafts lipidiques	Neurones hippocampiques	(Schmitt-Ulms et al., 2001) (Santuccione et al., 2005)
	Interaction PrP-E cadhérine et PrP-PrP	Poisson zèbre	(Málaga-Trillo et al., 2009) (Huc-Brandt et al., 2014)
	Favorise l'adhésion des cellules	Cultures de neuroblastomes	(Mangé et al., 2002)
Myélinisation	Participe au maintien de la myéline des neurones périphériques	Lignés de souris transgéniques	(Bremer et al., 2010)
Olfaction	Problèmes d'olfaction en absence de PrP^C	Souris $PrP^{-/-}$	(Le Pichon et al., 2009)
Sommeil et rythme circadien	Altération du cycle circadien et du sommeil en absence de PrP Permet la continuité du sommeil	Souris $PrP^{-/-}$	(Tobler et al., 1996) (Tobler et al., 1997)

IV.3. Structures de la PrP

La PrP^{C} et la PrP^{Sc} étant codées par le même gène leur structure primaire est identique. Cependant, des différences sont observées au niveau des structures secondaire, tertiaire et quaternaire.

IV.3.1. Structure primaire

La protéine prion est codée par le gène *PRNP* situé sur le bras court du chromosome 20 (Oesch et al., 1985) pour la forme humaine et sur le chromosome 2 chez la souris. Le gène *PRNP* peut contenir 2 ou 3 exons selon les espèces considérées dont la séquence codant pour la protéine est toujours située sur le dernier exon, excluant ainsi tout épissage alternatif (Colby and Prusiner, 2011). La PrP^{C}, avant modifications post-traductionnelles, est composée de 253 AA chez l'Homme, 254 chez la souris, 256 chez le mouton et 269 chez la vache. La structure primaire est assez conservée entre les espèces. Après sa synthèse, la PrP^{C} va subir plusieurs modifications post-traductionnelles (**Figure 13**) :

- Un clivage du peptide signal en N-terminal (22 AA) permettant l'adressage de la protéine au réticulum endoplasmique (RE).
- La formation d'un pont disulfure entre les cystéines 179 et 214.
- L'éventuelle addition d'oligosaccharides sur les asparagines 181 et/ou 197 (Endo et al., 1989; Haraguchi et al., 1989) donnant lieu à des formes non-glycosylées (5%), mono-glycosylées (25%) et bi-glycosylées (75%), détectables en western blot entre 30 et 36 kDa.
- Le clivage du peptide signal en C-terminal (23 AA) permettant l'addition de l'ancre GPI.
- L'addition d'une ancre GPI (Stahl et al., 1987) ancrant la protéine prion à la surface externe de la membrane cellulaire.

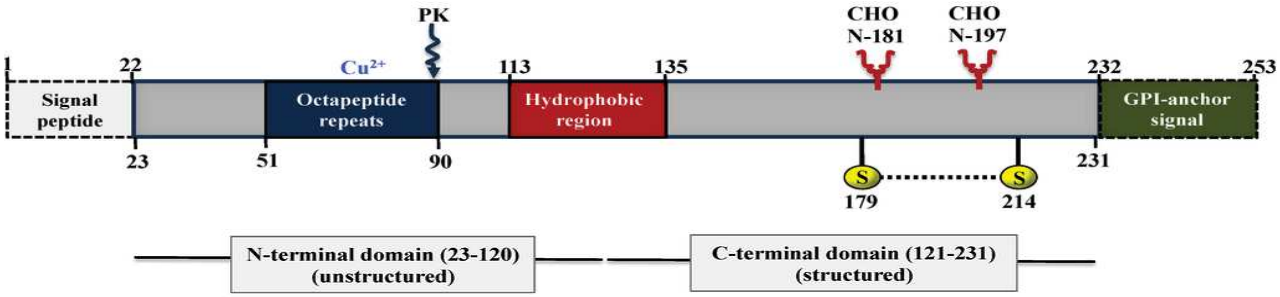


Figure 13. Illustration de la structure primaire de la PrP^C humaine. En N-terminal de la protéine, on retrouve le peptide signal (1-22) d'adressage au RE et la région contenant les séquences répétées d'octapeptides (51-90) permettant la liaison au cuivre. En C-terminal, on retrouve les deux sites de glycosylation de la protéine prion en position 181 et/ou 197, le pont disulfure entre les cystéines 179 et 214, et le site d'ancrage à la membrane par l'ancre GPI (extrait de Acevedo-Morantes and Wille, 2014).

Suite à ces modifications, la PrP^C ne contient plus que 209 AA chez l'Homme. Elle est constituée de 2 grands domaines : le domaine N-terminal (résidus 23 à 120) et le domaine C-terminal (résidus 121 à 231) (**Figure 13**). On peut retrouver dans le domaine N-terminal la répétition de séquences consensus d'octapeptides (PHGGGWGQ) (Colby and Prusiner, 2011) qui ont la propriété de lier le cuivre et d'autres ions bivalents (Hornshaw et al., 1995; Jackson et al., 2001; Viles et al., 1999).

La protéine prion est ancrée à la membrane plasmique par une ancre GPI, et peut subir différents clivages par des protéases. Ainsi, les différentes formes de PrP peuvent subir un clivage α entre les AA 111 et 112 par 2 protéases : ADAM 10 et 17 (ADAM : A Desintegrin And Metalloprotease) (Liang and Kong, 2012; McDonald et al., 2014; Saftig and Lichtenthaler, 2015). Ce clivage produit un fragment N1 soluble et un fragment C1 qui reste lié à la membrane par l'ancre GPI (**Figure 14 (I)**) (Altmeppen et al., 2013; Laffont-Proust et al., 2005). Un deuxième type de clivage, appelé β, survenant entre les AA 89 et 90 (région des octapeptides) a été décrit et produit un fragment soluble N2 et un fragment C2 toujours ancré à la membrane (**Figure 14 (II)**) (Mangé et al., 2004; McDonald et al., 2014). La protéase qui serait impliquée dans ce processus serait ADAM 8 et serait dépendante des ROS, du cuivre et du zinc (McDonald et al., 2014; Watt et al., 2005). Un dernier clivage possible de la protéine prion est un clivage réalisé par des phospholipases endogènes qui séparent la protéine prion

de son ancre GPI permettant la sécrétion de la protéine entière (**Figure 14 (III)**) (Lehmann et al., 1999; Parizek et al., 2001).

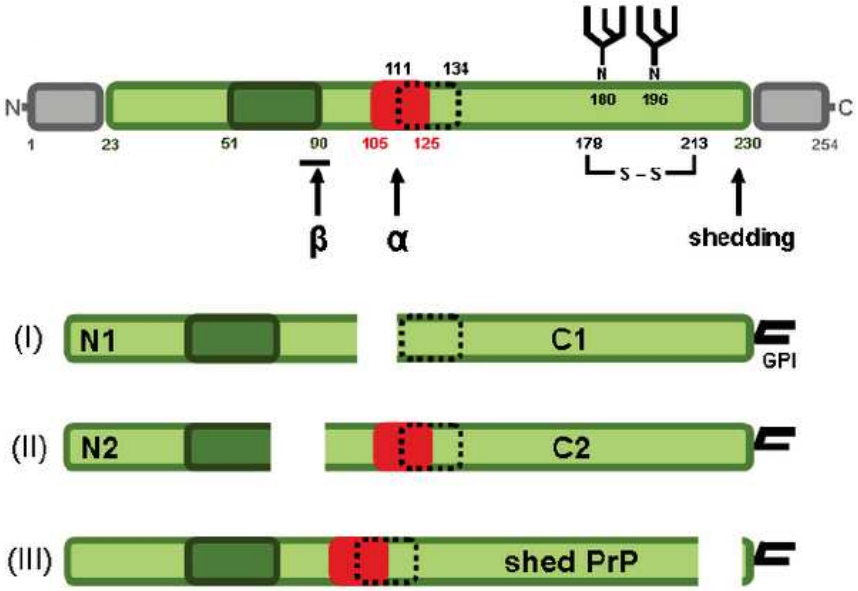


Figure 14. Représentation des différents clivages de la protéine prion. (**I**) Clivage α de la protéine prion avec création des fragments N1 et C1. (**II**) Représentation des fragments N2 et C2 après clivage β. (**III**) Protéine prion après clivage par des phospholipases endogènes (extrait de Altmeppen et al., 2012).

IV.3.2. Structure secondaire et tertiaire de la PrP^C

Les structures secondaire et tertiaire de la PrP^C ont pu être obtenues par la combinaison de différentes techniques : la spectroscopie infra-rouge, le dichroïsme circulaire et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Les premières études réalisées avec la spectroscopie infra-rouge et le dichroïsme circulaire ont révélé que la PrP^C contient une majorité d'hélices α (42%) et peu de feuillets β (3%) (Pan et al., 1993). En 1996, la structure tridimensionnelle de la PrP^C murine a été résolue par la RMN et a permis d'identifier deux régions distinctes : une région C-terminale, globulaire, structurée en 3 hélices α (H1, H2 et H3) et 2 feuillets β antiparallèles et une région N-terminale, flexible et peu structurée contenant les répétitions d'octapeptides (Riek et al., 1996) (**Figure 15**). La région globulaire est stabilisée par un pont disulfure entre les cystéines 179 et 214 au niveau des hélices H2 et H3 (Turk et al., 1988). De nos jours, la structure de la PrP^C est résolue pour de nombreuses

espèces comme le hamster (Donne et al., 1997), les bovins (Lopez Garcia et al., 2000) ou encore l'Homme (Zahn et al., 2000), confirmant l'organisation de la PrP^C en 2 régions différentes.

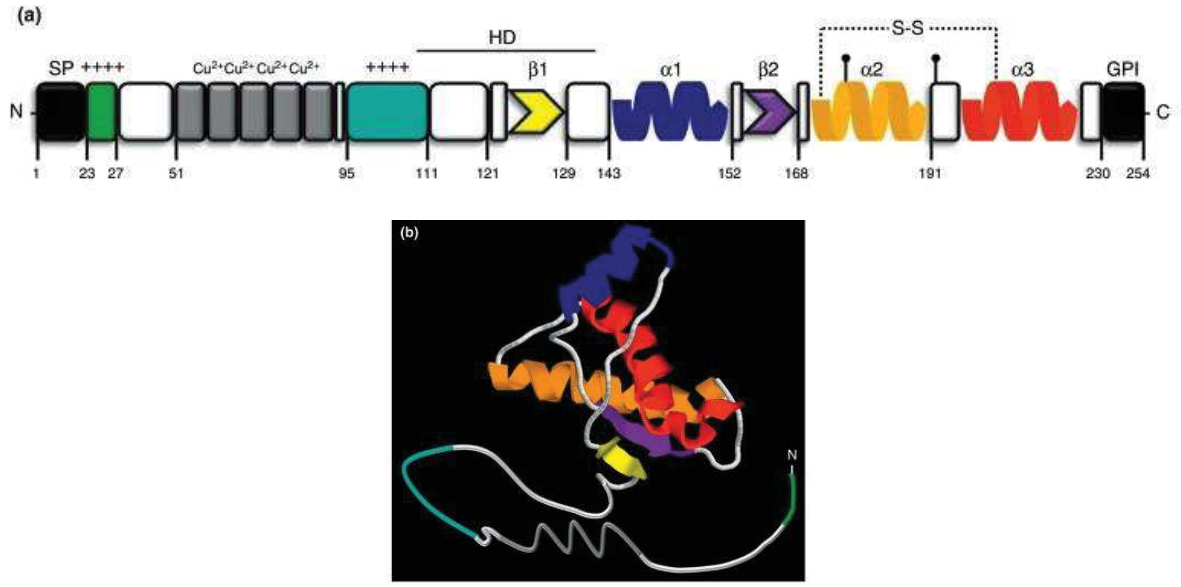


Figure 15. Structure tertiaire de la PrP^C. A. Illustration schématique de la PrP^C murine. On retrouve les trois hélices α en bleu, orange et rouge ainsi que les deux feuillets β en jaune et violet (Biasini et al., 2012). **B**. Structure tertiaire de la PrP^C où l'on retrouve l'organisation spatiale du domaine C-terminal globulaire avec les hélices α et les feuillets β antiparallèles et le domaine N-terminal non structuré (Riek et al., 1996).

Récemment, une étude a mis en valeur une séquence palindromique retrouvée sur le domaine N-terminal de la PrP^C humaine ($hPrP^C$) dont la séquence est AGAAAAGA (résidus 113-120). Cette séquence jouerait un rôle dans la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} (Abskharon et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs ont cristallisé la $hPrP^C$ en présence d'un nano-anticorps (Nb484) qui inhibe la propagation des prions. Dans ce complexe formé ($hPrP^C$-Nb484), le domaine N-terminal est non structuré pour les résidus 23 à 116 (au lieu de 23-124) et la séquence palindromique adopte une configuration stable et forme un troisième feuillet β antiparallèle, nommé β0 (résidus 118-122) (Abskharon et al., 2014) (**Figure 16**). Il semblerait que ce motif palindromique participe à l'enrichissement en feuillets β de la PrP^C et pourrait être une étape précoce du changement de conformation de la PrP^C en PrP^{Sc}.

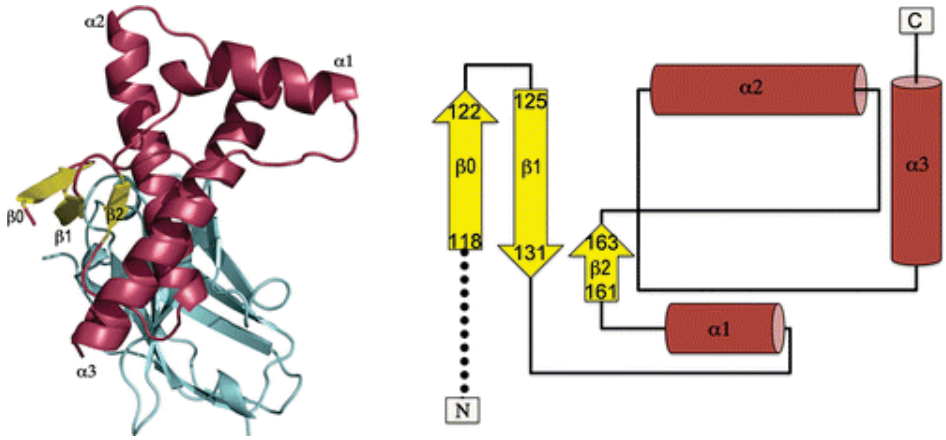


Figure 16. Modélisation du changement de structure précoce de la PrP^{C} en PrP^{Sc}. Dans cette forme intermédiaire de la PrP^{C} on retrouve le nouveau feuillet β (β0) en N-terminal qui va s'associer aux 2 autres feuillets (β1 et β2), avec une configuration antiparallèle (d'après Abskharon et al., 2014).

IV.3.3. Structure secondaire et tertiaire de la PrP^{Sc}

Plusieurs modèles ont été proposés pour l'isoforme pathologique de la protéine prion, la PrP^{Sc}. Des problèmes liés à la purification et à l'insolubilité de la PrP^{Sc} font que les techniques classiques de RMN ou de cristallographie ne sont pas envisageables. Les études de dichroïsme circulaire et de spectroscopie infra-rouge ont montré que la PrP^{Sc} est formée à 30% d'hélices α et à 42% de feuillets β, soit 10 fois plus que pour la PrP^{C} (Pan et al., 1993; Prusiner, 1998; Safar et al., 1993; Wille et al., 2002). Ces données sont toujours d'actualité et n'ont pas été contredites depuis 2002. Plusieurs modèles structuraux ont par la suite été proposés, entre autres :

- Un premier modèle établi par le Dr. Fred Cohen, propose que la PrP^{Sc} serait constituée de 2 hélices α et d'un feuillet β antiparallèle à quatre brins (Cohen et al., 1994; Huang et al., 1996).
- Un second modèle établi par Wille et ses collaborateurs à partir de données de cryomicroscopie électronique, propose que les monomères de PrP^{Sc} seraient constitués de 2 hélices α et de feuillets β parallèles qui constitueraient un solénoïde de type β (**Figure 17A**) (Wille et al., 2002). Par d'autres techniques (microscopie électronique ou à force atomique et par diffraction aux rayons X des fibres à basse résolution), un

modèle a été généré dans lequel les monomères de PrP^{Sc} s'associeraient entre eux sous forme de trimères, et l'empilement successif de ces trimères, par des liaisons hydrogène, conduirait à la formation des fibrilles amyloïdes (**Figure 17B**) (Govaerts et al., 2004; Riesner, 2003; Wille et al., 2002).

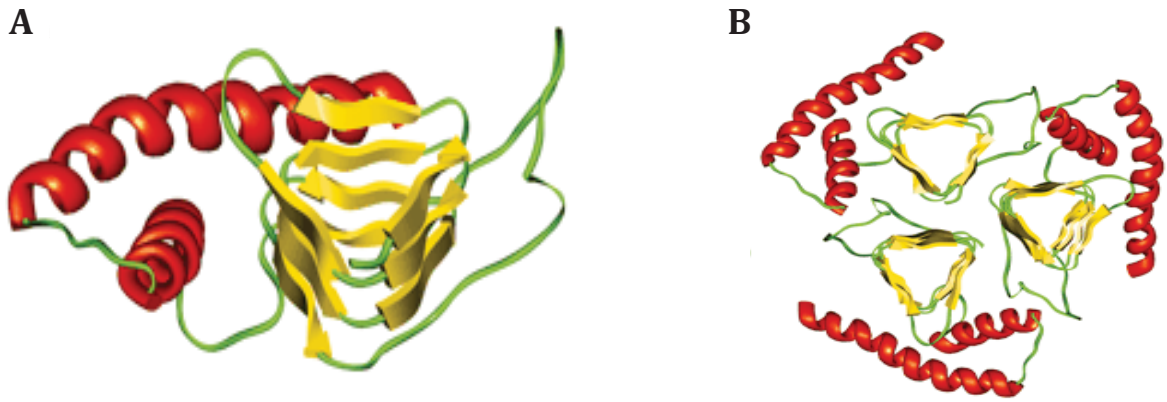


Figure 17. Structure tertiaire de la PrP^{Sc}. A. Modèle structural de PrP^{Sc} monomérique proposée par Wille (Wille et al., 2002). **B.** Structure des trimères de PrP^{Sc} proposée par Govaerts (Govaerts et al., 2004).

IV.3.4. Structure quaternaire de la PrP^{Sc}

Vázquez-Fernández et ses collaborateurs ont montré par des techniques de cryomicroscopie électronique, que les monomères de PrP^{Sc} auraient une structure en forme de solénoïde composée de 4 brins β d'une hauteur de 19,2 Å et dont l'intervalle entre chaque brin β mesure 4,8 Å (Vázquez-Fernández et al., 2016). Cette étude a été réalisée à partir de fibrilles de PrP27-30 sans l'ancre GPI et 1305 fibrilles isolées ont été analysées. L'analyse des protofilaments qui composent la fibrille, par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourrier, a révélé des signaux de 19,2 Å et de 40 Å, correspondant à des espacements de 4 et 8 brins β de 4,8 Å. Ces résultats montrent l'existence d'une sous-unité structurelle d'une hauteur de 4 brins β, qui s'associe verticalement avec d'autres sous-unités pour former une structure multimérique (**Figure 18B**). Ainsi, Vázquez-Fernández et ses collaborateurs ont proposé un modèle de structure fibrillaire de la PrP^{Sc} où deux fibres s'entrelacent pour former

des fibrilles (**Figure 18A**) avec des protofilaments organisés en solénoïde avec 4 brins β parallèles (Vázquez-Fernández et al., 2016).

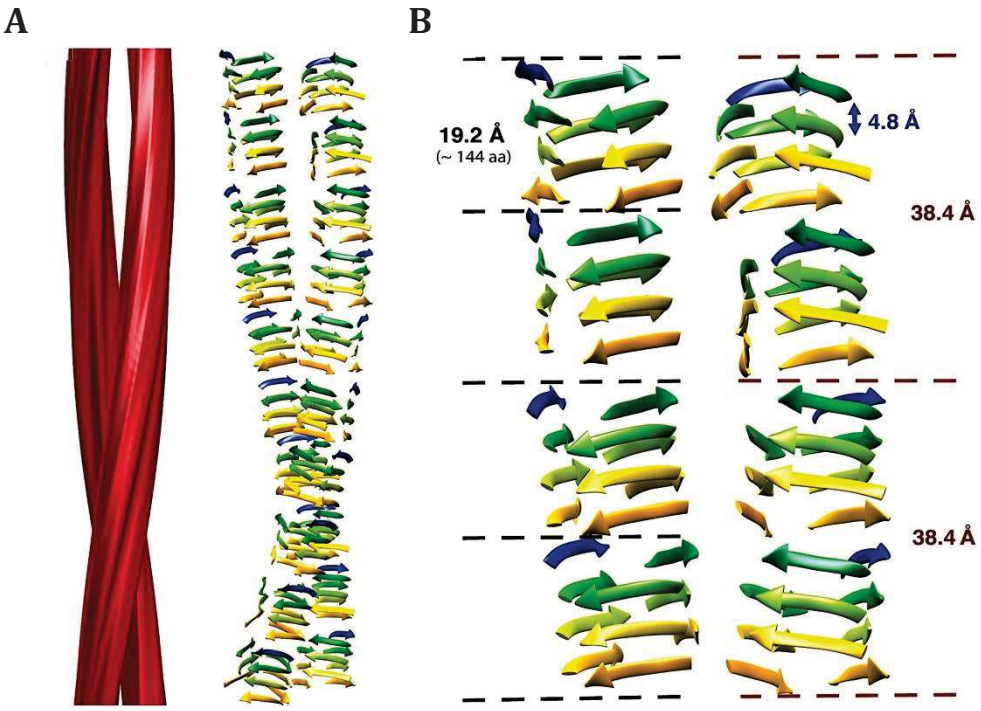


Figure 18. Structure quaternaire de la PrP^{Sc}. A. Modèles de fibrilles de PrP^{Sc} composés de 2 fibres qui s'entrelacent. **B**. Représentation de fibres qui se composent de protofilaments de PrP^{Sc} possédant une structure solénoïde à 4 brins β parallèles associés verticalement (extrait de Vázquez-Fernández et al., 2016).

Selon Wille et Requena, l'élongation des fibrilles pourrait consister en l'empilement de molécules de PrP non repliée qui s'associeraient aux protofilaments en conformation solénoïde. Les solénoïdes pourraient alors « imprimer » leur conformation aux molécules de PrP non repliée nouvellement synthétisées (**Figure 19**) (Wille and Requena, 2018).

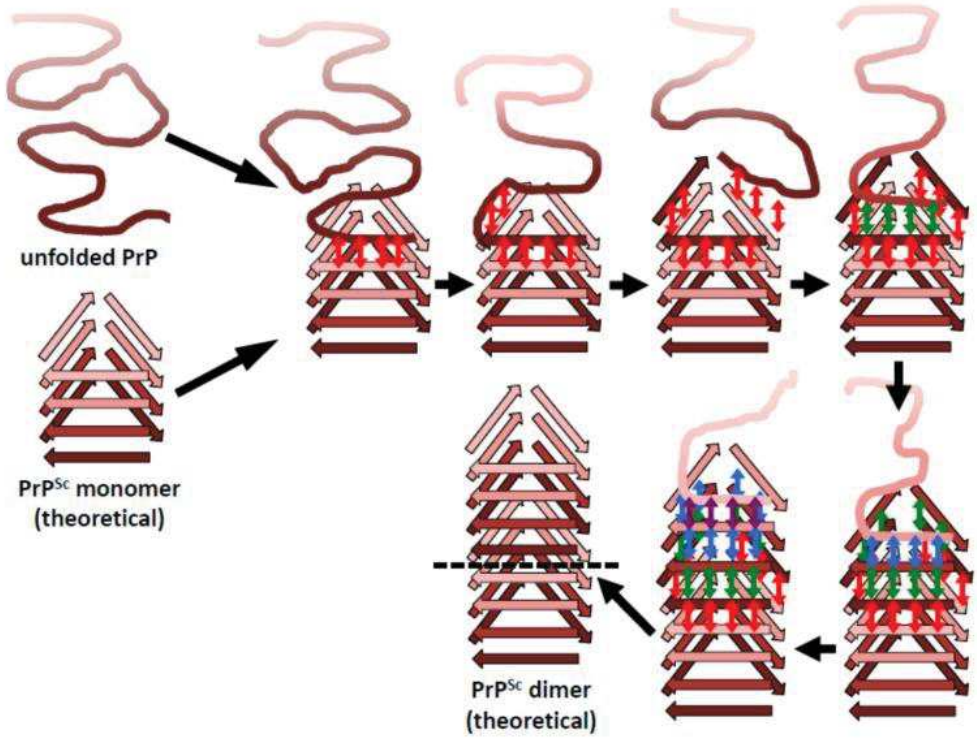


Figure 19. Schéma du modèle d'élongation des fibres de PrP^{Sc}. Dans ce modèle, une molécule de PrP non repliée s'associe à un protofilament de PrP^{Sc} ayant déjà adopté une conformation de type solénoïde. La PrP non repliée formerait des liaisons hydrogènes avec les brins β du monomère de PrP^{Sc} qui imprimerait sa conformation en feuillet β. Une fois le premier échelon de brins β formés du solénoïde, ceux-ci seraient capables d'imprimer leur nouvelle conformation au reste de la molécule non repliée. Une fois les 4 échelons de brins β achevés, une nouvelle molécule de PrP^{Sc} a été créée et permet le recrutement d'une nouvelle molécule de PrP non repliée pour former un nouveau monomère de PrP^{Sc}, permettant le processus d'élongation des fibres (selon Wille and Requena, 2018).

IV.4. Propriétés physico-chimiques de la PrP^{C} et PrP^{Sc}

Bien qu'ayant la même structure primaire, les modifications de structures secondaire et tertiaire de la PrP^{Sc} lui permettent d'acquérir de nouvelles propriétés physico-chimiques par rapport à la PrP^{C}. Les principales différences sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3. Différences de propriétés physico-chimiques entre la PrP^{C} et la PrP^{Sc}.

	PrP^{C}	**PrP^{Sc}**
Isoforme	Normal	Pathologique
Solubilité	Soluble	Insoluble
Capacité d'agrégation	Très faible	Formation de fibrilles de type amyloïde
Composition en hélices α	42%	30%
Composition en feuillets β	3%	42%
Demi-vie	3 à 6h	> 24h
Localisation cellulaire	Membranaire	Lysosomes et extracellulaire (plaques)
Localisation macroscopique	Dans toutes les cellules de l'organisme	Dans le SNC principalement et les organes lymphoïdes
Digestion par la protéinase K	Totale	Partielle
Résistance aux agents physiques (temp, UV..)	Très sensible	Très résistante

La résistance partielle de la PrP^{Sc} à la digestion par la protéinase K (PK) est la propriété biochimique la plus utilisée pour discriminer les deux isoformes, PrP^{C} et PrP^{Sc} (**Figure 20**). En effet, une grande majorité des tests de diagnostic (PMCA, RT-QuIC, QuIC, Elisa,…) utilisent cette propriété, où après digestion à la PK, on peut visualiser la PrP^{Sc}. Parmi les formes de PrP^{Sc}, Safar et ses collaborateurs ont estimé, par le test de CDI (Conformation Dependent Immunoassay) que 80% de la PrP^{Sc} n'est pas résistante à la PK et est appelée « $sPrP^{Sc}$ » pour PrP^{Sc} sensible. Seul 20% de la PrP^{Sc} est résistante à la PK et est appelée $rPrP^{Sc}$, PrP^{res} ou encore $PrP_{27\text{-}30}$, pour PrP^{Sc} résistante à la PK (Safar et al., 2005).

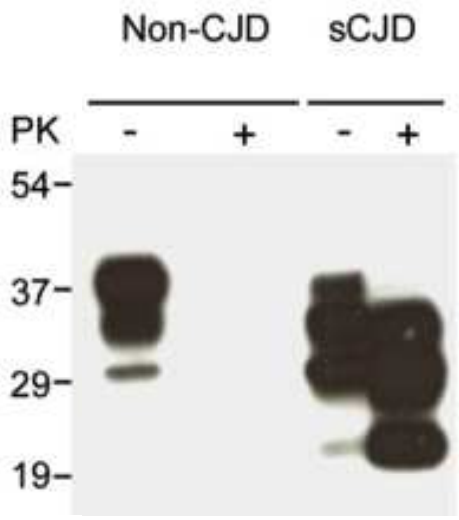


Figure 20. Western blot avant et après digestion à la PK. Dans cet exemple, des homogénats de cerveaux d'un patient sain (Non-CJD) et d'un patient atteint d'une forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (sCJD) ont été utilisés. Après digestion à la PK on ne retrouve aucun signal de la PrP chez le sujet sain, alors que chez le patient atteint de sMCJ on retrouve le profil caractéristique à 3 bandes de la $rPrP^{Sc}$ (Xiao et al., 2013).

IV.5. Phénomène d'ensemencement

Les propriétés physico-chimiques exceptionnelles de la PrP^{Sc} lui permettent de se répliquer et de se propager dans l'ensemble de l'organisme. L'ensemencement se définit comme étant la capacité d'induire la transconformation et l'agrégation de la protéine PrP^{C} soluble en PrP^{Sc} insoluble, en présence de peu de PrP^{Sc}. Ce phénomène implique que les nouveaux agrégats induits doivent ressembler aux agrégats d'origine et qu'ils sont capables eux aussi d'induire de nouveaux agrégats à partir de PrP^{C}.

Des études *in vitro*, réalisées avec des protéines recombinantes tronquées de PrP^{C} de souris (recMoPrP(89-230)) exprimées chez E. Coli et purifiées, repliées en hélice α et solubles, ont montré que cette protéine était capable de s'agréger et de former des structures riches en feuillets β après 3 jours d'incubation à 37°C, sous agitation (Baskakov et al., 2002). La formation des agrégats et des structures riches en feuillets β est monitorée par la Thioflavine T (ThT), un marqueur des feuillets β. La visualisation de ces structures riches en feuillets β en microscopie électronique à transmission a confirmé qu'il s'agissait de fibrilles amyloïdes. L'addition de 0,5% de fibrilles formées, provenant de l'expérience décrite ci-

dessus, à une nouvelle solution contenant de la recMoPrP(89-230) non agrégée (sous forme d'hélice α), provoque l'agrégation des protéines, tout comme dans la première expérience. Néanmoins, la phase de latence n'est plus que de 2 heures, au lieu de 10 heures (Baskakov et al., 2002). Cette expérience illustre complètement le phénomène d'ensemencement *in vitro*, et a été confirmée avec d'autres protéines recombinantes telles que la recPrP(23-144) (Choi et al., 2016), la recPrP(90-231) et la PrP de hamster (Stöhr et al., 2011). De même, Legname et ses collaborateurs ont montré que l'injection intracérébrale de fibrilles synthétiques (recMoPrP(89-230)) purifiées à des souris transgéniques surexprimant la MoPrP(89-231) (Tg9949), étaient capables d'induire la pathologie après 500 jours post-inoculation. Lors d'un second passage le temps d'incubation est réduit de moitié, en moyenne 250 jours (Legname et al., 2004).

IV.6. Modèles de conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc}

La conversion de l'isoforme physiologique de la protéine prion (PrP^{C}) en isoforme pathologique (PrP^{Sc}) constitue une étape clé de la propagation et de l'évolution des différentes ESST. Concernant la protéine prion plusieurs modèles de conversion ont été proposés : le modèle auto-catalytique, celui de nucléation-polymérisation et le modèle de nucléation assistée, qui sont les 3 modèles historiques.

IV.6.1. Modèle de conversion auto-catalytique

Dans ce modèle, l'hypothèse de départ est que la PrP^{C} ne peut pas subir de changement de conformation spontané en PrP^{Sc} à cause d'une barrière énergétique trop importante. La conversion s'opèrerait par un contact de la PrP^{C} endogène avec la forme pathologique PrP^{Sc} d'origine exogène, qui formeraient un complexe. Au sein de ce complexe PrP^{C}-PrP^{Sc}, la PrP^{Sc} modifierait la conformation de la PrP^{C} qui deviendrait à son tour riche en

feuillets β, conduisant à la formation d'un homodimère de PrP^{Sc}. Cet homodimère peut se dissocier en monomères et continuer la conversion de PrP^{C} en PrP^{Sc}, conduisant à une réaction en chaîne. Par ailleurs, les homodimères peuvent aussi former des amas plus conséquents qui peuvent s'agréger entre eux pour former des fibrilles amyloïdes (Aguzzi and Polymenidou, 2004; Aguzzi et al., 2008; Zou and Gambetti, 2005) jusqu'à un seuil critique d'accumulation conduisant à l'apparition des symptômes des maladies à prions (**Figure 21**).

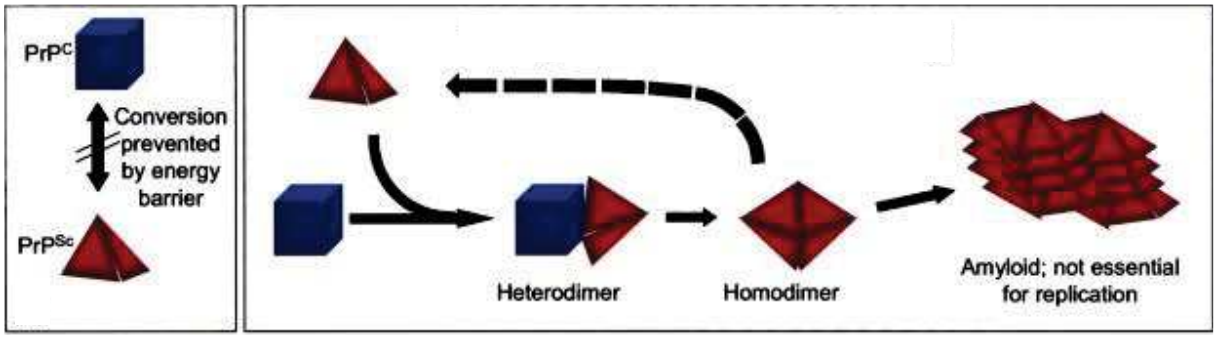


Figure 21. Modèle de conversion auto-catalytique. La conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc} ne peut se produire qu'au contact avec une PrP^{Sc} exogène, formant un hétérodimère. L'homodimère de PrP^{Sc} ainsi formé pourra auto-entretenir le cycle en convertissant d'autres PrP^{C} en PrP^{Sc}, ou s'agréger pour former des fibrilles (d'après Aguzzi and Polymenidou, 2004).

IV.6.2. Modèle de nucléation-polymérisation

Contrairement au modèle précédent, celui-ci est basé sur l'hypothèse que la PrP^{C} et la PrP^{Sc} coexistent dans un équilibre thermodynamique (**Figure 22**). La PrP^{Sc} monomérique s'agrègerait pour former des noyaux de nucléation, qui deviendraient de plus en plus gros jusqu'à former des fibrilles. Ces fibrilles pourraient alors se fractionner en nouveaux noyaux de nucléation pour relancer le cycle et permettre la propagation des prions (Aguzzi and Polymenidou, 2004; Aguzzi et al., 2008; Zou and Gambetti, 2005). Il est à noter, que dans ce modèle, les noyaux de nucléation (petites formes oligomériques de PrP^{Sc}) sont les espèces infectieuses.

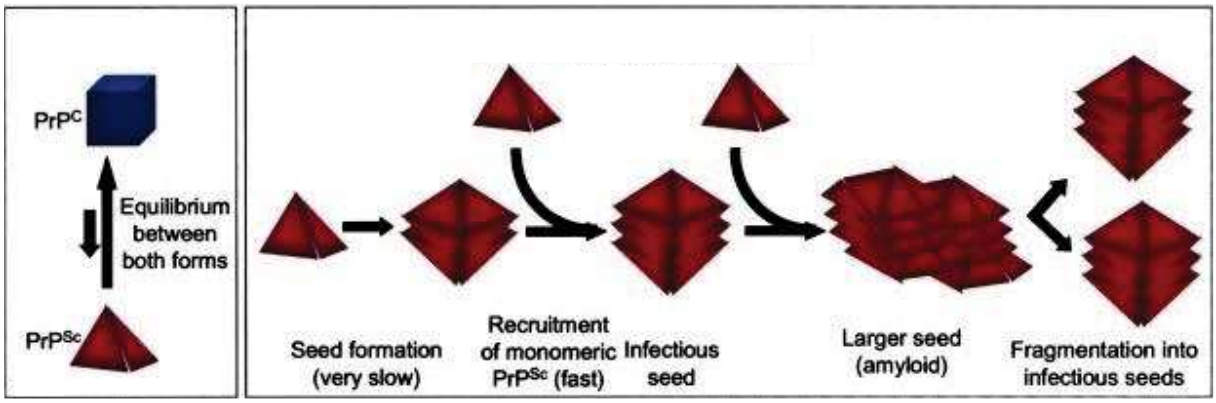


Figure 22. Modèle de nucléation-polymérisation. La PrP^{C} et la PrP^{Sc} coexistent dans un équilibre thermodynamique favorable à la PrP^{C}. La formation de noyaux de nucléation de PrP^{Sc} permet le déplacement de cet équilibre en faveur de la PrP^{Sc}, entraînant la formation de fibrilles amyloïdes. Ces fibrilles vont par la suite se fragmenter en nouveaux noyaux de nucléation et entretenir ce cycle (d'après Aguzzi and Polymenidou, 2004).

IV.6.3. Modèle de nucléation assistée

Dans ce dernier modèle, une forme structurelle intermédiaire (PrP*) serait favorisée par un cofacteur, la « protéine X » qui catalyserait le changement conformationel de la PrP^{C} en PrP^{Sc} (Abid and Soto, 2006; Kaneko et al., 1997; Soto et al., 2006; Telling et al., 1995) (**Figure 23**). Cet état intermédiaire PrP* exposerait les séquences hydrophobes permettant une interaction avec la PrP^{Sc}, et permettrait sa conversion en isoforme pathologique enrichie en feuillets β. Cependant, dans ce modèle la PrP^{Sc} n'existerait que sous forme oligomérique.

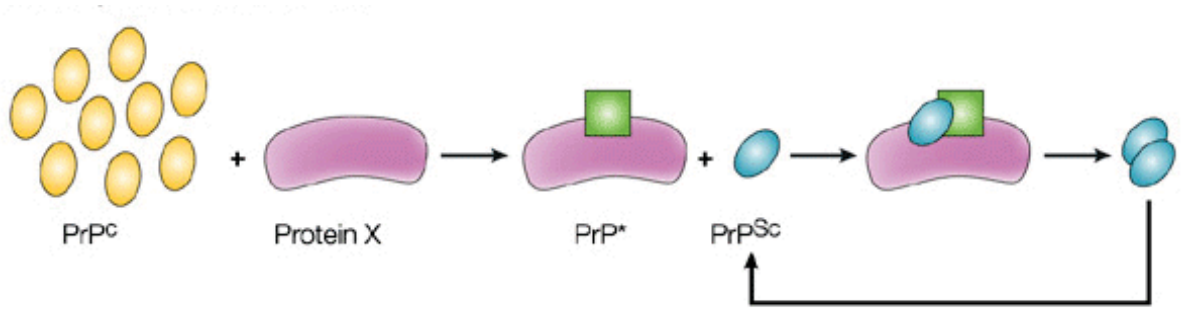


Figure 23. Modèle de nucléation assistée. Dans ce modèle la PrP^{C} avant d'être convertie en PrP^{Sc}, transite par un état conformationel intermédiaire PrP*. Cette PrP*, va ensuite se lier à un cofacteur nommé « protéine X » et en présence de PrP^{Sc} pourra devenir à son tour une isoforme pathologique (d'après Soto, 2004).

Pour l'instant, aucune « protéine X » n'a été identifiée comme cofacteur permettant la conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc}, mais des études ont mis en valeur d'autres molécules. Deleault et ses collaborateurs ont mis en place un protocole *in vitro* de propagation des prions en utilisant la PMCA. Leurs expériences ont montré que lorsque la PrP^{C} de hamster purifiée est incubée en présence d'ARN-poly(A), sans ensemencement préalable avec l'isoforme infectieuse, elle se transforme spontanément en PrP^{Sc} après 16 cycles de PMCA (Deleault et al., 2007). Les auteurs ont fait l'hypothèse que les ARN-poly(A) pourraient être à l'origine de la formation spontanée de PrP^{Sc} pouvant expliquer l'apparition des formes sporadiques des ESST. La PrP^{Sc} est capable de se propager sans la présence d'ARN-poly(A) ou autres molécules chargées négativement (acides nucléiques, lipides,…) mais l'interaction des ARN-poly(A) avec la PrP^{C} ou la PrP^{Sc} pourrait augmenter la vitesse de propagation des prions. La nature ou la séquence de ces ARN pourrait expliquer l'existence de différentes souches des prions (Deleault et al., 2007).

Il est possible que les 3 modèles de conversion présentés ci-dessus puissent coexister au sein d'un même hôte. Ainsi, dans les cas d'ESST d'origine sporadique, des cofacteurs tels que des ARN-poly(A) pourraient déclencher une conversion assistée de la PrP^{C} en PrP^{Sc}, permettant de s'affranchir de la forte barrière énergétique proposée dans le modèle de conversion auto-catalytique. Au fur et à mesure de l'accumulation de la PrP^{Sc}, nous pourrions supposer que les monomères de PrP^{Sc} s'assemblent entre eux pour former des dimères, puis des oligomères solubles toxiques pour finalement former des fibrilles tels que présentés dans les modèles auto-catalytique et de nucléation-polymérisation. Le cycle s'auto-entretiendrait par la fragmentation des fibrilles créant de nouveaux noyaux de nucléation capables de poursuivre la conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc}, contribuant à l'accumulation et à la propagation des agrégats. Du fait de la forte augmentation de PrP^{Sc}, l'équilibre entre PrP^{C} et PrP^{Sc} pourrait

être déplacé en faveur de l'isoforme pathologique, comme proposé dans le modèle de nucléation-polymérisation, continuant à entretenir le cycle de propagation des prions.

IV.7. Propagation inter-cellules

IV.7.1. Propagation par contact cellule-cellule

Un des mécanismes de propagation des prions est un contact direct entre cellules. Par des expériences de co-culture de cellules dendritiques infectées par des prions et de neurones de cervelet non infectés, Langevin et ses collaborateurs ont montré une propagation des prions d'un type cellulaire à un autre par simple contact (Langevin et al., 2010). Ce mécanisme de propagation a été confirmé par plusieurs études et montre la transmission des prions entre différents types cellulaires, tels que le contact astrocytes-neurones (Victoria et al., 2016), ou encore les contacts neurones-neurones (Gousset et al., 2009).

IV.7.2. Endocytose des protéines prions

La PrP^{C} tout comme la PrP^{Sc}, lorsqu'elles sont ancrées à la membrane plasmique, peuvent être endocytées. Lors de ce processus, les protéines se retrouvent dans des domaines membranaires riches en clathrine (Huotari and Helenius, 2011). Ainsi, les vésicules crées lors de l'internalisation des protéines vont maturer et devenir des endosomes précoces puis des endosomes tardifs. Dans les endosomes tardifs, deux cas de figure se mettent en place : soit les protéines sont envoyées dans les lysosomes pour dégradation, soit elles sont recyclées et renvoyées au niveau de la membrane plasmique (Huotari and Helenius, 2011). Concernant la protéine prion, des expériences réalisées par Shyng et ses collaborateurs sur de la PrP de poulet (chPrP) dans des cultures cellulaires de neuroblastomes ont montré que la séquence N-terminale de la protéine prion serait nécessaire au processus d'endocytose (Shyng et al., 1995). Deux scénarios peuvent être envisagés :

- Dans un premier cas, une protéine de PrP^{Sc} ancrée à la membrane est endocytée conjointement avec d'autres protéines prions saines, PrP^{C}. Au niveau des vésicules internalisées, la PrP^{Sc} peut initier le processus de transconformation de la PrP^{C} en PrP^{Sc} augmentant la quantité de PrP^{Sc} contenue dans ces vésicules. Ainsi, lors du recyclage des protéines, l'isoforme pathologique pourra être ré-adressée à la membrane plasmique (Goold et al., 2013), pouvant ainsi continuer à se propager.
- Dans un deuxième cas, il peut être envisagé que lors des processus d'endocytose, de la PrP^{Sc} présente dans le milieu extracellulaire soit piégée dans ces vésicules. Ainsi, le processus expliqué ci-dessus pourra également se produire (Aguzzi and Lakkaraju, 2016) (**Figure 24**).

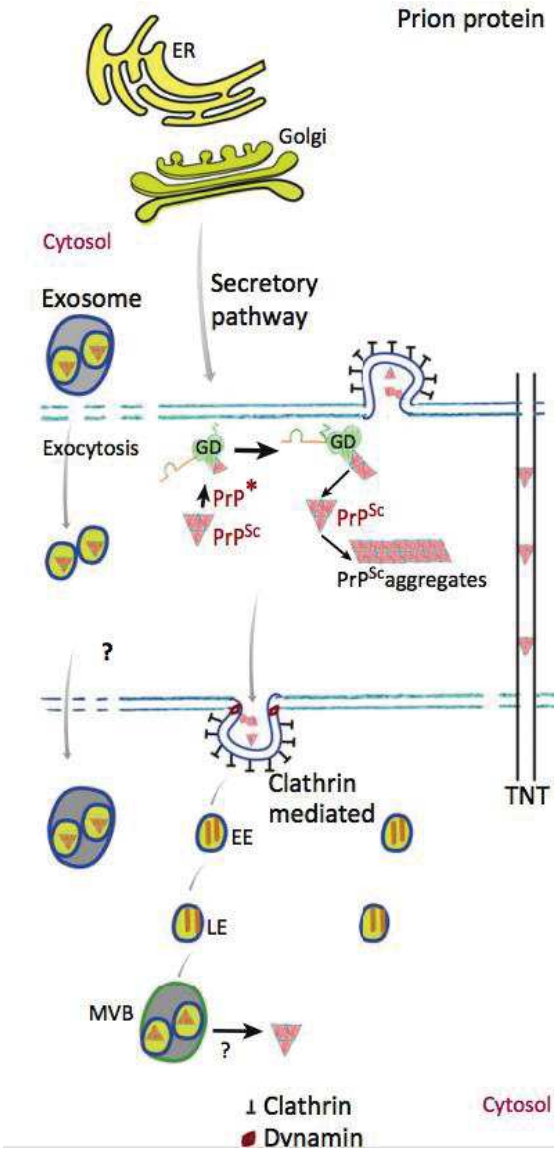


Figure 24. Synthèse de quelques voies de propagation des prions entre cellules. EE : endosomes précoces, LE : endosomes tardifs, MVB : corps multi-vésiculaires et TNT : nanotubes (extrait de Aguzzi and Lakkaraju, 2016).

IV.7.3. Propagation par l'excrétion de vésicules

Des études menées sur des cultures de cellules épithéliales de lapin exprimant la PrP ovine (Rov), infectées ou non avec un homogénat de cerveau de mouton atteint de tremblante, ont montré que la PrP^{C} et la PrP^{Sc} étaient présentes dans le milieu extracellulaire (Fevrier et al., 2004). Par des techniques d'électrophorèse et de spectrométrie de masse, les auteurs ont démontré que la sécrétion des 2 isoformes était associée à des exosomes, contribuant à la libération des prions dans le milieu extracellulaire (**Figure 24**). D'autres types de vésicules

telles que les microvésicules peuvent être sécrétées et directement re-capturées par des cellules voisines (effet paracrine) propageant la PrP^{Sc} d'une cellule infectée à une cellule naïve (**Figure 24**) (Mattei et al., 2009). Arellano et ses collaborateurs ont démontré, sur une lignée cellulaire épithéliale (cellules rénales de lapin, RK13) infectée par 3 souches différentes, que la plupart des prions extracellulaires provenaient de la sécrétion d'exosomes, et que la proportion de prions sécrétée dépend de la souche (Arellano-Anaya et al., 2015).

IV.7.4. Propagation par des nanotubes

Un autre mécanisme de propagation intercellulaire pouvant jouer un rôle dans la propagation des prions se ferait par l'intermédiaire de nanotubes (**Figure 24**). Ces éléments sont des structures membranaires contenant de l'actine filamenteuse créant un pont entre différentes cellules. Sur une lignée neuronale infectée par des prions (ScCAD), des vésicules d'endocytose circulant dans des nanotubes reliant 2 neurones co-localisent avec la PrP^{Sc}, illustrant un transfert intercellulaire des prions (Gousset et al., 2009; Zhu et al., 2015).

IV.8. Propagation des prions : de la périphérie à la neuro-invasion

Comme exposé ci-dessus, les prions ont la capacité de se propager au niveau microscopique (de cellule en cellule) mais peuvent aussi se propager au niveau macroscopique (d'un organe à un autre). A cette fin, les prions s'appuient sur des mécanismes physiologiques de l'hôte, en particulier le système immunitaire, et les détournent à son avantage pour se propager à l'ensemble de l'organisme.

Dans un contexte d'un apport exogène de prions lié à l'ingestion de viandes animales contaminées, la PrP^{Sc} va se retrouver au niveau du système digestif. Par cette voie, les prions vont pouvoir s'accumuler dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou le tissu lymphoïde associé aux muqueuses digestives (plaques de Peyer) (**Figure 25**). Des expériences

menées sur des souris ayant subi une splénectomie ont révélé l'importance de la rate dans le processus de neuro-invasion. En effet, Fraser et ses collaborateurs ont réalisé une injection intrapéritonéale de prions (souche ME7) chez des souris splénectomisées et ont observé que la phase asymptomatique de la maladie est augmentée de 10 à 30%, avec une neuro-invasion par les prions plus tardive (Fraser and Dickinson, 1970, 1978). La rate joue donc un rôle dans la neuro-invasion des prions et en serait un site d'amplification et de réplication.

Des expériences similaires réalisées sur des souris n'exprimant plus de plaques de Peyer au niveau du petit intestin et contaminées par voie orale avec un homogénat de cerveau de souris au stade terminal (souche ME7), ont révélé une augmentation de la période d'incubation asymptomatique, montrant un rôle des plaques de Peyer dans la propagation des prions (Donaldson et al., 2015). Au niveau mécanistique, lors de l'ingestion de prions par voie orale, ceux-ci peuvent, au niveau de l'intestin, traverser l'épithélium intestinal via les cellules M (cellules surplombant les plaques de Peyer) (Donaldson et al., 2012) ou via les entérocytes par un mécanisme de transcytose (Kujala et al., 2011) (**Figure 25**). Après passage de la barrière intestinale, les prions sont reconnus par les macrophages et les cellules dendritiques (cellules circulantes) et vont être transportés jusqu'aux cellules dendritiques folliculaires (CDF) au niveau des plaques de Peyer. Les prions vont pouvoir se répliquer et s'accumuler dans CDF. Ce processus a été démontré au sein de différentes espèces telles que les moutons (Andréoletti et al., 2000), les cervidés (Sigurdson et al., 1999) et chez l'Homme (Hilton et al., 1998). Les CDF sont des cellules résidentes des organes lymphoïdes secondaires qui nécessitent une maturation par l'intermédiaire des lymphocytes B. Les CDF matures pourront alors être détournées par les prions pour réaliser la neuro-invasion (Kapasi et al., 1993). Chez des souris SCID (immunodéficientes), l'absence de maturation des cellules dendritiques folliculaires liée à l'absence de lymphocytes B, conduit à une diminution et un retard de la neuro-invasion (Brown et al., 1999). Après une greffe de moelle osseuse

apportant des lymphocytes B, le phénotype de neuro-invasion est restauré. Après amplification et réplication des prions au niveau des CDF, ces derniers peuvent alors infecter les systèmes nerveux sympathique et parasympathique et se propager jusqu'au tronc cérébral, conduisant à la neuro-invasion (**Figure 25**) (Beekes and McBride, 2000; Glatzel et al., 2001; McBride et al., 2001).

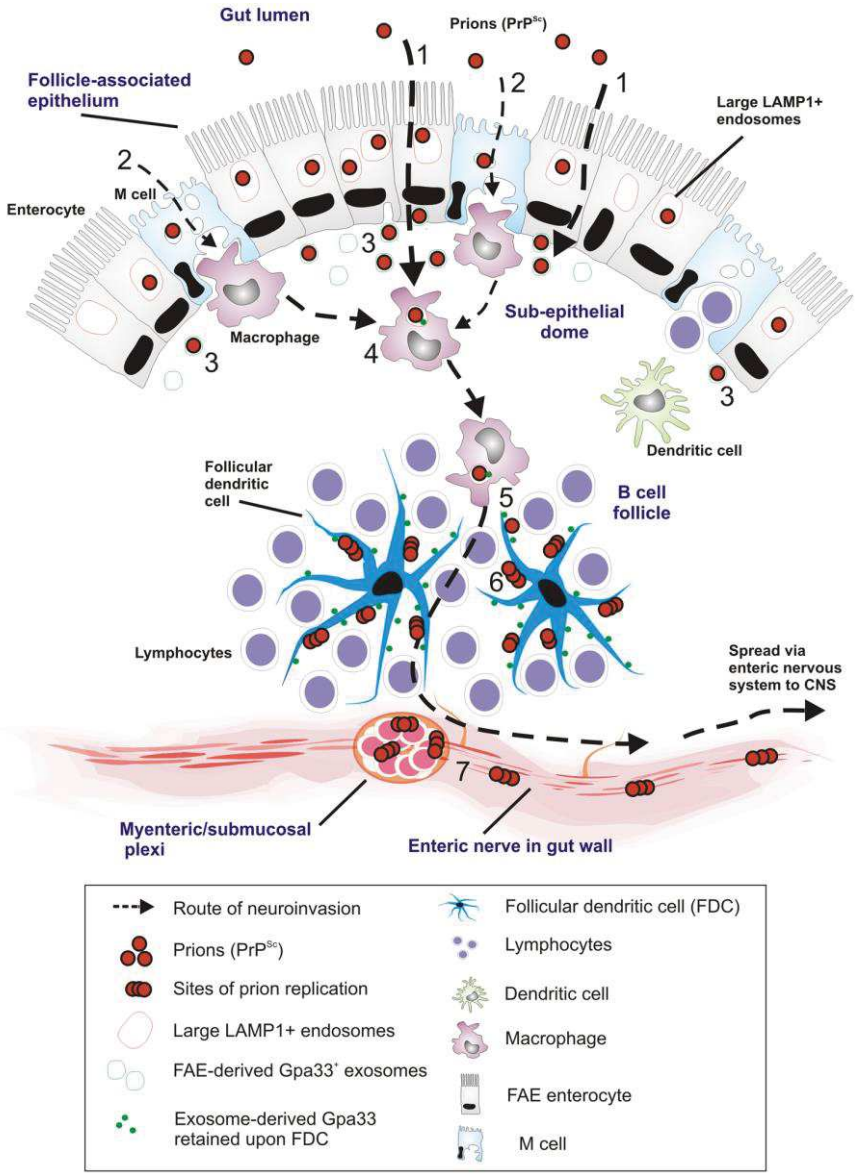


Figure 25. Schéma de la neuro-invasion des prions à partir du système digestif (d'après Kujala et al., 2011). Les prions présents au niveau de l'intestin peuvent traverser la barrière intestinale via les entérocytes (**1**) ou les cellules M (**2**) par un mécanisme de transcytose aboutissant à la libération des prions dans la matrice extracellulaire (**3**). Les prions sont capturés par les macrophages et les cellules dendritiques (**4**) et libérés au niveau des plaques de Peyer composées en majorité de cellules dendritiques folliculaires (CDF) (**5**). Les prions s'accumulent à la surface des CDF et se répliquent (**6**) puis peuvent se propager au système nerveux central via le système nerveux autonome (nerfs entériques) (**7**).

Le rôle des CDF dans la pathogenèse des maladies à prions serait d'amplifier les prions jusqu'à atteindre un seuil requis à la neuro-invasion. La manière dont les prions infectent le système nerveux périphérique n'est pas clairement élucidée, car il n'existe pas de contact physique direct entre les CDF et les fibres nerveuses du système nerveux autonome (SNA). Cependant, il semblerait que la distance entre les CDF et les fibres nerveuses sympathiques modulent le taux de neuro-invasion (Prinz et al., 2003).

D'autres éléments suggèrent que les lipides joueraient un rôle dans la pathogenèse des prions. Il a été montré que la conversion auto-catalytique de la PrP^{C} en PrP^{Sc} se produit dans des domaines membranaires enrichis en cholestérol, les radeaux lipidiques (Pinheiro, 2006; Vey et al., 1996). Les phospholipides agiraient également comme cofacteurs dans ce processus de conversion (Deleault et al., 2012; Tsiroulnikov et al., 2009). Safar et ses collaborateurs ont montré que la PrP^{Sc} provenant d'homogénats de cerveaux de patients atteints de la MCJ est associée aux LDL (low-density lipoprotein) et VLDL (very low-density lipoprotein) mais pas aux HDL (high-density lipoprotein) (Safar et al., 2006). Ces cargos lipidiques permettent le transport de cholestérol dans le sang. L'association PrP^{Sc}-LDL/VLDL résulterait d'une interaction spécifique entre la PrP et l'ApoB (apolipoprotéine B), le principal composant protéique de ces cargos lipidiques. Ces résultats *in vitro* suggèrent que les lipoprotéines agissent comme des transporteurs de la protéine prion dans la circulation périphérique (Safar et al., 2006).

Récemment, une étude *in vivo* a confirmé ces résultats. Dans cette étude, Perrier et ses collaborateurs ont utilisé un modèle murin déficient en protéine de transfert des phospholipides (*Pltp*$^{-/-}$) (Perrier et al., 2017) (article en annexe de la thèse). La PLTP est une protéine de transport lipidique extracellulaire impliquée dans le métabolisme des lipides (Albers et al., 2012; Jiang et al., 2012; Tzotzas et al., 2009) et joue un rôle majeur dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines contenant l'ApoB (Jiang et al., 2005; Liu et al.,

2007). Les souris *Pltp*$^{-/-}$ présentent une diminution marquée du taux de cholestérol plasmatique et réagissent fortement aux régimes hypercholestérolémiants. Après inoculation en intrapéritonéal de prions (souche 22L), il a été observé une augmentation significative du temps de survie des souris *Pltp*$^{-/-}$ par rapport aux souris contrôles. Cependant, lorsque le taux de cholestérol circulant est rétabli par un régime riche en lipides, une réduction significative du temps de survie a été observée avec une accumulation cérébrale de PrP^{Sc} plus importante chez les souris *Pltp*$^{-/-}$ (Perrier et al., 2017). Ces résultats suggèrent que le taux de cholestérol circulant est un déterminant de la propagation des prions *in vivo*.

IV.9. Actions neurotoxiques de la PrP^{Sc} par perte ou gain de fonction de la PrP^{C}

Les maladies à prions se caractérisent par une mort neuronale qui se traduit par la présence de nombreuses vacuoles au niveau du tissu cérébral et qui est à l'origine des différents tableaux cliniques observés dans les ESST. Ainsi la présence de PrP^{Sc} semble être à l'origine de cette neurodégénérescence. Deux mécanismes principaux ont été proposés pour expliquer ce phénomène.

La PrP^{Sc} exercerait un effet « dominant négatif » sur la PrP^{C} et aurait comme conséquence une perte de fonction de la PrP^{C}. Dans ce contexte, les effets physiologiques neuroprotecteurs de la PrP^{C} (c.f. **Tableau 2**) sont abolis. Pietri et ses collaborateurs, ont montré sur la lignée 1C11 que l'activation de l'α-sécrétase TACE se produit par la voie de signalisation PrP^{C}-Fyn-NADPH oxydase conduisant au clivage du récepteur TNFR1, le rendant ainsi soluble (Pietri et al., 2013). Dans un contexte d'infection par la PrP^{Sc} ou de déplétion de la PrP^{C}, cette voie de signalisation ne peut plus être activée par la PrP^{C}, conduisant à l'internalisation de TACE et donc a une présence accrue des récepteurs TNFR1 à la memebrane plasmique (Ezpeleta et al., 2017; Pietri et al., 2013). Les cellules sont alors plus vulnérables aux effets pro-inflammatoires néfastes du TNFα, induisant la mort du neurone.

Le deuxième modèle est lié à un gain de fonction via l'interaction PrP^{C}-PrP^{Sc} transformant les cascades intracellulaires neuroprotectrices en signaux neurotoxiques. Du fait que les souris *Prnp*$^{-/-}$ ne développent pas d'ESST après infection par les prions (Manson et al., 1994) laisse supposer que la PrP^{C} est requise pour induire les cascades de signalisations toxiques de la PrP^{Sc}.

La coexistence de ces 2 effets, perte et gain de fonctions, pourrait expliquer la propagation spatio-temporelle des prions dans les différentes ESST, en fonction de la prédominance de l'un ou l'autre des deux processus (Leighton and Allison, 2016).

V. Modèles murins des maladies à prions

La découverte de la transmission des ESST aux primates a été le point de départ pour le développement de nombreux modèles *in vivo*. En effet, même si les modèles primates reproduisent les caractéristiques histologiques et les symptômes cliniques des maladies à prions humaines, ces modèles présentent plusieurs limites : le coût prohibitif du maintien de la colonie, une longue durée d'expérimentation, une hétérogénéité au sein des animaux de la colonie et plus dernièrement des problèmes éthiques.

Pour contourner ces limites, différents modèles de rongeurs (hamsters, souris sauvages, souris transgéniques) ont été développés pour caractériser et comprendre les mécanismes physiopathologiques des maladies à prions. Ces modèles présentent plusieurs avantages : un temps d'incubation beaucoup plus court, un coût plus faible et une plus grande homogénéité au sein de la colonie.

V.1. Les souris consanguines

Les souris consanguines ont été très utilisées pour l'étude des maladies à prions en particulier pour les différentes souches et la transmission inter-espèces. Plusieurs fonds génétiques ont été testés tels que les C57Bl/6J, C57Bl/6N ou encore FVB. Ces souris WT ont été initialement utilisées pour étudier la transmission de la tremblante du mouton chez la souris et ses caractéristiques (propagation, neurodégénérescence, étude des différentes souches de prions) (Kingsbury et al., 1983). Ainsi, la transmission de la tremblante aux souris a permis la création de différentes souches de prions, encore utilisées de nos jours, telles que la souche ME7, 22L, RML ou encore 79A (Striebel et al., 2011). Les limites de ce modèle sont apparues lorsque des équipes de recherche ont tenté de transmettre des ESST humaines aux souris (Bruce et al., 1997). Cette limite a conduit à la notion de « barrière de transmission » ou « barrière d'espèces » qui se caractérise par des taux de transmission faibles au sein d'un même groupe d'animaux et des temps d'incubation très longs.

V.2. Les modèles de knock-out du gène *Prnp* (*Prnp*$^{-/-}$)

En 1992, le premier modèle de souris *Prnp*$^{-/-}$ a été réalisé par l'équipe du Dr. Weissmann (Büeler et al., 1992, 1993). Depuis, 7 modèles supplémentaires ont été créés (**Figure 26**). Le knock-out pour le gène codant pour la protéine prion est obtenu en délétant une partie significative du cadre de lecture du gène *Prnp* conduisant à l'absence de production de la PrP^{C}. Certains modèles *Prnp*$^{-/-}$ ont un phénotype très réduit, comme par exemple les modèles Zürich et Edinburgh (Manson et al., 1994). Cependant d'autres modèles ont des phénotypes plus poussés comme le modèle Nagasaki qui présente une ataxie causée par une perte progressive des cellules de Purkinje du cervelet (Sakaguchi et al., 1996). Il a été démontré plus tard que cette ataxie était lié à la surexpression d'un gène, nommé *Doppel*

(*Dpl*), qui est normalement très peu exprimé dans le système nerveux central (Moore et al., 1999).

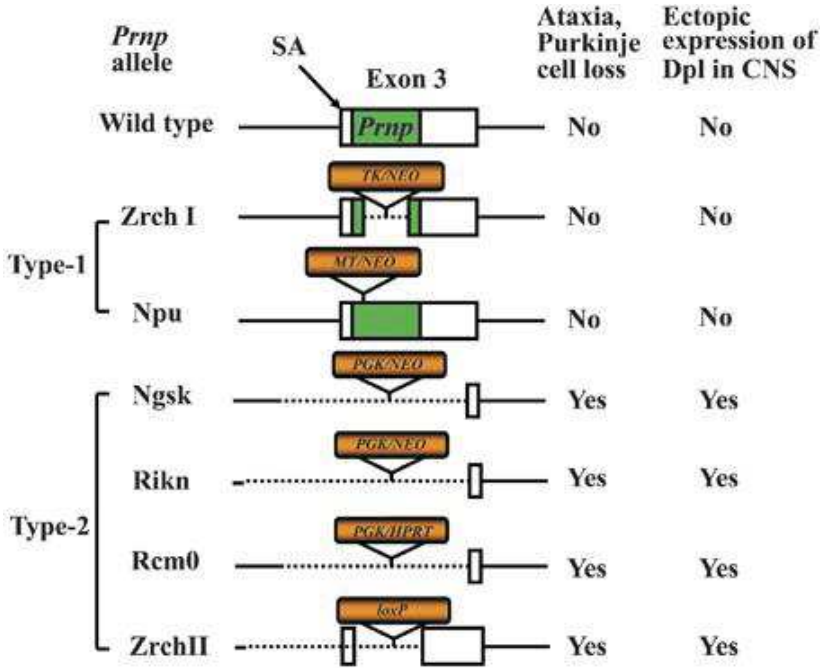


Figure 26. Construction des souris knock-out pour le gène *Prnp* de la protéine prion. Les constructions de type I n'induisent pas de surexpression du gène *Doppel* contrairement aux constructions de type II (d'après Sakudo and Onodera, 2014).

V.3. Les modèles transgéniques

La création des modèles *Prnp*$^{-/-}$ a été une étape essentielle pour générer des modèles transgéniques. L'insertion de transgènes dans les souris *Prnp*$^{-/-}$, permettant l'expression de la PrP^{C} d'une autre espèce (humaine, bovine, ovine,…), a contribué à s'affranchir des problèmes de « barrière d'espèces » (temps d'incubation long, taux d'infectiosité faible) et d'étudier la transmission et les caractéristiques histologiques et biochimiques des souches des prions (Telling et al., 1994).

De nombreuses souris transgéniques ont été utilisées pour étudier la fonction de la protéine prion et pour étudier les formes familiales des maladies à prions. Elles peuvent exprimer des protéines prions mutées (Owen et al., 1989) ou délétées d'une partie de leur séquence (Fischer et al., 1996).

Chapitre II. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative à évolution lente conduisant à une dégénérescence progressive du système nerveux central. Il s'agit de la démence la plus répandue dans le monde (60 à 70% des cas) et selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) elle toucherait plus de 47,5 millions de personnes dont 900 000 en France pour l'année 2016 (www.who.int/dementia). Plus récemment, les prédictions ont été réévaluées et le nombre de personnes atteintes de démence pourrait atteindre 82 millions en 2030 et 152 millions en 2050, au vu du vieillissement de la population mondiale (Alzheimer's Disease International, 2018). Parallèlement, selon le dernier rapport de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique), regroupant 36 pays, les cas de démences de ces pays avoisineraient les 19 millions de patients en 2030, et augmenteraient jusqu'à 40,9 millions d'ici à 2050 (OECD, 2018). A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de la maladie d'Alzheimer.

I. La maladie d'Alzheimer

La MA fût décrite pour la première fois en 1906 par le neurologue et psychiatre Alois Alzheimer (Alzheimer, 1906). Après une analyse *post-mortem,* du cerveau d'une patiente atteinte de troubles de la mémoire, le Dr. A. Alzheimer observa des lésions qu'il décrivit comme des amas et des agrégats. De nos jours, ces amas et ces agrégats sont appelés plaques séniles et enchevêtrements neurofibrillaires et constituent les deux marqueurs histologiques de la MA. La maladie d'Alzheimer se présente sous deux formes : les formes sporadiques et les formes génétiques.

I.1. Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer

Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer sont les plus fréquentes et représentent plus de 95% des cas (Rocchi et al., 2003). Ces formes se caractérisent par une apparition tardive des symptômes chez des sujets de plus de 65 ans et sont nommées « late-onset ». Il n'existe pas de causes précises induisant les formes sporadiques de la MA, mais il s'agirait plutôt d'un mélange de facteurs de risque qui prédisposeraient à l'apparition de la maladie. Ci-dessous sont décrits les principaux facteurs de risques.

➔ ***L'âge***

L'âge constitue le facteur de risque majeur dans l'apparition de la MA. La prévalence de la pathologie augmente avec l'âge et son incidence passe de 2,8 cas/1000 individus pour des personnes entre 65 et 69 ans, à 56,1 cas/1000 individus pour des personnes de plus de 90 ans (Kukull et al., 2002; Puglielli et al., 2003; Zhou et al., 2006).

➔ ***L'apolipoprotéine E4 (ApoE4)***

L'ApoE appartient à la famille des apolipoprotéines qui sont impliquées dans le métabolisme lipidique (triglycérides et cholestérol). Dans le système nerveux central, l'ApoE est principalement produite par les astrocytes (Fujita et al., 1999) et permet le transport du cholestérol vers les neurones à travers les récepteurs aux lipoprotéines (LDLR, VLDLR,…) (Liu et al., 2013). Elle est le principal transporteur de cholestérol au niveau cérébral.

Le gène codant pour l'ApoE se situe sur le bras long du chromosome 19 et code pour 3 isoformes différentes E2, E3 et E4 associées à 3 allèles différentes ε2, ε3 et ε4 (Huang et al., 2004). Chaque isoforme se différencie de l'autre par un polymorphisme au niveau de 2 nucléotides, changeant leur composition en AA et donc leur structure tridimensionnelle. Cette modification entraîne une variation de l'affinité de ces protéines envers les lipides : l'ApoE2

et 3 se lient préférentiellement aux HDL, alors que l'ApoE4 a une plus grande affinité pour les VLDL (Mahley et al., 2006).

La présence de l'allèle ApoE ε4 est un facteur de risque de développement de formes sporadiques de la MA (van Duijn et al., 1994; Schmechel et al., 1993; Wisniewski et al., 1994). L'expression hétérozygote de l'ApoE ε4 (ε2/ε4 ou ε3/ε4) augmente la probabilité de développer la maladie d'Alzheimer de 40% et elle atteint 50 à 90% pour les individus homozygotes (ε4/ε4) (Tanzi and Bertram, 2005). Plusieurs rôles de l'ApoE4 ont été démontrés pouvant expliquer cette susceptibilité accrue au développement de la maladie :

- Par des expériences *in vitro*, sur des peptides synthétiques d'Aβ□□□□, Wisniewski et ses collaborateurs ont montré qu'en présence d'ApoE4, l'agrégation du peptide Aβ était accélérée par rapport au peptide seul ou en présence d'ApoE3. Par microscopie électronique, les auteurs ont constaté une forte augmentation du nombre de fibrilles en présence d'ApoE4 (Wisniewski et al., 1994). Holtzman et ses collaborateurs ont croisé des souris transgéniques exprimant une forme humaine de la protéine précurseur de l'amyloïde (hAPP) contenant la mutation V717F avec des souris KO pour le gène de l'ApoE endogène ($ApoE^{-/-}$), conduisant à des souris $hAPP_{V717F}$-$ApoE^{-/-}$. Ce modèle a mis en évidence un faible nombre de plaques dans le néocortex et des plaques abondantes au niveau de l'hippocampe (Holtzman et al., 2000). Afin d'étudier l'effet de l'ApoE sur la formation des plaques amyloïdes, les auteurs ont accouplé les souris $hAPP_{V171F}$-$ApoE^{-/-}$ à des souris transgéniques exprimant la forme humaine de l'ApoE3 ou 4. L'étude de ces souris révèle que l'expression de l'ApoE4 entraine 10 fois plus de plaques par rapport aux souris exprimant l'ApoE3 (Holtzman et al., 2000). L'ApoE4 a donc un effet pro-agrégant.
- Les souris double transgéniques $hAPP_{Swe/Ind}$-$hApoE4^{+/+}$ dans un contexte KO pour l'ApoE endogène, ont une apparition plus rapide des déficits cholinergiques au niveau

de l'hippocampe et du cortex par rapport à des souris exprimant l'hApoE3 (Buttini et al., 2002). Etant donné que des déficits cholinergiques sont observés dans la MA, ces données *in vivo* pourrait en partie expliquer le risque accru de développer la maladie lorsque l'allèle ApoE ε4 est exprimée.

- D'autres rôles de l'ApoE4 ont été proposés. L'ApoE a un rôle dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique des neurones en apportant les lipides nécessaires à leur réparation. Des études *in vivo* ont montré que l'ApoE4 serait l'isoforme la moins efficace, pouvant conduire à une neurodégénérescence accrue (Buttini et al., 1999; Poirier et al., 1995). Par ailleurs, l'ApoE est majoritairement exprimée au niveau des astrocytes mais il semblerait qu'au cours de la MA, l'expression se produise aussi au niveau des neurones (Xu et al., 1996, 1998). Ainsi, l'expression de l'ApoE4 au niveau neuronal a pour conséquence une altération du transport axonal et une dégénérescence axonale (Tesseur et al., 2000).

➔ ***Autres facteurs de risque***

S'ajoutent aux 2 facteurs présentés ci-dessus de nombreux facteurs environnementaux qui peuvent influencer l'apparition de la MA. Ainsi, le genre jouerait un rôle sur la prévalence de la maladie. Plusieurs études ont montré que les femmes sont plus touchées que les hommes (Zhou et al., 2006).

Une activité physique pratiquée régulièrement pourrait prévenir l'apparition de la maladie et limiter le déclin cognitif (Stranahan et al., 2006; Weuve et al., 2006), de même qu'une alimentation de type méditerranéenne (Berti et al., 2018; Gardener and Caunca, 2018). Le niveau d'éducation est aussi associé à la MA. Plus le niveau est bas plus le risque d'apparition de la maladie est élevé (Gatz et al., 2001; Ott et al., 1995; Sharp and Gatz, 2011).

D'autres facteurs environnementaux tels que les pesticides et les métaux lourds contribuent à l'étiologie et l'aggravation de la maladie d'Alzheimer (Chin-Chan et al., 2015; Yegambaram et al., 2015). Le rôle des pesticides comme facteur de risque dans le développement de la MA est plus amplement détaillé dans le chapitre III.

Certaines maladies peuvent être un facteur de susceptibilité pour la MA tels que le syndrome de Down (trisomie 21) (Lott and Head, 2005; Nistor et al., 2007), le diabète de type II (Naseer et al., 2014; Ott et al., 1999), ou encore les accidents vasculaires cérébraux (Altieri et al., 2004; Desmond et al., 2002). La composition du microbiote peut aussi influencer le développement de la MA (Jiang et al., 2017; Wu et al., 2017).

I.2. Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer

Les formes familiales de la MA sont dues à des mutations sur 3 gènes clés codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), la préséniline 1 (PSEN1) et la préséniline 2 (PSEN2). Ces formes sont plutôt rares et constituent environ 5% des cas (Rocchi et al., 2003). Elles se caractérisent par une apparition précoce des symptômes chez des personnes de moins de 65 ans (moyenne : 45 ans) (Masters et al., 2015) et sont nommées « early-onset ». Dans certaines familles, des cas très précoces ont été observés touchant des patients âgés de 30 ans (Portet et al., 2003). L'étude de familles développant ces formes précoces a mis en évidence un mode de transmission autosomique dominant de la pathologie (Bird, 1993; Ryan et al., 2016; Wingo et al., 2012).

➔ ***Mutations dans la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)***

Le gène codant pour l'APP se situe sur le chromosome 21 et, à ce jour, plus de 50 mutations ont été recensées pour les formes familiales de la MA (selon la base de données

« Alzheimer disease and frontotemporal dementia mutation database », www.molgen.ua.ac.be/admutations/) (**Figure 27**).

La plupart des mutations ont pour conséquence d'augmenter la production des peptides Aβ et de modifier le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (Weggen and Beher, 2012). L'augmentation de la production des peptides Aβ est due à la présence de mutations aux niveaux des sites de clivage par les sécrétases (α, β, γ). Cependant, il existe aussi des mutations qui sont protectrices telle que la mutation A673T, proche du site de clivage β, qui diminuerait de 40% la synthèse de peptides Aβ, *in vitro* (Jonsson et al., 2012; Kero et al., 2013).

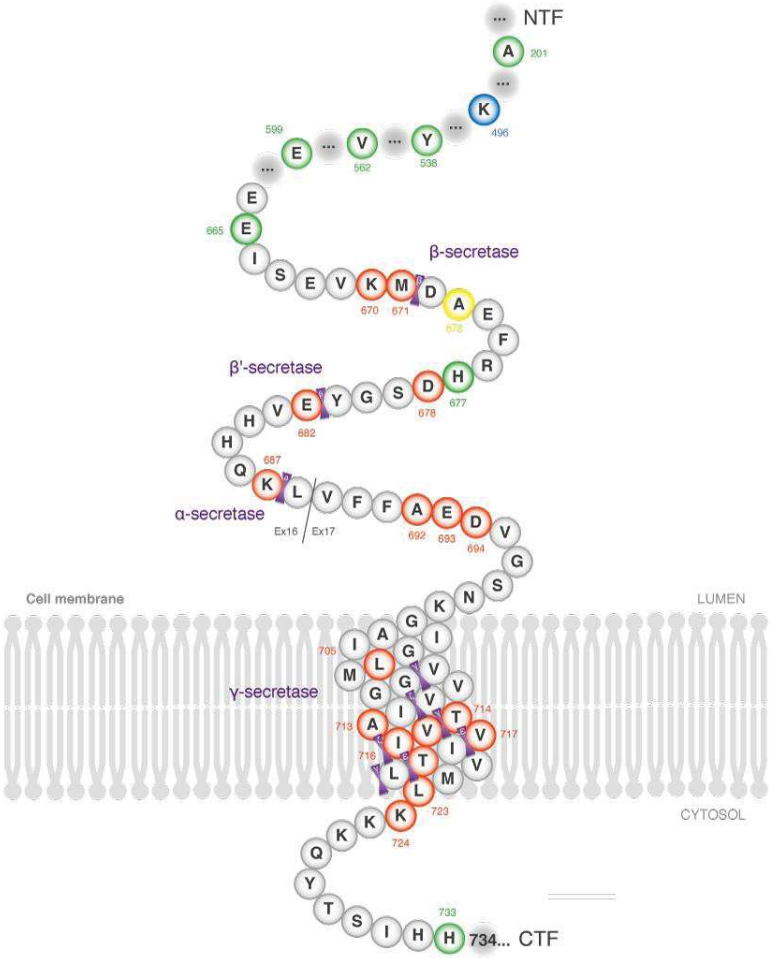


Figure 27. Les différentes mutations de l'APP. Illustration des différentes mutations retrouvées sur l'isoforme 770 de l'APP. Les mutations représentées en rouge augmentent la pathologie, en vert les mutations non pathogéniques, en jaune les mutations protectrices et celles en bleu les mutations dont l'effet n'est pas connu. NTF et CTF correspondent aux extrémités N et C-terminales, respectivement (extrait de www.alzforum.org/mutations).

➔ ***Mutations dans la préséniline 1 (PSEN1)***

Un autre gène identifié *Psen1*, dont des mutations sont liées aux formes familiales de la MA, est situé sur le chromosome 14 et code pour la préséniline 1 (PSEN1) (Sherrington et al., 1995). La PSEN1 fait partie du complexe de la γ-sécrétase et se retrouve associée à la nicastrine, à l'APH1 (anteroir pharynx-defective 1) et à la PEN2 (presenilin enhancer 2). Plus de 200 mutations sont répertoriées pour cette protéine (**Figure 28**) (Somavarapu and Kepp, 2016). Les mutations de la PSEN1 sont les plus fréquentes et représentent 70% des formes familiales. Elles sont les plus agressives avec une apparition plus précoce des symptômes (entre 30 et 50 ans) et conduisent à une surproduction du peptide $A\beta_{1-42}$, et à une modification du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (Somavarapu and Kepp, 2016).

Figure 28. Mutations retrouvées au niveau de la PSEN1 (467 AA). En rouge sont représentées les mutations augmentant la pathologie, en vert les mutations non pathogéniques, en jaune les mutations protectrices et celles en bleu, les mutations dont l'effet n'est pas connu (extrait de www.alzforum.org/mutations).

➔ ***<u>Mutations dans la préséniline 2 (PSEN2)</u>***

Le troisième gène identifié situé sur le chromosome 1 est *Psen2*. Il code pour la préséniline 2 (PSEN2) et fait partie du complexe de la γ-sécrétase (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995). Les mutations associées représentent environ 5% des formes familiales de la MA et conduisent à une augmentation de la production du peptide $A\beta_{1-42}$ et à une modification du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (**Figure 29**) (Somavarapu and Kepp, 2016).

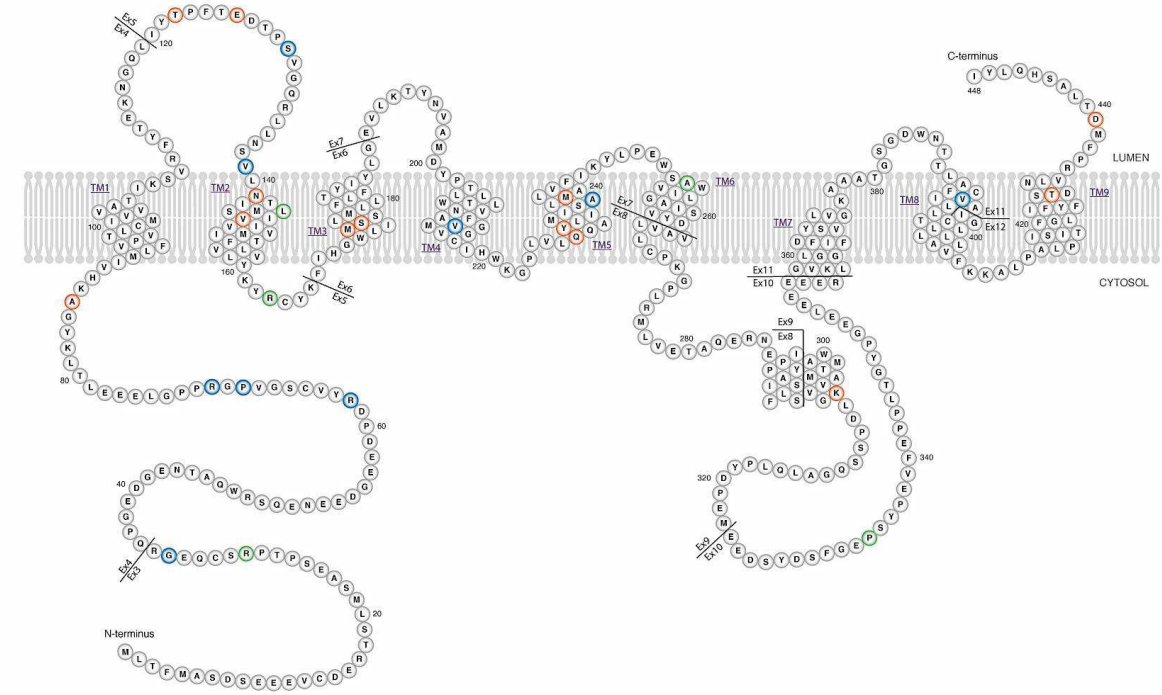


Figure 29. Mutations retrouvées au niveau de la PSEN2 (448 AA). Les mutations représentées en rouge augmentent la pathologie, celles en vert sont non pathogéniques, celles en jaune sont protectrices et celles en bleu, ont des effets non identifiés (extrait de www.alzforum.org/mutations).

I.3. Les lésions tissulaires

Il existe deux types de lésions tissulaires dans la maladie d'Alzheimer : les plaques séniles, majoritairement composées de peptides Aβ, et les enchevêtrements neurofibrillaires, majoritairement composés de protéines Tau.

I.3.1. Les plaques séniles

Les peptides β-amyloïdes (Aβ) proviennent du clivage protéolytique de l'APP par deux protéases, la β- et la γ-sécrétase. Ce clivage successif conduit à la production de différents isoformes d'Aβ composées de 36 à 43 AA. En conditions physiologiques, le peptide $A\beta_{1-40}$ est l'isoforme majoritaire (90%) alors que l'$A\beta_{1-42}$ est minoritaire et rapidement dégradé. Cependant, au cours du vieillissement ou dans le cas de mutations génétiques (*App*, *Psen1* ou *2*,…), la proportion des peptides $A\beta_{1-42}$ augmente dans le cerveau. Les propriétés physicochimiques des peptides $A\beta_{1-42}$ ont montré qu'ils sont plus prédisposés à l'agrégation que les peptides $A\beta_{1-40}$ (Klein et al., 1999; LaFerla et al., 2007). Les plaques séniles, marqueurs de la MA, sont composées de peptides Aβ (**Figure 30**) (Glenner and Wong, 1984; Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987). Les différents isoformes d'Aβ (38 à 43 AA) sont retrouvées dans ces plaques amyloïdes (Hamley, 2012) mais le peptide $A\beta_{1-42}$ est le composant majeur (Iwatsubo et al., 1994; Masters et al., 1985). Le métabolisme de l'APP et ses différents clivages sont plus amplement abordés dans la partie II.2.

Les plaques séniles ont une forme sphérique et se retrouvent au niveau de la matrice extracellulaire. Les peptides Aβ nouvellement synthétisés vont s'associer entre eux pour former des oligomères solubles neurotoxiques, puis former de plus grosses structures insolubles appelées fibrilles. Ces fibrilles sont les composantes majoritairement retrouvées dans les plaques séniles.

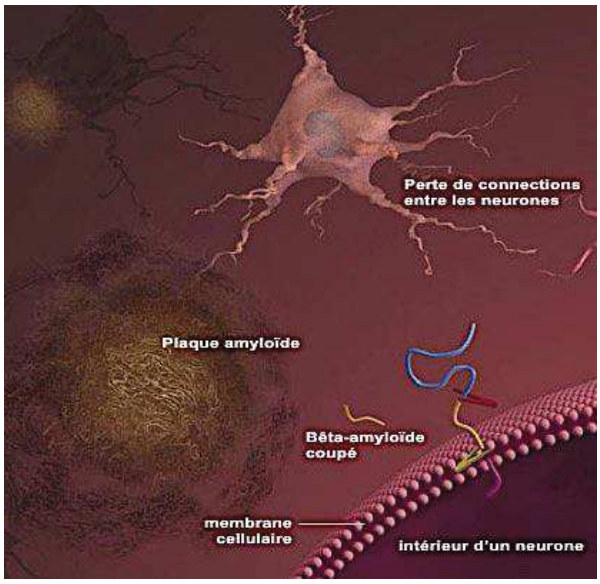


Figure 30. Les plaques séniles. L'APP est clivée par la β- et la γ-sécrétase conduisant à la production de peptides Aβ. Les peptides produits vont s'associer entre eux pour former des oligomères neurotoxiques, puis des fibrilles qui sont les éléments principaux des plaques séniles (extrait de lecerveau.mcgill.ca).

I.3.2. Les enchevêtrements neurofibrillaires

Les enchevêtrements neurofibrillaires se composent de fibrilles de la protéine Tau et sont localisés en intraneuronal. Dans un cerveau adulte, la protéine Tau est majoritairement exprimée dans les neurones (Binder et al., 1985), mais on peut aussi la retrouver au niveau des astrocytes (Papasozomenos and Binder, 1987) et des oligodendrocytes (Klein et al., 2002; LoPresti et al., 1995; Richter-Landsberg, 2008). Dans le SNC, il existe 6 isoformes différentes de la protéine Tau (Goedert et al., 1989) qui diffèrent entre elles par la présence de 3 ou 4 domaines de répétitions en C-terminal (appelés R3 ou R4) et par l'absence ou la présence de 1 ou 2 insertions de 29 AA en N-terminal (notées N0, N1 ou N2) (**Figure 31**) (Spillantini and Goedert, 1998).

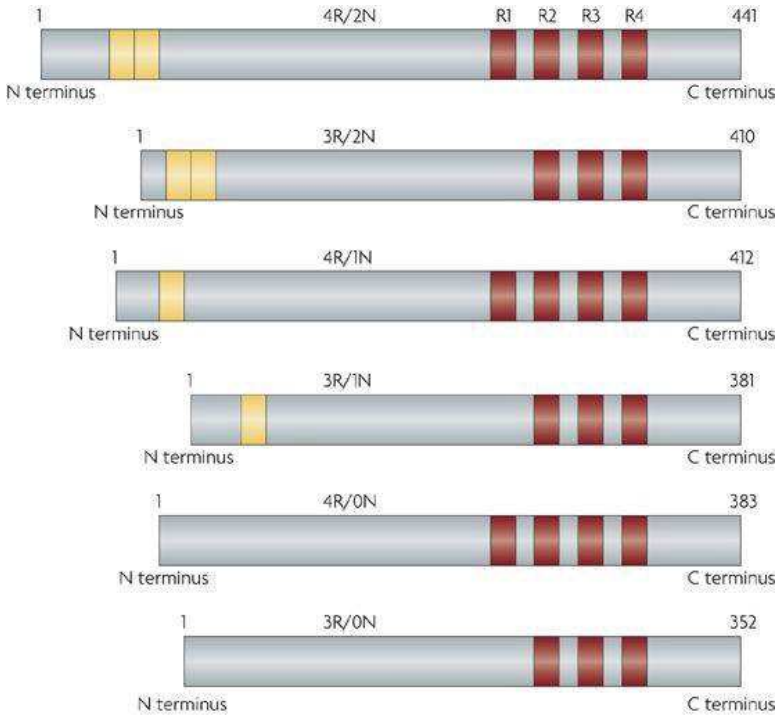


Figure 31. Représentation des différentes isoformes de la protéine Tau (extrait de Ballatore et al., 2007)**.**

Les différentes isoformes ont une structure primaire comprise entre 352 et 441 AA. Au niveau neuronal, on retrouve la protéine Tau principalement au niveau des axones (Binder et al., 1985). Elle a la capacité de se lier à la tubuline, de promouvoir sa polymérisation (Weingarten et al., 1975; Witman et al., 1976) et de réguler la stabilité des microtubules (Chen and Tsong, 1994; Drechsel et al., 1992). Des techniques de cryomicroscopie électronique (Al-Bassam et al., 2002) et de RMN couplée à de la spectrométrie de masse (Kadavath et al., 2015) ont montré que la protéine Tau induit l'élongation, la nucléation et le groupement des microtubules axonaux.

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau se retrouve sous une forme hyperphosphorylée diminuant son affinité envers les microtubules et désorganisant le transport axonal (Iqbal et al., 2016). Elle devient alors insoluble et va former des oligomères puis des fibrilles qui composeront les enchevêtrements neurofibrillaires (**Figure 32**) (Eidenmüller et al., 2001).

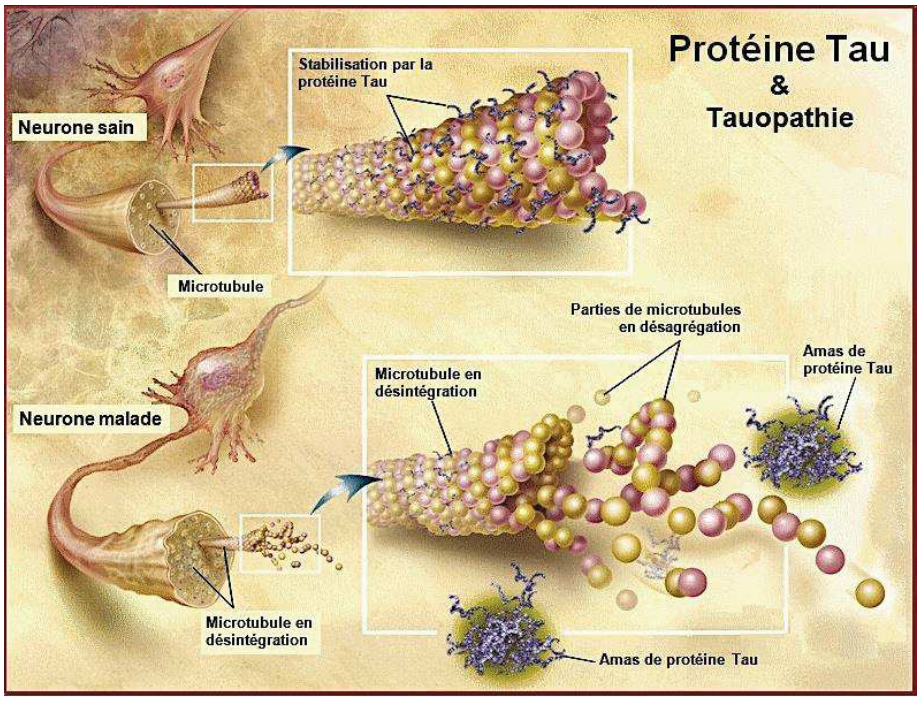


Figure 32. Les enchevêtrements neurofibrillaires. Au niveau d'un neurone sain, la protéine Tau stabilise les microtubules. Dans un neurone « malade » la protéine Tau hyperphosphorylée se détache des microtubules, entraînant leur désorganisation et perturbant le transport axonal. Elle va s'agréger pour former des fibrilles, puis des enchevêtrements neurofibrillaires. Ce phénomène conduira à une mort neuronale (extrait de www.nia.nih.gov).

I.3.3. Localisation des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires

La répartition spatiale des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires, n'est pas la même, notamment au début de la pathologie. La formation des dépôts amyloïdes précède l'apparition des enchevêtrements neurofibrillaires mais les deux types de lésions évoluent toujours selon le même schéma (Braak and Braak, 1991) (**Figure 33**).

Les plaques amyloïdes sont retrouvées dès le début de la pathologie principalement au niveau du néocortex et se caractérisent par une progression constante au cours du temps. Cependant, aux stades précoces de la maladie il existe une variabilité interindividuelle assez importante. Braak & Braak ont déterminé 3 stades, à partir de coupes de cerveaux humains, concernant la localisation spatiale et temporelle des plaques séniles (Braak and Braak, 1991) (**Figure 33**). Dans le premier stade, appelé stade A, elles sont localisées au niveau des lobes frontal et temporal et possèdent une faible densité. Au stade B, la densité des plaques

amyloïdes a augmenté (densité moyenne) et les agrégats se sont étendus à la majorité des aires corticales. En parallèle, les premiers agrégats apparaissent au niveau du système limbique (hippocampe). Au dernier stade, nommé C, les plaques sont denses et sont localisées sur l'ensemble des aires corticales. Le nombre de dépôts amyloïdes reste stable au niveau de l'hippocampe.

Les enchevêtrements neurofibrillaires présentent moins de variations interindividuelles comparés aux plaques amyloïdes. Leur localisation au cours du temps a été décrite en six stades regroupés deux à deux (**Figure 33**). Dans les stades I-II, les enchevêtrements neurofibrillaires sont principalement localisés au niveau du lobe temporal et de l'hippocampe. Puis les agrégats intraneuronaux se renforcent au niveau de l'hippocampe et se propagent au niveau des régions entorhinales et du néocortex (stades III-IV). Aux stades V-VI, les lésions se propagent à l'ensemble du néocortex et s'accentuent fortement au niveau des régions touchées aux stades III-IV.

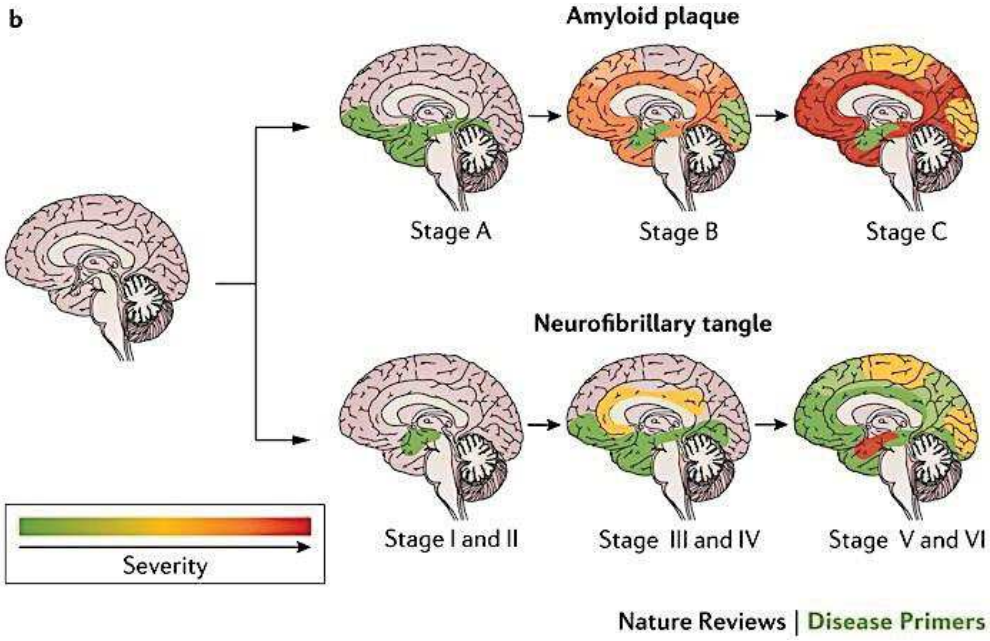


Figure 33. Propagation des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires au cours de la MA (extrait de Masters et al., 2015).

I.4. Hypothèses majeures sur l'origine de la maladie d'Alzheimer

I.4.1. L'hypothèse de la cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde prend naissance dans les années 80 après la démonstration que les peptides Aβ étaient les composants majeurs des plaques amyloïdes (Glenner and Wong, 1984). De nombreux arguments sont venus étayer cette hypothèse :

- L'altération précoce des clivages protéolytiques de l'APP dans la MA, ainsi que l'apparition de processus inflammatoires (astrogliose et activation de la microglie) (Podlisny et al., 1991)
- L'apparition précoce de la MA chez des patients présentant des mutations sur le gène codant pour l'APP (formes familiales) (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991) suggèrent que les dépôts amyloïdes pourraient être l'élément déclencheur de la pathologie.
- L'association des formes familiales les plus fréquentes à des mutations de la PSEN1 (Sherrington et al., 1995) et PSEN2 (Levy-Lahad et al., 1995), participant au complexe de la γ-sécrétase, et à la surproduction du peptide $A\beta_{1-42}$ (Sudoh et al., 1998).
- Les oligomères formés de peptides Aβ sont toxiques et peuvent entraîner une mort cellulaire (Gschwind and Huber, 1995).

L'ensemble de ces éléments a permis d'élaborer l'hypothèse de la cascade amyloïde dans les années 90 (Hardy and Higgins, 1992). Cette hypothèse propose que le peptide Aβ soit l'élément central de la maladie d'Alzheimer. Sa dérégulation, soit à cause de mutations génétiques dans le cadre des formes familiales, soit par l'altération des systèmes de clairance du peptide dans le cadre des formes sporadiques, serait à l'origine de la pathologie. Ces phénomènes aboutissent à une augmentation de la production et à une accumulation des

peptides $A\beta_{1-42}$ au niveau cérébral (**Figure 34**). Cette accumulation va provoquer l'oligomérisation du peptide qui formera des fibrilles insolubles puis des plaques amyloïdes. Les plaques ainsi formées activeraient des processus inflammatoires (astrogliose et activation de la microglie) perturbant l'homéostasie cérébrale. Cette neuro-inflammation ainsi que les formes solubles d'Aβ entraineraient des dysfonctionnements synaptiques conduisant à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires par une perturbation de l'activité des kinases et des phosphatases. Cette perturbation provoquerait aussi l'hyper-phosphorylation de la protéine Tau. L'ensemble des phénomènes décrits conduirait à un dysfonctionnement neuronal puis à une perte neuronale pour finalement aboutir à des déficits mnésiques (**Figure 34**).

Actuellement, l'hypothèse de la cascade amyloïde est l'hypothèse dominante pour décrire l'origine de la maladie d'Alzheimer et a été majoritairement utilisée pour le développement de différentes stratégies thérapeutiques.

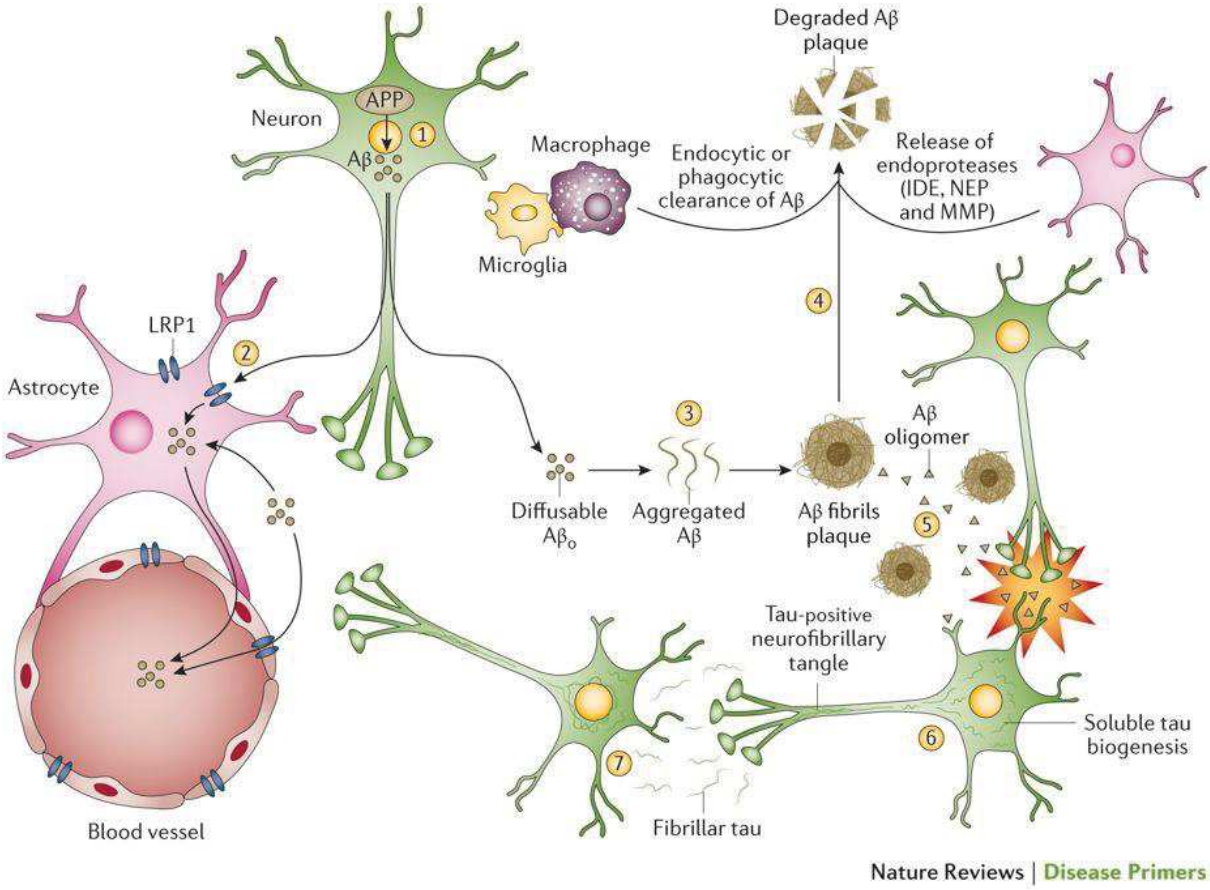


Figure 34. Hypothèse de la cascade amyloïde. L'Aβ est produit par le clivage de l'APP (**1**) et libéré dans le milieu extracellulaire sous forme oligomérique. Les oligomères peuvent soit être recaptés par les récepteurs LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) (**2**) pour être éliminés dans la circulation sanguine ; soit s'agréger dans le milieu extracellulaire pour former des plaques amyloïdes (**3**). Les plaques amyloïdes peuvent être éliminées par des processus de phagocytose (microglie ou macrophage) ou par des enzymes de clairance d'origine astrocytaire telles que l'IDE (insulin degrading enzyme), la NEP (néprilysine) ou des métalloprotéases (**4**). Des oligomères, provenant de la fragmentation des plaques amyloïdes, peuvent ne pas être éliminés et devenir toxiques pour les synapses (**5**), conduisant à l'hyper-phosphorylation de la protéine Tau et à son agrégation. La formation d'enchevêtrements neurofibrillaires va se propager à l'ensemble du neurone (**6**) conduisant à sa mort. Les fibrilles de Tau sont alors libérées dans le milieu extracellulaire et peuvent se propager vers un neurone sain (**7**) entraînant par la suite sa mort. La neurodégénérescence produite conduit au déclin cognitif progressif observé dans la pathologie (extrait Masters et al., 2015).

I.4.2. L'hypothèse Tau

L'hypothèse Tau est une alternative à l'hypothèse de la cascade amyloïde. Elle se base sur l'absence de corrélation entre l'apparition des plaques amyloïdes et le déclin cognitif observé chez les patients, ce qui n'est pas le cas des enchevêtrements neurofibrillaires (Braak and Braak, 1995; Schwarz et al., 2016). De plus, la perte neuronale serait concomitante à l'apparition des agrégats de la protéine Tau, renforçant cette deuxième hypothèse (Bejanin et al., 2017; Okamura and Yanai, 2017). Dans certaines études les auteurs ont proposé que les

lésions liées à la protéine Tau se produiraient avant l'accumulation des peptides Aβ dans le milieu extracellulaire (Braak and Del Tredici, 2014; Johnson et al., 2016). De plus, les stratégies thérapeutiques basées sur l'hypothèse de la cascade amyloïde n'ont pas donné les résultats escomptés chez les patients atteints de la maladie et selon Cummings et ses collaborateurs, les essais cliniques réalisés entre 2002 et 2012 auraient un taux d'échec de 99,6% (Cummings et al., 2014). L'échec des stratégies thérapeutiques se basant sur la régulation de la cascade amyloïde peut en partie s'expliquer par l'hétérogénéité des cohortes de patients atteints de la maladie.

Selon cette deuxième hypothèse, les perturbations observées dans la MA, incluant la perturbation de la cascade amyloïde, provoqueraient l'hyper-phosphorylation de la protéine Tau entraînant son agrégation et la production d'enchevêtrements neurofibrillaires (**Figure 35**). Les enchevêtrements neurofibrillaires perturberaient le transport axonal conduisant à une perte neuronale qui aurait pour conséquence la libération des protéines Tau oligomériques et fibrillaires dans le milieu extracellulaire, permettant sa propagation vers d'autres cellules. Cette propagation conduirait à une perte neuronale progressive pouvant expliquer les déclins cognitifs observés dans la pathologie.

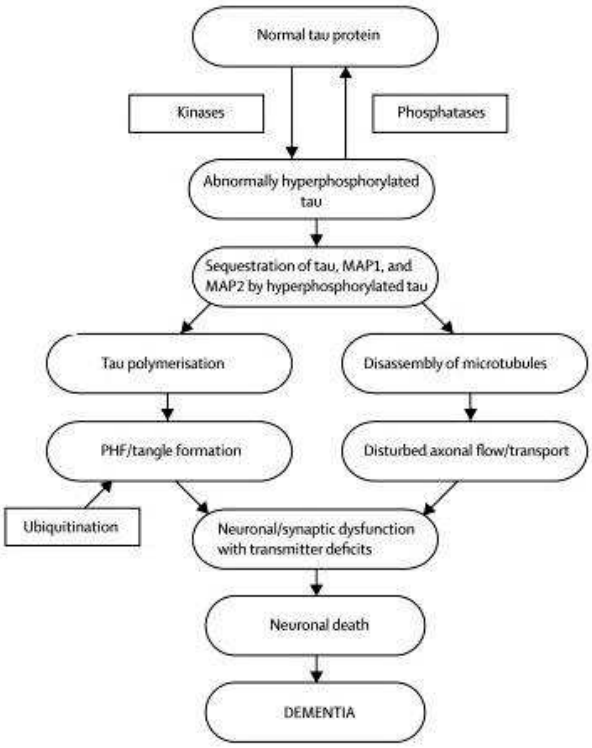


Figure 35. Hypothèse Tau. L'hyper-phosphorylation de la protéine Tau provoque son détachement des microtubules conduisant à une déstabilisation du transport axonal et conduisant à son agrégation. Ces deux phénomènes conduisent à des dysfonctionnements synaptiques et neuronaux induisant une mort neuronale à l'origine des troubles mnésiques associées à la MA (extrait de Blennow et al., 2006).

II. La protéine précurseur de l'amyloïde (APP)

II.1. Le gène de l'APP

Le gène de l'APP est constitué de 18 exons, conduisant après épissage alternatif à 10 isoformes de la protéine de 695 à 770 AA (Lamb et al., 1993; Yoshikai et al., 1990). Les 3 isoformes majoritaires produites sont l'APP_{695}, l'APP_{751} et l'APP_{770} et sont exprimées dans la plupart des organes (**Figure 36**). L'APP_{695} est l'isoforme majoritaire exprimée au niveau neuronal (Matsui et al., 2007) alors que les isoformes APP_{751} et APP_{770} seraient plutôt exprimées au niveau astrocytaire (Gray and Patel, 1993). Ces 3 protéines ont comme caractéristique commune de contenir dans leur structure primaire, la séquence du peptide Aβ□(Sandbrink et al., 1994). Cependant, les isoformes APP_{751} et APP_{770} diffèrent de l'APP_{695} par la présence d'une séquence de 56 AA appelée KPI (kunitz-type protease

inhibitor) située au niveau de leur domaine extracellulaire, permettant l'inhibition de protéases et donc empêchant leur dégradation.

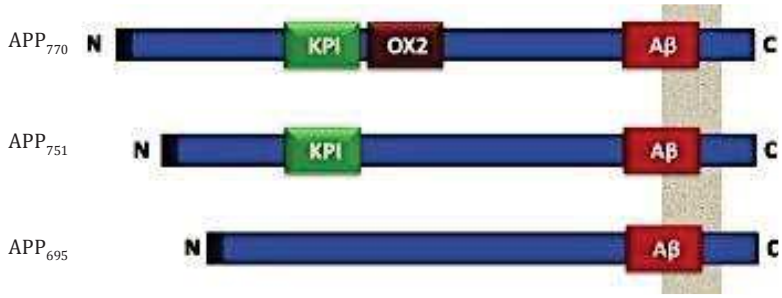


Figure 36. Les 3 isoformes majoritaires de l'APP chez l'Homme (extrait de Nalivaeva and Turner, 2013).

II.2. Structure et domaines fonctionnels de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type I c'est à dire qu'elle ne contient qu'un seul segment transmembranaire. Elle possède un long domaine extracellulaire et un court domaine intracellulaire. L'APP peut être subdivisée en différentes régions fonctionnelles (du N-terminal vers le C-terminal) (**Figure 37**) :

- Un peptide signal permettant son adressage à la membrane du réticulum endoplasmique (Zhou et al., 2011).
- Un domaine E1 composé d'un site de liaison à l'héparine nommé HBD1 (heparin binding domain 1), formé par une hélice α et un feuillet β antiparallèle avec une boucle composée d'AA basiques (95-110) qui peuvent lier l'héparine (Rossjohn et al., 1999; Small et al., 1994). Une séquence hydrophobe, juxtaposée au HBD1, permettrait la dimérisation de l'APP ou une interaction avec d'autres protéines en présence d'héparine (Dahms et al., 2010; Gralle et al., 2006). Le domaine E1 est aussi composé d'un site de liaison aux ions métalliques (cuivre, zinc) (Bush et al., 1993; Hesse et al., 1994), ayant pour structure une hélice α et un petit feuillet β.

- Un domaine KPI (Kunitz-type protease inhibitor) retrouvé au niveau des isoformes 770 et 751 de l'APP et un domaine OX-2 retrouvé uniquement dans l'isoforme APP 770 (Clark et al., 1985; Ponte et al., 1988).
- Un domaine E2 riche en hélices α contenant un deuxième site de liaison à l'héparine (HBD2) (Multhaup et al., 1994) ainsi qu'une région permettant la fixation d'ions ferreux qui maintiendrait la rigidité de cette zone (Dahms et al., 2012). Tout comme pour le HBD1, la liaison de l'héparine permettrait la dimérisation de l'APP.
- Un domaine random coil dépourvu de structures secondaires (Daigle and Li, 1993).
- A l'interface entre la partie extracellulaire et la partie transmembranaire, on retrouve le domaine Aβ
- Dans la partie transmembranaire, il existe une séquence GxxxG répétée qui permettrait l'homodimérisation de l'APP (Munter et al., 2007) ainsi que la liaison de molécules de cholestérol (Barrett et al., 2012).
- Le domaine intracellulaire C-terminal contenant une séquence YENPTY entre les résidus 757 et 762 (APP 770) qui serait impliquée dans les processus d'endocytose via la clathrine. Cette séquence serait aussi présente au niveau de récepteurs de type tyrosine kinase, de récepteurs aux LDL et des intégrines (Bonifacino and Traub, 2003; Lemmon and Schlessinger, 2010) suggérant que l'APP pourrait agir comme un récepteur.

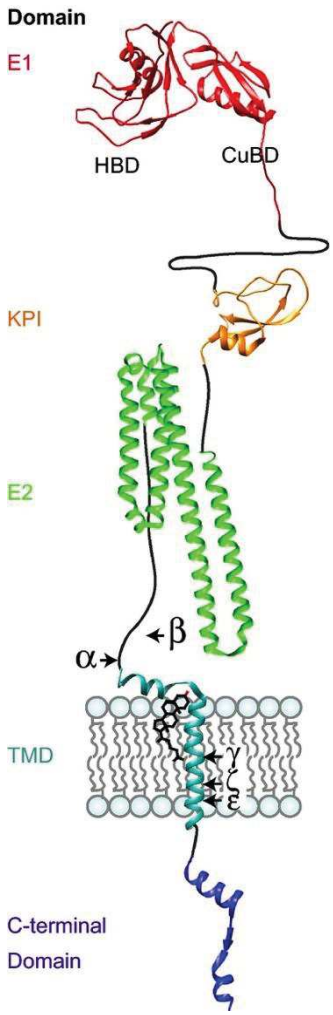


Figure 37. Structure 3D de l'APP et représentation des différents domaines fonctionnels. HBD : Heparin binding domain, CuBD : copper / metal binding domain, KPI : Kunitz-type protease inhibitor, TMD : transmembrane domain (extrait de Dawkins and Small, 2014).

II.3. Trafic intracellulaire de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire particulièrement exprimée au niveau du système nerveux (Selkoe, 1994). Elle est retrouvée dans plusieurs compartiments cellulaires tels que le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, la mitochondrie, les endosomes, les lysosomes et la membrane plasmique (Caporaso et al., 1994; Kinoshita et al., 2003; Kirazov et al., 2001; Mizuguchi et al., 1992; Schubert et al., 1991; Xu et al., 1995). Grâce à la présence d'un peptide signal, l'APP est adressée à la membrane du RE, séquence qui sera clivée lors de son ancrage à la membrane. Lors de son

adressage à la membrane plasmique, l'APP nouvellement synthétisée pourra subir plusieurs modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations, phosphorylations ou palmitoylation (Bhattacharyya et al., 2013; Selkoe, 2001). L'APP n'est présente à la membrane plasmique que durant quelques minutes (Koo and Squazzo, 1994). Après son ancrage à la membrane plasmique (Koo et al., 1996), elle est internalisée (**Figure 38**) et peut alors être recyclée ou dégradée dans les lysosomes (Haass et al., 1992; Thinakaran and Koo, 2008).

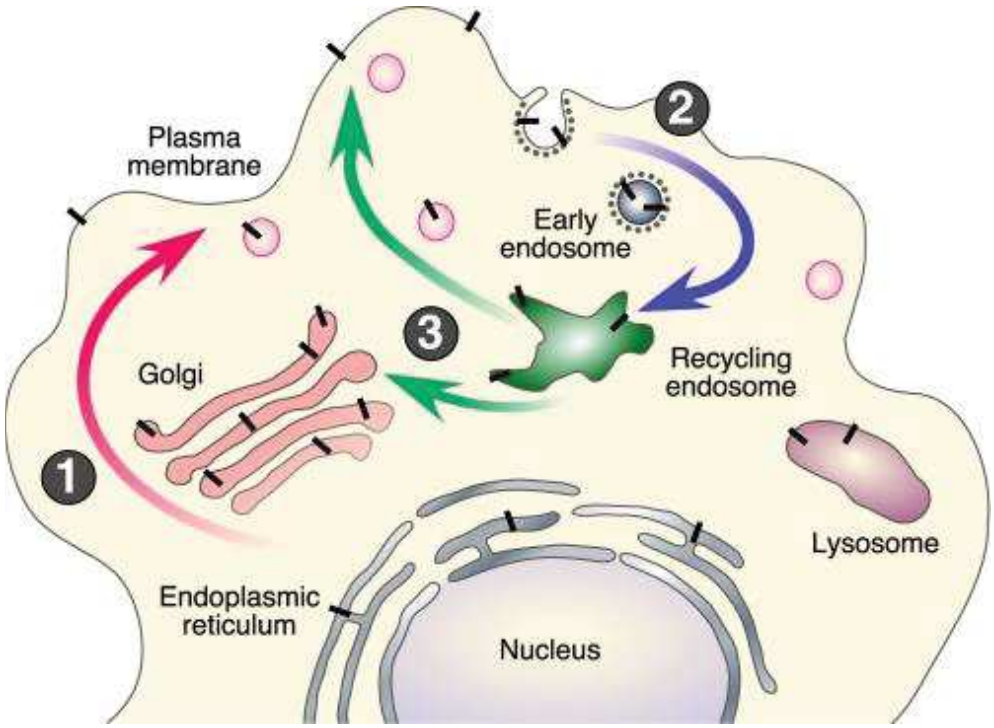


Figure 38. Trafic intracellulaire de l'APP. Après sa synthèse, l'APP est adressée à la membrane plasmique par des vésicules sécrétées par le réseau transgolgien (**1**). Quelques minutes après son ancrage à la membrane plasmique, l'APP est internalisée (**2**) et dirigée vers les endosomes précoces et peut être recyclée et reconduite à la membrane, ou être dégradée dans les lysosomes (**3**) (extrait de Thinakaran and Koo, 2008).

II.4. Métabolisme de l'APP

Comme présenté précédemment, la maladie d'Alzheimer se caractérise par la présence de plaques séniles constituées de peptides Aβ, dont le peptide $A\beta_{1-42}$ est le composant majeur (Iwatsubo et al., 1994; Masters et al., 1985). Ces peptides amyloïdes proviennent du clivage protéolytique de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) conduisant aussi à la production

d'autres fragments ayant des fonctions biologiques variées (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987).

➔ ***Clivage par l'α-sécrétase***

L'α-sécrétase clive l'APP au niveau de la séquence du domaine Aβ, entre la Lysine 16 et la Leucine 17, □□□ê□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□ (Esch et al., 1990). Ce clivage permet la libération d'un fragment soluble nommé sAPPα, en extracellulaire, et d'un fragment C-terminal, ancré à la membrane, nommé αCTF ou CTF83 (**Figure 39**). Le clivage α de l'APP ne se produit que si le peptide est structuré en hélice α au niveau du site de clivage et si la protéase est ancrée au niveau de la membrane plasmique (Sisodia et al 1992).

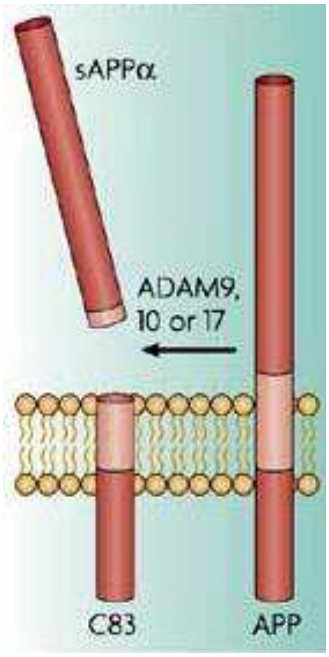


Figure 39. Clivage de l'APP par l'α-sécrétase. Le clivage de l'APP par les métalloprotéases ADAM9, 10 et 17 conduit à la production d'un fragment soluble N-terminal (sAPPα) extracellulaire et d'un fragment C-terminal (C83) ancré à la membrane (extrait de humpath.com).

Plusieurs enzymes appartenant à la famille des métalloprotéases (ADAM : A Desintegrin And Metalloprotease) sont impliquées dans le clivage α dont ADAM9, ADAM10

et ADAM17 (aussi appelée TACE) (Asai et al., 2003; Chow et al., 2010). Des études ont montré que la métalloprotéase ADAM10 est la sécrétase majoritaire exerçant le clivage α (Koike et al., 1999; Kuhn et al., 2010; Lammich et al., 1999; Slack et al., 2001).

Rapidement, ADAM9, 10 et 17 ont été proposées comme les α-sécrétases potentielles car leur surexpression augmentait le clivage de l'APP. Cependant, la surexpression des différentes protéases, peut conduire à une augmentation artificielle du clivage de l'APP. Pour déterminer la pertinence physiologique de ces résultats, la spécificité de leur activité enzymatique a été montrée par des techniques de « knock down » ou de « knock out ». Plusieurs études, utilisant des inhibiteurs, des RNAi (ARN interférence) ou des oligonucléotides antisens ciblés contre ADAM9, 10 ou 17, ont montré une diminution du clivage de l'APP dans des cultures cellulaires (Allinson et al., 2004; Asai et al., 2003; Blacker et al., 2002; Taylor et al., 2009). Mais le clivage α de l'APP n'est jamais complètement aboli, suggérant que l'absence de l'une d'entre elles est compensée par les autres. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*, chez des souris KO pour les gènes codant pour les 3 métalloprotéases (Buxbaum et al., 1998; Weskamp et al., 2002).

Les α-sécrétases possèdent d'autres substrats tels que les récepteurs NOTCH, le TNFα (Tumor Necrosis Factor α), l'EGF (Epidermal Growth Factor), les récepteurs à l'interleukine 6, ou encore la protéine prion.

➔ ***<u>Clivage par la β-sécrétase</u>***

La β-sécrétase clive l'APP à la jonction entre le domaine random coil (RC) et le domaine Aβ conduisant à□□□□□□□□□□□□□□□□de□□□□□□□□s Aβ. Le clivage β de l'APP permet la production d'un fragment soluble nommé sAPPβ et d'un fragment C-terminal, ancré à la membrane, appelé βCTF ou CTF99 (**Figure 40**). En 1999, plusieurs équipes ont démontré, par différentes techniques (génomique, purification, clonage) que le

clivage β de l'APP était dû à l'enzyme BACE1 (Beta-site APP Cleaving Enzyme 1) (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

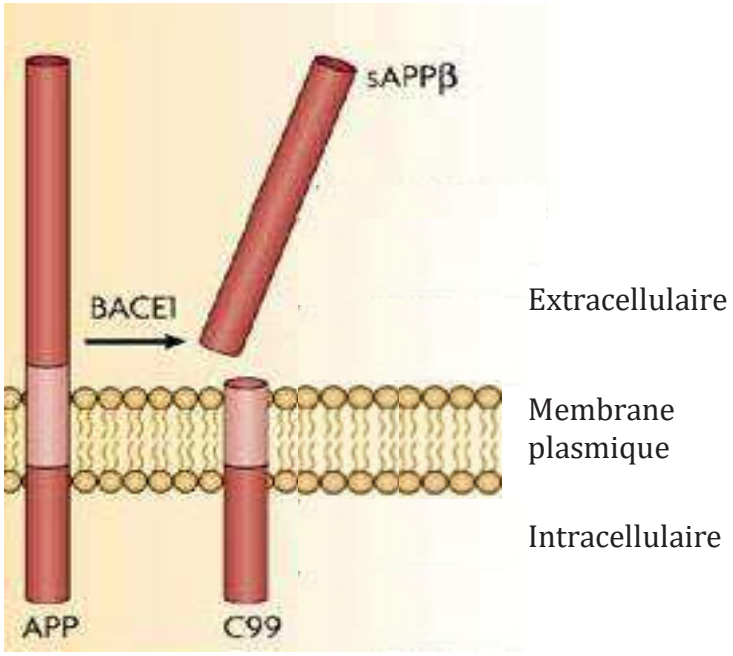


Figure 40. Clivage de l'APP par la β-sécrétase. Le clivage de l'APP par BACE1 conduit à la production d'un fragment soluble N-terminal (sAPPβ) et d'un fragment ancré à la membrane C-terminal (C99) (extrait de humpath.com).

La β-sécrétase BACE1 est une protéine transmembranaire de type I, dont l'isoforme majoritaire contient 501 AA. Elle possède une activité aspartyl-protéase et est majoritairement exprimée dans les neurones (Vassar et al., 1999). BACE1 est synthétisée sous forme d'un précurseur appelé pro-BACE1 et nécessite un clivage par des protéases pour acquérir sa forme mature (Sambamurti et al., 2002). Au cours de sa maturation dans le réticulum endoplasmique, BACE1 subit plusieurs modifications post-traductionnelles dont les plus importantes sont la glycosylation de 4 asparagines (N153, N172, N223 et N354) (Haniu et al., 2000). Des études de mutagenèse dirigée contre ces asparagines ont montré que la réduction des glycosylations diminuait drastiquement l'activité protéolytique de BACE1 (Benjannet et al., 2004). L'activité enzymatique optimale de BACE1 est à pH acide (pH 4,5) et la protéase

est principalement retrouvée au niveau de l'appareil de Golgi, des endosomes et des lysosomes (Ben Halima and Rajendran, 2011; Koo and Squazzo, 1994).

Des études réalisées sur des souris KO pour *Bace1* (*Bace1*$^{-/-}$) ont montré que l'absence du gène ne conduit pas à des lésions neuronales et que son activité n'est pas compensée par d'autres enzymes (Luo et al., 2003b). Le croisement de souris *Bace1*$^{-/-}$ avec des souris transgéniques contenant des mutations familiales de la maladie d'Alzheimer au niveau de l'APP et de PS1 (modèle 5xFAD) a mis en évidence que lorsque BACE1 n'est pas exprimée, la production des peptides Aβ est abolie. Chez ces animaux, la perte neuronale ainsi que les déficits mnésiques sont moins importants (Ohno et al., 2007).

➔ ***Clivage par la γ-sécrétase***

Les fragments CTF83 et CTF99, issus des clivages de l'α- et de la β-sécrétase respectivement, peuvent subir un deuxième clivage par la γ-sécrétase. Les fragments CTF83, après clivage par la γ-sécrétase vont conduire à la libération d'un peptide P3 en extracellulaire et d'un peptide AICD en intracellulaire, alors que le clivage des fragments CTF99 conduisent à la production de peptides Aβ et de l'AICD (**Figure 41**) (Barnwell et al., 2014; Carroll and Li, 2016).

Le clivage du fragment CTF99 conduit à la production de longs fragments de peptides Aβ (Aβ48 ou Aβ49). Les peptides générés vont rester au niveau du site actif de la γ-sécrétase et de nouveaux clivages sont alors réalisés tous les 3 AA (Barnwell et al., 2014; Qi-Takahara et al., 2005; Takami et al., 2009). Ainsi, plus les peptides Aβ restent dans le site actif de la γ-sécrétase, plus les fragments Aβ générés sont courts.

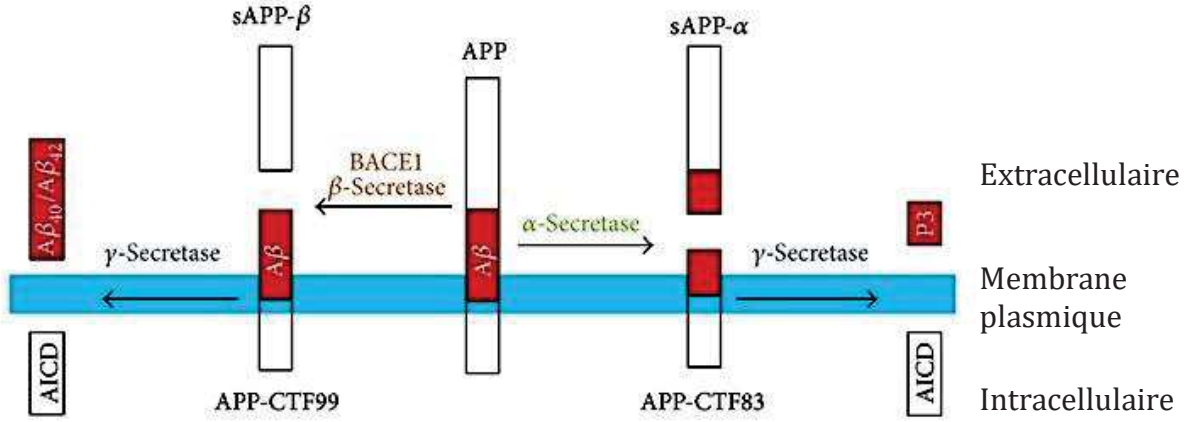


Figure 41. Clivage de l'APP par la γ-sécrétase. Le clivage du fragment CTF83 par la γ-sécrétase conduit à la production du peptide P3 en extracellulaire et à l'AICD en intracellulaire. Le clivage du fragment CTF99 conduit à la production du peptide Aβ et aussi à l'AICD (extrait de Pająk et al., 2016).

La γ-sécrétase est un complexe formé de 4 sous-unités différentes : les présénilines (PSEN1 ou PSEN2), la nicastrine, l'APH1 (anterior pharynx-defective 1) et PEN2 (presenilin enhancer 2).

Les **présénilines 1 et 2** sont les sous-unités catalytiques du complexe et possèdent une activité aspartyl-protéase (Wolfe et al., 1999). Leur participation dans ce complexe a été mise en évidence sur des lignées neuronales où la diminution de l'expression de PSEN1 corrèle avec une diminution de la production des peptides Aβ (Saftig and de Strooper, 1998). Les PSEN1 et 2 sont constituées de 9 domaines transmembranaires avec une extrémité C-terminale extracellulaire et une extrémité N-terminale intracellulaire (Laudon et al., 2005). Les PSEN subissent un clivage endo-protéolytique qui va conduire à la production d'un fragment N-terminal long et C-terminal court (Thinakaran et al., 1996). Au niveau du complexe de la γ-sécrétase, les présénilines clivées, se réassocient sous forme d'un hétérodimère constitué des fragments N- et C-terminaux (Podlisny et al., 1997; Thinakaran et al., 1996) (**Figure 42A**).

La **nicastrine** est une protéine transmembranaire de type I (Yu et al., 2000). Elle ne possède pas d'activité catalytique au sein du complexe mais est plutôt le « chef d'orchestre »

permettant l'assemblage des différentes sous-unités (Shirotani et al., 2003; Yu et al., 2000) (**Figure 42A**).

L'**APH1** (anterior pharynx-defective 1) existe sous deux isoformes APH1a et 1b et possède 7 domaines transmembranaires (Goutte et al., 2002). L'APH1 joue un rôle dans l'assemblage et la maturation de la γ-sécrétase (Lee et al., 2004; Luo et al., 2003a) et est impliquée dans la reconnaissance des substrats (**Figure 42A**).

PEN2 (presenilin enhancer 2) est une protéine à 2 domaines transmembranaires avec les extrémités N- et C-terminales en extracellulaire. Son extrémité C-terminale interagit avec les présénilines, étape critique pour l'activité γ-sécrétase (Hasegawa et al., 2004). De plus, PEN2 participe avec l'APH1 à la reconnaissance des substrats du complexe (**Figure 42A**).

La formation du complexe se fait initialement au niveau du réticulum endoplasmique avec la formation d'un dimère composé de la nicastrine et de l'APH1 (Shirotani et al., 2004). La préséniline 1 ou 2 non clivée vient alors s'associer à ces deux protéines (LaVoie et al., 2003). L'arrivée de PEN2 finalise la formation du complexe de la γ-sécrétase et provoque l'endo-protéolyse de la préséniline (fragments NT et CT), rendant le complexe actif (Ahn et al., 2010) (**Figure 42B**).

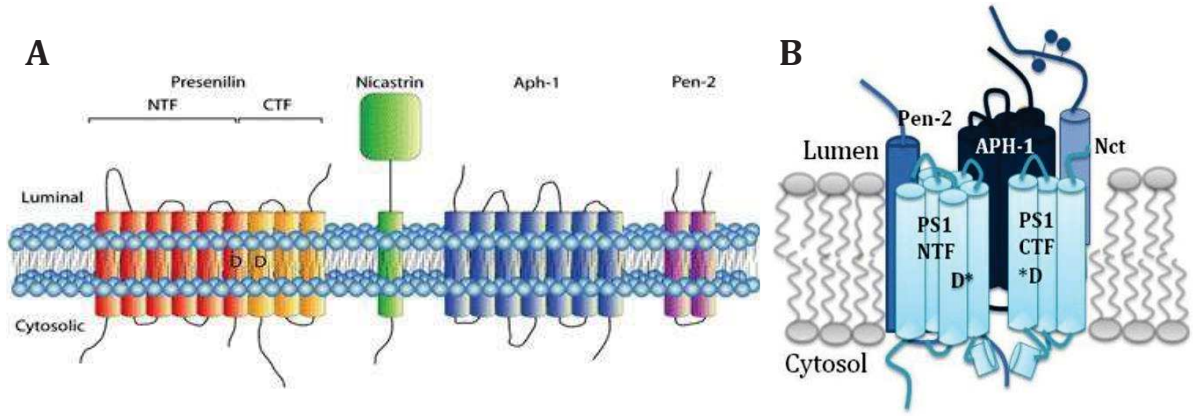


Figure 42. Représentations du complexe de la γ-sécrétase. Représentation en 2D (**A**, extrait de Boulton et al., 2008) ou en 3D (**B**, extrait de Carroll and Li, 2016) des différents composants du complexe de la γ-sécrétase. Nct : nicastrine, PS1 CTF : fragment C-terminal de la préséniline 1, PS1 NTF : fragment N-terminal de la préséniline 1, APH-1 : anterior pharynx-defective 1 et Pen-2 (presenilin enhancer 2).

II.5. Les voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique

Les différents clivages présentés ci-dessus correspondent aux deux voies protéolytiques de l'APP : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (**Figure 43**). Ainsi, la voie non-amyloïdogénique se caractérise par le clivage de l'APP par l'α- et par la γ-sécrétase conduisant à la production des fragments sAPPα, P3 et AICD. Cette voie est appelée non-amyloïdogénique car elle empêche la formation de peptides Aβ et donc de plaques séniles. Au contraire, la voie amyloïdogénique génère les peptides Aβ après clivage par la β- et la γ-sécrétase et conduit aussi à la formation des fragments sAPPβ et AICD. Les peptides Aβ formés vont pouvoir s'associer entre eux et former des oligomères neurotoxiques puis des fibrilles, qui sont les constituants majoritaires des plaques séniles retrouvées dans la maladie d'Alzheimer (MA).

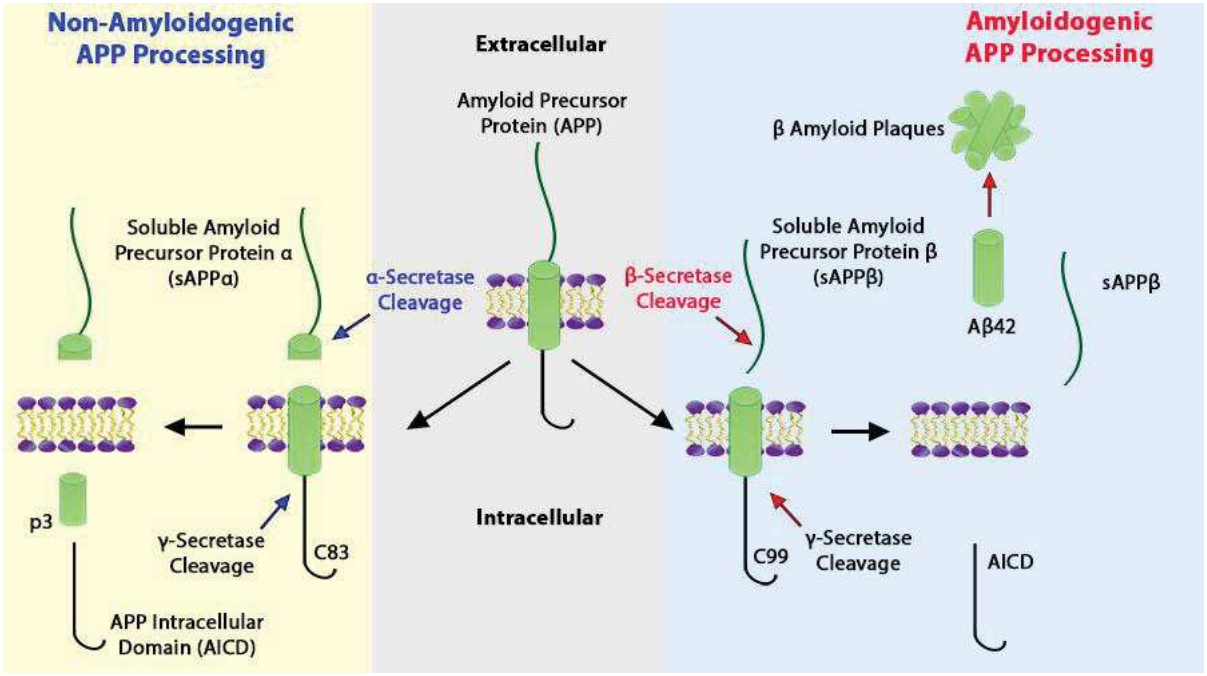


Figure 43. Voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique de l'APP (extrait de www.biolegend.com/amyloid_precursor_protein).

II.6. Rôles de l'APP et de ses produits de clivage

L'APP et ses produits de clivage font l'objet de nombreuses recherches afin d'identifier leurs rôles physiologiques et/ou leur contribution dans la physiopathologie de la MA. Le nombre important de produits formés et leurs multiples fonctions dans le SNC participent à la complexité des mécanismes associés au métabolisme de l'APP.

II.6.1. Rôles des fragments solubles sAPP

➔ ***sAPPα***

De nombreux rôles ont été associés aux fragments sAPPα tels que la synthèse neuritique (Hasebe et al., 2013; Small et al., 1994), la pousse axonale (Chasseigneaux et al., 2011) et la prolifération des cellules souches neurales (Caillé et al., 2004). De manière générale, les rôles attribués au fragment sAPPα sont impliqués dans des phénomènes de neuroprotection, de prolifération ou encore d'actions neurotrophiques (**Tableau 4**).

➔ ***sAPPβ***

La sAPPβ possède 16 AA en moins que le sAPPα, il est donc probable que ces deux fragments aient des rôles en commun. Tout comme le fragment sAPPα, le sAPPβ joue aussi un rôle dans la synthèse neuritique et dans la pousse axonale (Caillé et al., 2004; Demars et al., 2011; Hayashi et al., 1994). Cependant, il est aussi impliqué dans la différentiation des cellules souches embryonnaires neurales d'origine humaine (NSC) (Freude et al., 2011) et son action serait plus efficace que le sAPPα. Différentes études ont montré que le sAPPβ a aussi un effet neuroprotecteur vis-à-vis de la mort cellulaire caspase-dépendante, les phénomènes d'excitotoxicité ou la toxicité liée aux peptides Aβ, mais serait 50 à 100 fois moins efficace que le sAPPα (Copanaki et al., 2010; Furukawa et al., 1996). Ces données suggèrent que

l'effet neuroprotecteur du sAPPα est porté par les 16 AA présents en C-terminal de ce peptide, et qui sont absents du sAPPβ (Taylor et al., 2008).

Dans le **Tableau 4** sont répertoriés certains rôles des fragments sAPPα et sAPPβ.

Tableau 4. Rôles des fragments solubles sAPPα et sAPPβ.

Fragments	Rôle	Implication	Modèle	Bibliographie
sAPPα	Neuritogenèse	Stimule la neuritogenèse par le récepteur p75 et/ou le domaine E1	Cultures primaires neurones corticaux murins	Hasebe et al., 2013
			Cultures primaires de neurones sympathiques de poulet et hippocampiques de souris	Small et al., 1994
	Prolifération	Stimule la prolifération des cellules souches neurales (NSC)	NSC de cerveaux d'embryons	Hayashi et al., 1994
			Neuroblastes de la zone sous-ventriculaire	Caillé et al., 2004
	Régulation du sAPPβ	Interaction avec BACE1 pour diminuer le clivage β de l'APP	Lignée cellulaire CHO exprimant APP WT ou muté	Obregon et al., 2012
	Plasticité synaptique et LTP	Régulation des récepteurs NMDA et consolidation de la mémoire	Injection *in vivo* : hippocampe de rats	Taylor et al., 2008
	Métabolisme des ions cuivre et zinc	Réduit le Cu^{2+} en Cu^{+} permettant la régulation de la dégradation des glycanes. Régulation de l'homéostasie du cuivre.	Peptides synthétiques	Multhaup et al., 1996
			Fibroblastes et neurones corticaux de souris	Cappai et al., 2005
		Liaison avec le Zn^{2+} augmente l'affinité pour les protéoglycanes	Peptides synthétiques	Multhaup et al., 1994
	Neuroprotection	Protection des neurones contre l'excitotoxicité du glutamate, le stress oxydant et la toxicité liée à l'Aβ	Cultures de neurones hippocampiques de rat ou de cortex humains	Goodman and Mattson, 1994 Mattson et al., 1993
	Pousse axonale	Provoque une pousse axonale via le facteur de transcription EGR1	Cultures primaires de neurones murins	Chasseigneaux et al., 2011
sAPPβ	Neuroprotection	Faible protection des neurones contre l'excitotoxicité du glutamate, le stress oxydant et la toxicité liée à l'Aβ	Cultures primaires de neurones murins	Chasseigneaux et al., 2011
	Différentiation	Stimule la différentiation des cellules souches embryonnaires humaines en neurones	Cellules souches embryonnaires humaines	Freude et al., 2011
	Mort neuronale	Active les voies d'apoptose caspases-dépendantes par le récepteur DR6	Cultures primaires de neurones murins	Nikolaev et al., 2009

II.6.2. Rôles des fragments C-terminaux CTF83 et 99

Comme pour la protéine prion PrP^C, qui peut s'associer à plusieurs protéines intracellulaires, plus de 200 partenaires ont été identifiés pour l'APP ainsi que pour les fragments CTF83 et 99 (Linden et al., 2008). La partie C-terminale et intracellulaire de l'APP interagit avec plusieurs protéines adaptatrices afin d'activer des voies de signalisation conduisant à des fonctions diverses comme la plasticité synaptique (Sabo et al., 2001), la différentiation cellulaire (Ables et al., 2011; Kimberly et al., 2001), l'activation du cycle cellulaire (Nizzari et al., 2012), ou encore des processus mnésiques (Turner et al., 2003). Le recrutement des différents partenaires est lié à l'état de phosphorylation de la tyrosine Y682 et/ou de la thréonine T668 localisées au niveau du domaine intracellulaire de l'APP et modulent l'interactome de la protéine (Tamayev et al., 2009) (**Figure 44**).

De plus, des études *in vitro* ont montré que les domaines intracellulaires de l'APP, du CTF83 et du CTF99 peuvent se comporter comme un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). Ces domaines s'associent à la protéine Go (Nishimoto et al., 1993; Okamoto et al., 1995) impliquée dans des cascades de signalisation modulant l'activité de l'adénylate cyclase (inhibition) (Carter and Medzihradsky, 1993), de la phospholipase C (stimulation) (Moriarty et al., 1990) ou des voies de signalisation de l'apoptose (Giambarella et al., 1997).

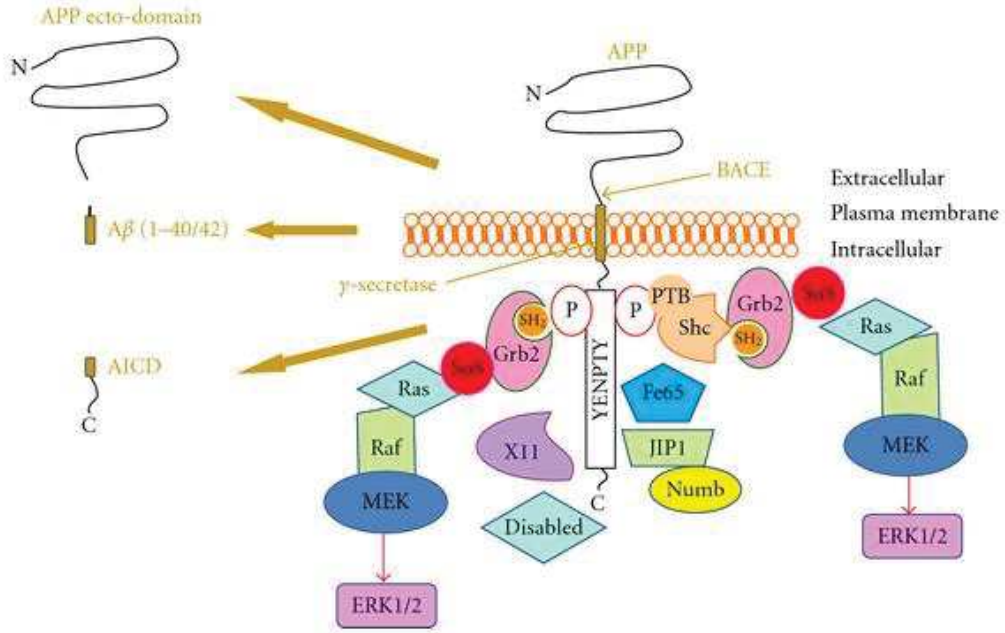


Figure 44. Schéma présentant différentes protéines adaptatrices se liant au domaine intracellulaire de l'APP, du CTF83 ou du CTF99. Au niveau de la partie C-terminale intracellulaire, de l'APP et des fragments CTF83 et 99, la phosphorylation de tyrosine 682 et /ou de la thréonine 668 conduit au recrutement de protéines adaptatrices. Ces protéines, contenant des domaines de liaison PTB ou Grb2 forment un échafaudage protéique permettant d'activer différentes voies de signalisations intracellulaires, dont la voie des MAP kinases - ERK1/2 permettant la stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire. D'autres partenaires protéiques, peuvent directement interagir avec la partie C-terminale, sans la présence de phosphorylations, telles que JIP1 permettant le transport axonal de l4APP et des fragments CTF83 et 99 (extrait de Nizzari et al., 2012).

Dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5**) sont répertoriés quelques rôles des fragments CTF.

Tableau 5. Rôles des fragments C-terminaux CTF83 et CTF99.

Rôle	Implication	Modèle	Bibliographie
Prolifération et survie cellulaire	Recrutement de protéines adaptatrices contenant des domaines de liaison PTB ou SH2 (Grb2, Shc) activant la voie des MAPK – ERK1/2	Nombreux modèles *in vivo* et *in cellulo*	Nizzari et al., 2012
Transport axonal	Interaction avec JIP1b qui selon son état de phosphorylation permet le transport rétrograde ou antérograde de l'APP et des fragments CTFs.	Lignée cellulaire PC12	Inomata et al., 2003
		Cultures primaires de neurones de ganglions rachidiens dorsaux	Fu and Holzbaur, 2013
Mémoire	Le fragment CTF99 provoque une altération de la mémoire	Souris transgéniques exprimant le CTF99	Berger-Sweeney et al., 1999 Nalbantoglu et al., 1997
Transmission et plasticité synaptique	L'APP et les fragments CTF sont retrouvés au niveau des synapses du cortex et de l'hippocampe de rats élevés dans un milieu enrichi	Rats WT	Huber et al., 1997 Teather et al., 2002
Survie cellulaire	Interaction avec la protéine Go et régulation de son activité.	Vésicules phospholipidiques	Okamoto et al., 1995
	Activation de la voie PI3K/Akt.	Fibroblastes et neurones murins (WT) et lignée SH-SY5Y	(Milosch et al., 2014)

II.6.3. Rôles du peptide P3

Le peptide P3 ou peptide $A\beta_{17-40/42}$ fait l'objet de peu d'études et son rôle reste encore mal identifié. Certains travaux ont mis en évidence que ce peptide peut activer des voies de signalisation pro-apoptotiques (Wei et al., 2002) et peut stimuler la production d'interleukines et de cytokines pro-inflammatoires (IL1β, IL1α, TNFα,…) (Szczepanik et al., 2001). Cependant, des travaux complémentaires sont nécessaires afin de pouvoir mieux identifier les rôles physiologiques du peptide P3.

II.6.4. Rôles de l'AICD

Après sa sécrétion en intracellulaire, l'AICD est relocalisé dans les noyaux cellulaires, pouvant exercer une stimulation ou une inhibition de gènes cibles (Bukhari et al., 2017). Ainsi, il a été démontré que l'AICD serait capable de réguler positivement la transcription de la GSK3β (enzyme impliquée dans la phosphorylation de la protéine Tau) (Müller et al., 2008), de PEN2 (sous-unité de la γ-sécrétase) (Alves da Costa et al., 2006) ou encore de la néprilysine (enzyme impliquée dans la clairance des peptides Aβ) (Grimm et al., 2015).

Des souris transgéniques surexprimant l'AICD développent des caractéristiques pathologiques de type Alzheimer telles qu'une activation anormale de la GSK3β, une hyper-phosphorylation et une agrégation de la protéine Tau, une neurodégénérescence ainsi que des déficits mnésiques (Ghosal et al., 2009).

II.6.5. Rôles du peptide $A\beta_{1-42}$

A ce jour aucun rôle physiologique n'a pu être mis en évidence pour le peptide $A\beta_{1-42}$. Cependant, en conditions pathologiques, le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ augmente fortement, ce qui a contribué à identifier ses différentes fonctions et interactions avec plusieurs partenaires.

➔ ***Implication dans le stress oxydant***

Des études ont montré par résonance électronique paramagnétique, technique qui permet de détecter de manière précise la présence de radicaux libres, que le peptide $A\beta_{1-42}$ a un effet pro-oxydant (Varadarajan et al., 2000). A de fortes doses, ce peptide est un puissant chélateur des ions cuivre (Cu^{2+}) et des ions ferrique (Fe^{3+}) et possède la capacité de les réduire en ions Cu^{+} et Fe^{2+}. Ces ions vont alors réagir avec les espèces oxygénées environnantes (H2O, groupe hydroxyl de la tyrosine 10 de l'$A\beta_{1-42}$,…) (Smith et al., 2007) pour les oxyder, en anions superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) qui vont s'associer à des hydrogènes pour former du peroxyde

d'hydrogène (H_2O_2). Le H_2O_2 réagira à son tour et par une réaction en chaîne, formera des ions hydroxyde ($OH^{\bullet}$). Dans ces dernières réactions sont impliqués les ions fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}) et la production d'$OH^{\bullet}$ provoquera la peroxydation des lipides et/ou la création de groupes carbonyls sur des protéines (Smith et al., 2007). L'implication de ces ions métalliques dans la toxicité des peptides $A\beta_{1-42}$ a été confirmée par des expériences sur des lignées cellulaires de neuroblastomes humains (M17). Ces dernières ont été traitées avec différentes concentrations d'$A\beta_{1-42}$ (100 nM-10 µM), où les métaux ont été retirés du milieu de culture par l'utilisation de déferoxamine (un chélateur des cations divalents et trivalents) (Rottkamp et al., 2001), diminuant ainsi la toxicité liée au peptide $A\beta_{1-42}$.

➔ ***Contribution au dysfonctionnement synaptique***

Des études post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont montré une perte de 25-30% du nombre de synapses au niveau du cortex (Reddy and Beal, 2008). Chez ces patients, cette perte de synapses est couplée à une diminution de protéines pré-synaptiques (synaptophysine) et post-synaptiques (PSD-95), impliquées dans les processus d'exocytose et d'endocytose des vésicules synaptiques et dans l'organisation moléculaire post-synaptique respectivement. Les mécanismes par lesquels le peptide $A\beta_{1-42}$ perturbe le fonctionnement synaptique est encore mal connu mais l'$A\beta_{1-42}$ régulerait négativement l'expression de PSD-95 et de certaines sous-unités des récepteurs au glutamate, AMPA et NMDA (Cerpa et al., 2008). Des expériences d'injection d'oligomères d'$A\beta_{1-42}$, en intra-axonal dans des synapses géantes de calamar, montrent une altération de la transmission synaptique (Moreno et al., 2009; Pigino et al., 2009). Cependant, cette transmission n'est pas ou très peu perturbée par les monomères ou les formes fibrillaires d'$A\beta_{1-42}$, ou par l'administration d'oligomères d'$A\beta_{1-42}$ en extracellulaire.

➔ ***Action sur les canaux ioniques***

Le peptide $A\beta_{1-42}$ a la capacité d'activer les canaux calciques de type L, voltage-dépendants, par l'intermédiaire de la voie des MAP kinases (Ekinci et al., 1999). En effet, après traitement d'une lignée cellulaire (SH-SY5Y) et de cultures primaires de neurones humains avec de l'$A\beta_{1-42}$, Ekinci et ses collaborateurs ont observé une augmentation de la phosphorylation des canaux calciques de type L. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie des MAP kinases permet de réduire l'influx calcique lié aux peptides Aβ (Ekinci et al., 1999).

Les peptides Aβ au niveau des membranes, sous forme oligomérique, seraient capables de former un canal cationique non sélectif. Ces canaux seraient sensibles au voltage et permettraient l'entrée d'ions potassium, calcium et sodium (Arispe et al., 1993a, 1993b; Pollard et al., 1993).

II.7. Les récepteurs de l'Aβ

A ce jour, aucun récepteur spécifique aux peptides Aβ n'a été identifié. Cependant, le peptide $A\beta_{1-42}$ interagirait avec des récepteurs impliqués dans la transmission synaptique conduisant à leur perturbation et provoquant des phénomènes d'excitotoxicité ou encore un déclin cognitif.

➔ ***Les récepteurs cholinergiques***

Le peptide $A\beta_{1-42}$ est capable de se lier aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine avec une forte affinité (de l'ordre du picomolaire) et d'inhiber son activation (Wang et al., 2000a; Wang et al., 2000b). Les récepteurs nicotiniques sont impliqués dans de nombreux processus au niveau de SNC tels que la motricité, la mémoire, l'attention, le sommeil ou encore l'anxiété. Leur inhibition conduit à un déclin cognitif parmi d'autres symptômes tels que des problèmes de motricité. Récemment, Lombardo et ses collaborateurs ont étudié deux

sous-unités du récepteur nicotinique (α7 et β2) et leur possible inhibition par les peptides $A\beta_{1-42}$. Pour cela, ils ont utilisé un modèle murin n'exprimant plus la sous-unité α7 ($\alpha7^{-/-}$) ou la β2 ($\beta2^{-/-}$) du récepteur niconitique (Lombardo et al., 2016). Afin d'évaluer l'impact de l'$A\beta_{1-42}$ sur le déclin cognitif, les auteurs ont réalisé des injections stéréotaxiques bilatérales de lentivirus contenant une forme humaine d'APP muté ayant 3 mutations (Swedish, London et Austrian) ($hAPP_{SLA}$) au niveau du gyrus denté. Les souris $\beta2^{-/-}$ exprimant le transgène $hAPP_{SLA}$ ne présentaient pas de troubles cognitifs, contrairement aux souris $hAPP_{SLA}$-$\alpha7^{-/-}$. Il semblerait donc que l'inhibition du récepteur nicotinique par les peptides $A\beta_{1-42}$ se produise par l'intermédiaire de la sous-unité β2 entrainant l'apparition de troubles mnésiques, retrouvés chez les patients atteints de la MA (Lombardo et al., 2016).

➔ ***Les récepteurs AMPA***

Le peptide $A\beta_{1-42}$ serait capable d'interagir avec les récepteurs au glutamate AMPA en diminuant leur activation ou leur présence au niveau des membranes post-synaptiques. Au niveau mécanistique, plusieurs actions ont été décrites :

- Les phénomènes d'internalisation des récepteurs AMPA sont en partie dus à la protéolyse de la sous-unité GluR1 par la caspase 3. Le peptide Aβ augmente l'activité de la caspase 3 conduisant à une internalisation accrue des récepteurs AMPA et à des phénomènes de dépression à long terme (LTD) (Chan et al., 1999; Li et al., 2010b).
- Les récepteurs AMPA sont régulés par de nombreuses phosphorylations. La CaMKII est une kinase capable de phosphoryler la sous-unité GluR1 de ces récepteurs (Ser831) permettant d'augmenter la conductance du canal et de favoriser les phénomènes de potentialisations à long terme (LTP) (Kristensen et al., 2011). Pour être activée, la CaMKII s'auto-phosphoryle sur sa thréonine 286. Le peptide $A\beta_{1-42}$ inhibe l'auto-

phosphorylation de la CaMKII et, indirectement, il empêche la phosphorylation de la sous-unité GluR1, perturbant les phénomènes de LTP (Zhao et al., 2004).

- Le peptide $A\beta_{1-42}$ induit la phosphorylation de la sous-unité GluR2 (S880) des récepteurs AMPA par l'intermédiaire de l'activation de la protéine kinase C (PKC) provoquant l'endocytose des récepteurs et favorisant les phénomènes de LTD (Liu et al., 2010).
- Le peptide induirait l'endocytose des récepteurs AMPA en activant les cascades de signalisation de la dépression à long terme (LTD) par l'intermédiaire de la protéine p38, la voie des MAPK ou la calcineurine (Hsieh et al., 2006).

➔ ***Les récepteurs NMDA***

Contrairement aux récepteurs AMPA, l'action du peptide $A\beta_{1-42}$ sur les récepteurs au glutamate NMDA est encore mal connue et semble être plus complexe. Une étude conduite par Lesné et ses collaborateurs, sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris, a mis en évidence qu'une stimulation légère des récepteurs NMDA avec un agoniste (NMDA receptor modulator), augmente la sécrétion de peptides $A\beta_{1-42}$ dans le milieu de culture (Lesné et al., 2005). Cette augmentation de peptides Aβ est liée à une augmentation de l'expression d'APP contenant le domaine KPI. Ce domaine KPI est capable d'interagir avec l'α-sécrétase TACE (ADAM 17) et de diminuer son activité d'environ 80% renforçant la voie-amyloïdogénique (Lesné et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris mais cette deuxième étude a montré que seuls les récepteurs NMDA extra-synaptiques augmentent l'expression de l'APP contenant le domaine KPI et par conséquence la production d'Aβ par le même mécanisme que ci-dessus (Bordji et al., 2010).

D'autres travaux, dont ceux de Bi et ses collaborateurs, ont révélé que les récepteurs NMDA sont nécessaires à l'entrée et à l'accumulation intracellulaire des peptides $A\beta_{1-42}$ (Bi et al., 2002). Pour démontrer cela, ils ont utilisé des tranches organotypiques d'hippocampe de rats (400 µm) incubées pendant 6 jours avec de l'$A\beta_{1-42}$ humain synthétique (15 µM). L'analyse des coupes par immunohistochimie a démontré l'internalisation de l'$A\beta_{1-42}$, phénomène qui ne se réalise pas lorsqu'un antagoniste aux récepteurs NMDA (APV, 50 µM) est ajouté au milieu de culture.

Les récepteurs NMDA peuvent modifier l'expression de l'APP favorisant la production d'$A\beta_{1-42}$ et permettent l'entrée de ces peptides dans les neurones. Cependant, les peptides $A\beta_{1-42}$ peuvent réguler ces récepteurs. Le traitement de coupes organotypiques d'hippocampes de rats (250 µm) avec de l'$A\beta_{25-35}$ (50 µM) a montré une diminution du nombre de récepteurs NMDA au niveau des neurones pyramidaux de l'aire CA1, CA3 et du gyrus denté (Johansson et al., 2006). L'analyse de cultures primaires de neurones corticaux de souris révèle qu'après traitement avec de l'$A\beta_{1-42}$ (1 µM pendant 1h), le nombre de récepteurs NMDA à la membrane plasmique est réduit (Snyder et al., 2005). Le couplage de la biotine aux sous-unités NR1 et NR2B des récepteurs NMDA a mis en évidence qu'après traitement de neurones corticaux avec de l'$A\beta_{1-42}$ les récepteurs sont endocytés. Au niveau mécanistique, l'$A\beta_{1-42}$ active les récepteurs nicotiniques (α7). Cette activation provoque une entrée de calcium dans la cellule permettant l'activation de la phosphatase 2B qui conduit à la déphosphorylation de la tyrosine 1472 de la sous-unité NR2B, induisant l'endocytose des récepteurs (Snyder et al., 2005).

➔ ***La PrP^C***

Plusieurs équipes ont montré une interaction entre les peptides Aβ et la PrP^C. Ainsi l'équipe du Dr. Hooper a montré sur une lignée cellulaire de neuroblastomes (N2a) que la

PrP^C régule le clivage β de l'APP réalisé par BACE1. La surexpression de la PrP^C dans les cellules N2a, diminue le clivage β de l'APP et la sécrétion de peptides Aβ dans le milieu de culture. Lorsque la protéine prion est déplétée par des siRNA, une augmentation de la production de peptides amyloïdes est observée (Parkin et al., 2007). De même, ils ont montré que chez les souris *Prnp*$^{-/-}$ ou infectées par des prions, une augmentation significative des peptides Aβ se produit. Laurén et ses collaborateurs ont montré que la PrP^C serait un récepteur des oligomères d'Aβ et que cette interaction perturberait la plasticité synaptique (Laurén et al., 2009). Cependant, le rôle de l'interaction entre la PrP^C et les oligomères d'Aβ n'est pas encore clair et plusieurs points de vue s'opposent quant à l'effet toxique de cette interaction. Des études ont montré que la PrP^C exprimée au niveau des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE) sont capables de lier l'$A\beta_{1-40}$ marqué. Dans un modèle *Prnp*$^{-/-}$, une diminution de la transcytose des peptides $A\beta_{1-40}$ marqués est observée au niveau de la BHE suggérant l'implication de la PrP^C dans ce processus (Pflanzner et al., 2012). Plusieurs interactions et rôles du peptide $A\beta_{1-42}$ sont décrits dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Rôles et récepteurs des peptides $A\beta_{1-42}$.

Rôles	Implications	Modèles	Bibliographie
Pro-oxydant	A de fortes doses, chélation et réduction des ions Cu^{2+} et Fe^{3+}, en Cu^{+} et Fe^{2+} avec création de ROS conduisant à la peroxydation des lipides et la carbonylation des protéines	Plusieurs modèles	Smith et al., 2007 (revue)
Dysfonctionnement synaptique	Les oligomères d'$A\beta_{1-42}$ intracellulaires inhibent l'expression de protéines pré- et post-synaptiques conduisant à une diminution du nombre de synapses	Synapse géante de calamar	Cerpa et al., 2008 Moreno et al., 2009 Pigino et al., 2009
Interaction avec des récepteurs	Récepteurs nicotiniques : inhibition des récepteurs conduisant à des déficits mnésiques	Souris $\beta2^{-/-}$ ou $\alpha7^{-/-}$ transfectées avec un $hAPP_{SLA}$ au niveau du gyrus denté	Lombardo et al., 2016
	AMPA : provoque le clivage ou l'endocytose des récepteurs conduisant à une LTD	Coupes organotypiques d'hippocampes de rats	Hsieh et al., 2006 Parameshwaran et al., 2007

Rôles	Implications	Modèles	Bibliographie
Interaction avec des récepteurs	NMDA : voie d'entrée de l'$A\beta_{1-42}$ dans les cellules. Réduit le nombre de récepteurs et favorise leur endocytose, conduisant à une LTD	Coupes organotypiques d'hippocampes de rats	Johansson et al., 2006
		Cultures primaires de neurones pyramidaux (aire CA1) de rat	Snyder et al., 2005
	PrP^C : perturbation de la plasticité synaptique	Coupes organotypiques d'hippocampes de souris $PrP^{-/-}$	Laurén et al., 2009
	Récepteurs toll-like : stimule la production de récepteurs TLR4, augmentant les phénomènes d'apoptose	Cultures primaires de neurones corticaux de souris WT et TLR4 mutées Coupes de cortex de patients atteints de la MA	Tang et al., 2008
Dysfonctionnement mitochondrial	Perturbe la respiration mitochondriale, l'activité du cytochrome c (Cyt c) et des enzymes du cycle de Krebs	Mitochondries isolées de cerveaux de rats	Casley et al., 2002
	Création de pores transitoires par l'$A\beta_{1-42}$, libérant le Cyt c et activant les voies d'apoptose	Cellules neurales corticales d'embryons de souris	Hou et al., 2014
	Inhibition de la production d'ATP	Cultures primaires de neurones hippocampiques et d'astrocytes de souris	Schmidt et al., 2008
	Perturbe le transport des protéines nucléaires vers les mitochondries entraînant un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à la production de ROS	Lignée cellulaire PC12	Sirk et al., 2007

II.8. Clairance des peptides Aβ

En conditions physiologiques chez l'Homme, il a été estimé que le taux de production de peptides Aβ est de 7,6% par heure et le taux de clairance de 8,3% par heure (Bateman et al., 2006). Ainsi, la clairance des peptides Aβ est supérieure à leur production ce qui empêche leur accumulation. Lorsque cet équilibre est rompu au profit de la production des peptides Aβ ou au détriment des processus de clairance, ces peptides s'accumulent et forment des plaques amyloïdes. Il existe deux processus de clairance de l'Aβ : une dégradation enzymatique et une élimination des peptides.

II.8.1. La dégradation enzymatique des peptides Aβ

Plusieurs enzymes sont capables de dégrader les peptides Aβ et j'ai choisi de décrire les deux enzymes majoritaires : la néprilysine (NEP) et l'insulin degrading enzyme (IDE).

➔ ***La néprilysine (NEP)***

La néprilysine est une protéine transmembranaire de type II avec un court domaine intracellulaire, un domaine transmembranaire et un long domaine extracellulaire portant le site actif de l'enzyme. La NEP est une métalloprotéase zinc-dépendante codée par le gène *MME* (Membrane Metallo-Endopeptidase) situé sur le chromosome 3.

La mise en évidence du rôle de la néprilysine dans la dégradation des peptides Aβ a été réalisée avec un peptide synthétique d'$A\beta_{1-40}$ incubé en présence de NEP purifiée (Howell et al., 1995). Ces résultats *in vitro* ont démontré que la NEP était capable de cliver le peptide Aβ au niveau de cinq sites différents.

Iwata et ses collaborateurs se sont intéressés à la dégradation *in vivo* du peptide $A\beta_{1-42}$. Dans ce but, ils ont utilisé un peptide $A\beta_{1-42}$ radio-marqué au tritium (^{3}H), dans sa partie N-terminale, et au carbone 14 (^{14}C), dans sa partie C-terminale, pour identifier la provenance des différents fragments qui pouvaient être générés après clivage (Iwata et al., 2000). Le peptide radio-marqué a été injecté dans l'hippocampe (aire CA1) de rats par stéréotaxie. Après sacrifice des animaux, l'hippocampe a été prélevé et les auteurs ont extrait les peptides $A\beta_{1-42}$ et leurs fragments radio-marqués puis les ont purifiés grâce à une HPLC (Iwata et al., 2000). Les profils radioactifs obtenus montrent un pic de fragments d'$A\beta_{1-42}$ dès la troisième minute post-injection, aussi bien en ^{14}C qu'en ^{3}H, montrant une dégradation du peptide $A\beta_{1-42}$. Dans une deuxième expérience, Iwata et ses collaborateurs ont utilisé différents inhibiteurs de protéases pour identifier l'enzyme responsable de ce clivage. Ainsi, seule l'injection de thiorphan dans l'hippocampe de rats, suivie de l'injection d'$A\beta_{1-42}$ radio-marqué inhibe la

dégradation du peptide. Le thiorphan étant un inhibiteur spécifique de la NEP, les auteurs ont montré *in vivo* que la NEP était capable de dégrader le peptide $A\beta_{1-42}$ (Iwata et al., 2000).

La même équipe a aussi montré que des souris knock-out pour la néprilysine ($Nep^{-/-}$) présentaient un défaut de dégradation des peptides Aβ, d'origine endogène ou exogène, conduisant à une augmentation des dépôts amyloïdes au niveau de l'hippocampe et du cortex (Iwata et al., 2001). De même, l'utilisation d'un inhibiteur de la NEP (thiorphan), par injection en intracérébral conduit à une augmentation des dépôts amyloïdes couplés à des déficits mnésiques chez le rat (Mouri et al., 2006), chez le lapin (Newell et al., 2003) et chez un primate non-humain (Li et al., 2010a).

Inversement, des études *in vivo* ont montré une diminution des dépôts amyloïdes chez des souris transgéniques J20 ($hAPP_{Swe/Ind}$) surexprimant la NEP (Leissring et al., 2003). Ces études ont été confirmées dans différents modèles de souris transgéniques exprimant l'APP humaine mutée et dont la NEP a été surexprimée par une injection intracérébrale (Marr et al., 2003) ou intrapéritonéale (Spencer et al., 2011) de lentivirus.

Une étude s'intéressant aux fractions solubles (vésiculaires) et insolubles (membranaires) de l'Aβ, a montré, après surexpression de la NEP, que l'enzyme ne dégradait que l'Aβ insoluble présent au niveau des membranes (Sudoh et al., 2002).

➔ ***L'insulin degrading enzyme (IDE)***

L'IDE est une protéase ubiquitaire à thiols, zinc-dépendante principalement cytosolique codée par le gène *Ide* présent sur le chromosome 10. Cette protéase est aussi présente dans d'autres compartiments cellulaires tels que la mitochondrie, la membrane plasmique, les péroxysomes ou encore dans le noyau cellulaire, en très faible quantité (Kurochkin et al., 2018). Une des particularités de l'IDE est sa capacité à dégrader des protéines riches en feuillets β tels que les peptides Aβ, l'insuline ou le glucagon.

Le rôle de l'IDE dans la dégradation des peptides Aβ, a d'abord été démontré par des expériences *in vitro*. Kurochkin et ses collaborateurs ont incubé de l'$A\beta_{1-40}$ synthétique avec de l'IDE purifiée montrant une dégradation du peptide par cette protéase (Kurochkin and Goto, 1994). Ces expériences ont été confirmées en utilisant des extraits de cerveaux humains incubés avec des peptides $A\beta_{1-40}$ synthétiques. L'utilisation de concentrations saturantes d'insuline et d'anticorps ciblés contre l'IDE ont montré l'implication de la protéase dans la dégradation des peptides Aβ (McDermott and Gibson, 1997).

Par ailleurs, l'IDE est capable de dégrader l'Aβ extracellulaire. Qiu et ses collaborateurs ont traité des lignées microgliales (BV-2) avec des peptides Aβ synthétiques dans le milieu de culture. L'analyse des cellules a révélé la présence d'IDE dans le cytosol des cellules microgliales, mais aussi dans le milieu de culture. L'enzyme peut donc être sécrétée et contribuer à la dégradation des peptides amyloïdes extracellulaires (Qiu et al., 1998). Le même traitement effectué sur des cultures primaires de neurones corticaux de rats, ne pouvant pas sécréter l'IDE montre la présence de l'enzyme au niveau de la membrane plasmique et suggère son implication dans la dégradation des peptides extracellulaires (Vekrellis et al., 2000).

Sudoh et ses collaborateurs se sont intéressés aux fractions solubles et insolubles de l'Aβ, retrouvées respectivement dans les vésicules golgiennes et au niveau membranaire. Ils ont montré que les peptides présents dans les deux fractions étaient dégradés par une enzyme sensible à des inhibiteurs de protéases à thiols mais insensible au thiorphan, suggérant que l'IDE serait responsable de cette dégradation et non la néprilysine (Sudoh et al., 2002). Cette étude met en valeur que l'IDE est la protéase principale responsable de la dégradation des peptides Aβ et qu'elle est capable de dégrader les formes solubles et insolubles d'Aβ.

II.8.2. Elimination des peptides Aβ

Outre la dégradation enzymatique des peptides amyloïdes par la NEP et l'IDE, il existe des processus d'élimination et notamment un mécanisme dynamique permettant des échanges entre le liquide interstitiel, le liquide céphalorachidien et le plasma. Ces différents compartiments sont séparés entre eux par la barrière hémato-encéphalique (BHE), constituant une barrière protectrice et empêchant la circulation de composés tels que les peptides Aβ. Les transferts entre compartiments sont réalisés par l'intermédiaire de récepteurs. Deux familles de récepteurs modulent les échanges des peptides Aβ : les récepteurs LRP (low-density lipoprotein receptor related protein) modulant les flux sortants et les récepteurs RAGE (receptor for advanced glycation end products) modulant plutôt les flux entrants.

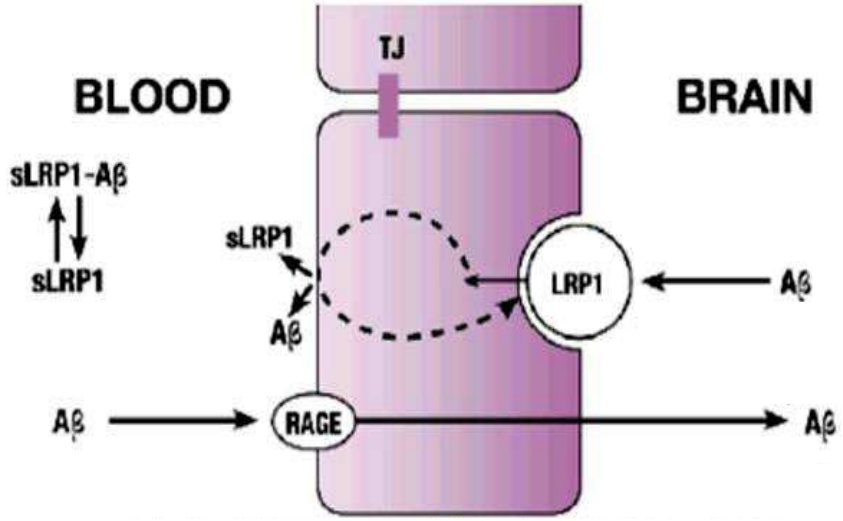


Figure 45. Schéma représentant le rôle des récepteurs LRP1 et RAGE dans le transport des peptides Aβ à travers la BHE (adapté de Deane et al., 2009)**.**

Les récepteurs RAGE sont des immunoglobulines de surface impliqués dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'inflammation et les amyloïdoses (Stern et al., 2002). Ces récepteurs permettent le passage des peptides Aβ des capillaires vers le parenchyme cérébral à travers la BHE (**Figure 45**). Leur implication dans le transport des peptides Aβ a été mise en évidence par l'injection en intraveineuse de peptides Aβ marqués

dont l'apparition dans le SNC a été suivie (Deane et al., 2003). Le passage des peptides Aβ dans le SNC des animaux injectés induit l'apparition d'une inflammation. Le blocage des récepteurs RAGE, par des antagonistes, dans un modèle murin transgénique (Tg2576) exprimant une forme d'hAPP mutée (mutation suédoise), diminuerait l'accumulation des peptides Aβ dans le parenchyme cérébral.

Les récepteurs LRP1 sont impliqués dans le métabolisme lipidique et permettent les flux sortants des peptides Aβ du parenchyme cérébral vers la circulation sanguine (**Figure 45**) (Shibata et al., 2000). Les récepteurs LRP1 sont retrouvés au niveau de différents types cellulaires du SNC tels que les neurones (Kanekiyo et al., 2013), les astrocytes (Liu et al., 2017), les cellules musculaires lisses vasculaires (Kanekiyo et al., 2012) et les cellules endothéliales (Storck et al., 2016). Par des knock-out conditionnels du gène *Lrp1* ou par l'utilisation de siRNA, ciblant les différents types cellulaires présentés ci-dessus, exprimés dans un modèle murin surproduisant l'$A\beta_{1-42}$, conduisent à une forte augmentation des plaques amyloïdes parenchymales mais aussi à l'augmentation des dépôts amyloïdes vasculaires caractéristiques de l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC).

Des travaux montrent que l'expression des récepteurs LRP1 est diminuée avec l'âge chez la souris (Shibata et al., 2000), alors que l'expression des récepteurs RAGE est augmentée (Yan et al., 1996). Ces modifications d'expression ont été également observées chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ce qui peut expliquer, en partie, l'apparition des formes « late-onset » de la pathologie.

III. Angiopathie amyloïde cérébrale (AAC)

Tout comme la maladie d'Alzheimer, l'AAC fait partie des amyloïdoses et se caractérise par des dépôts amyloïdes constitués de peptides Aβ. Les dépôts présents dans la MA sont retrouvés au niveau du parenchyme cérébral alors que dans l'AAC les dépôts sont

localisés autour des petits et moyens vaisseaux sanguins du cortex et des leptoméninges (**Figure 46**) (Thal et al., 2009; Weller et al., 1998).

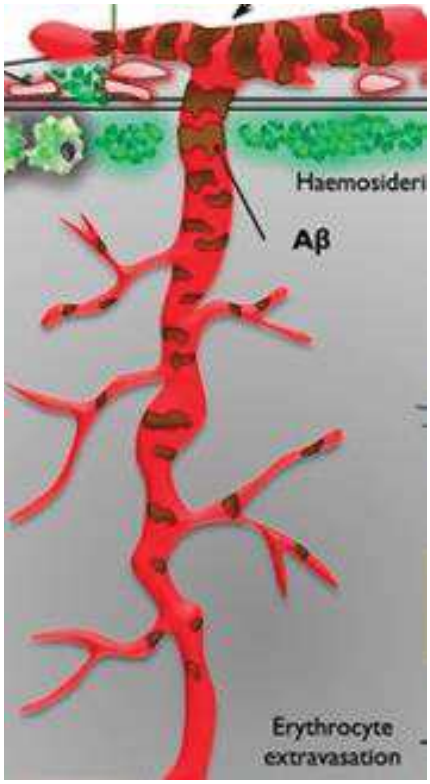


Figure 46. Schématisation des dépôts amyloïdes autour des vaisseaux sanguins leptoméningiaux et corticaux (adapté de Charidimou et al., 2015)**.**

Les formes sporadiques de l'AAC sont les plus fréquentes et touchent des personnes âgées avec une prévalence qui augmente avec l'âge. L'AAC se caractérise par la formation de dépôts amyloïdes au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins corticaux et leptoméningiaux, qui sont constitués majoritairement de peptides $A\beta_{1\text{-}40}$ (Hawkes et al., 2014). L'hypothèse prédominante de la formation des dépôts amyloïdes vasculaires est qu'il existerait un défaut de clairance du liquide interstitiel et donc un défaut de clairance des peptides Aβ (Auriel and Greenberg, 2012). L'AAC sporadique est souvent associée à un risque accru d'hémorragies intracérébrales liées à la fragilisation de la paroi des vaisseaux sanguins due aux dépôts amyloïdes vasculaires (Biffi and Greenberg, 2011). Ces hémorragies peuvent être associées à un déclin cognitif pouvant aller jusqu'à la démence (Sutherland and Auer, 2006). Les allèles

APOE ε2 et ε4 sont les deux principaux facteurs de risques génétiques pour les formes sporadiques d'AAC. L'allèle APOE ε2 conduit à une fragilité des vaisseaux sanguins (Greenberg et al., 1998) et l'allèle APOE ε4 favorise l'apparition des dépôts amyloïdes vasculaires (Charidimou et al., 2015).

Les formes génétiques de l'AAC sont rares et se caractérisent par une apparition plus précoce et une physiopathologie plus sévère par rapport aux formes sporadiques. Ces formes sont principalement associées à des mutations du gène codant pour l'APP telle que la mutation Dutch (E693Q) donnant lieu à la pathologie nommée « hémorragie cérébrale héréditaire avec amyloïdose » qui conduit à des formes fatales d'hémorragie (Bornebroek et al., 2003). D'autres mutations du gène *App*, ont un tableau clinique similaire telles que la mutation Flemish (A692G) (Cras et al., 1998) et Iowa (D694N) (Greenberg et al., 2003). Cependant, toutes les mutations de l'APP ne conduisent pas nécessairement à la présence d'hémorragies.

Des études post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de formes sporadiques de la MA ont mis en évidence que dans 80 à 90% des cas, une angiopathie amyloïde cérébrale coexistait, avec des degrés de sévérité variables (Ellis et al., 1996; Jellinger and Attems, 2003).

La grande majorité des mutations retrouvées sur le gène *App* sont à l'origine des formes familiales de la maladie d'Alzheimer et peuvent donc être associées à des formes d'AAC (Antonell et al., 2012; Rovelet-Lecrux et al., 2007). De plus, une AAC peut être détectée en présence de mutations sur les gènes codant pour les présénilines (PSEN1 et PSEN2) (Floris et al., 2015). Il existe donc un lien entre AAC et MA.

IV. Caractéristiques prion-like des peptides Aβ

Des études récentes menées sur des protéines amyloïdes telles que Tau ou le peptide $A\beta_{1-42}$ suggèrent qu'elles partagent des caractéristiques physico-chimiques avec la PrP^C et les prions (Frost and Diamond, 2010; Kim and Holtzman, 2010). La transmission d'une conformation mal repliée, riche en feuillets β, aux protéines nouvellement synthétisées, a été proposée. Ce concept de propagation dit « prion-like » a été suggéré pour la plupart des maladies conformationelles (avec dépôts d'agrégats amyloïdes). Ainsi, des stratégies thérapeutiques communes pourraient être développées pour bloquer ce mécanisme. Dans le paragraphe suivant, seules les propriétés de type « prion-like » du peptide $A\beta_{1-42}$, seront abordées.

IV.1. De l'Aβ soluble à l'Aβ insoluble

Le peptide $A\beta_{1-42}$ possède la capacité de former des structures multimériques insolubles appelées plaques amyloïdes. Après clivage de l'APP par la β et la γ-sécrétase, les peptides $A\beta_{1-42}$ présents dans le milieu extracellulaire vont rapidement s'assembler et former des espèces oligomériques. La forme monomérique est difficile à caractériser. Au sein de la communauté scientifique deux modèles structuraux de monomères d'$A\beta_{1-42}$ ont été proposés. Dans un premier modèle, le monomère aurait une structure secondaire sous forme d'hélices α (Crescenzi et al., 2002; Fonar and Samson, 2014; Tomaselli et al., 2006) (**Figure 47B**), alors que dans second modèle il serait dépourvu de structures secondaires (random coil) (Barrow et al., 1992; Danielsson et al., 2005; Davis and Berkowitz, 2009; Wallin et al., 2018) (**Figure 47C**).

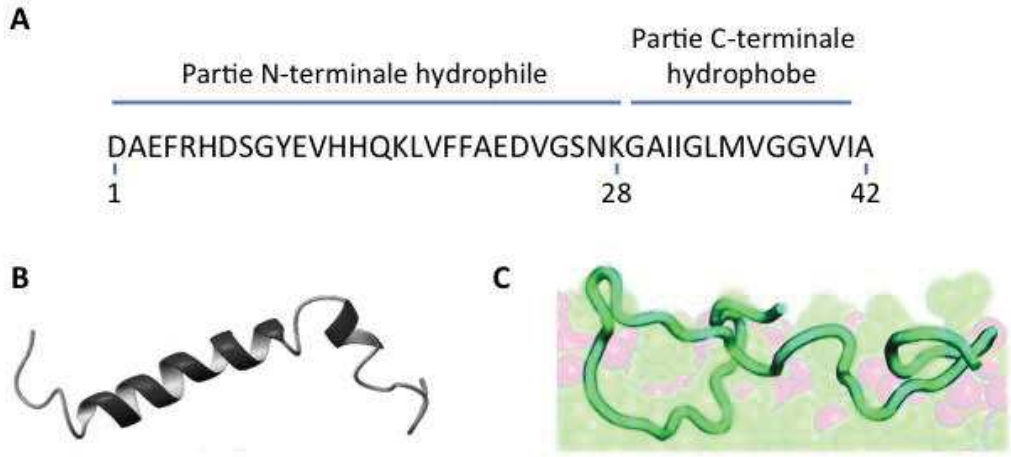


Figure 47. Structure primaire et secondaire du peptide Aβ$_{1-42}$ soluble. A. Structure primaire du peptide Aβ$_{1-42}$. **B.** Représentation du modèle en hélices α du peptide Aβ$_{1-42}$ (extrait de Tomaselli et al., 2006). **C.** Schématisation du peptide Aβ$_{1-42}$ sous forme non structurée, random coil (selon Davis and Berkowitz, 2009).

Rapidement, les monomères d'Aβ vont adopter une structure riche en feuillets β (entre 10 et 20% de feuillets β) (Bitan et al., 2003) et former des espèces oligomériques (dimères, trimères,…) de faible poids moléculaire, jusqu'à la formation d'un noyau de nucléation qui entraînera la formation et l'élongation rapide des fibres amyloïdes (Lesné et al., 2006). Ces intermédiaires de faible poids moléculaire ont été décrits comme les espèces les plus neurotoxiques (Lesné et al., 2006). Dans ce processus d'agrégation du peptide Aβ, deux phases peuvent être prises en compte : la phase où les peptides sont solubles (monomères, dimères, oligomères,…), pouvant être dégradés (Walsh et al., 2000) et la phase où les peptides sont insolubles, après agrégation des oligomères entre eux formant les plaques amyloïdes. Ce n'est que récemment que la structure quaternaire du peptide Aβ a été résolue, par la cryo-microscopie électronique. Gremer et ses collaborateurs ont montré que les protofilaments seraient composés de sous-unités d'Aβ dont la partie N-terminale aurait une forme en « L » et la partie C-terminale en « S » (Gremer et al., 2017). Le protofilament d'Aβ serait alors constitué par l'empilement des différentes sous-unités et plusieurs protofilaments s'associeraient entre eux pour former des fibres (**Figure 48**).

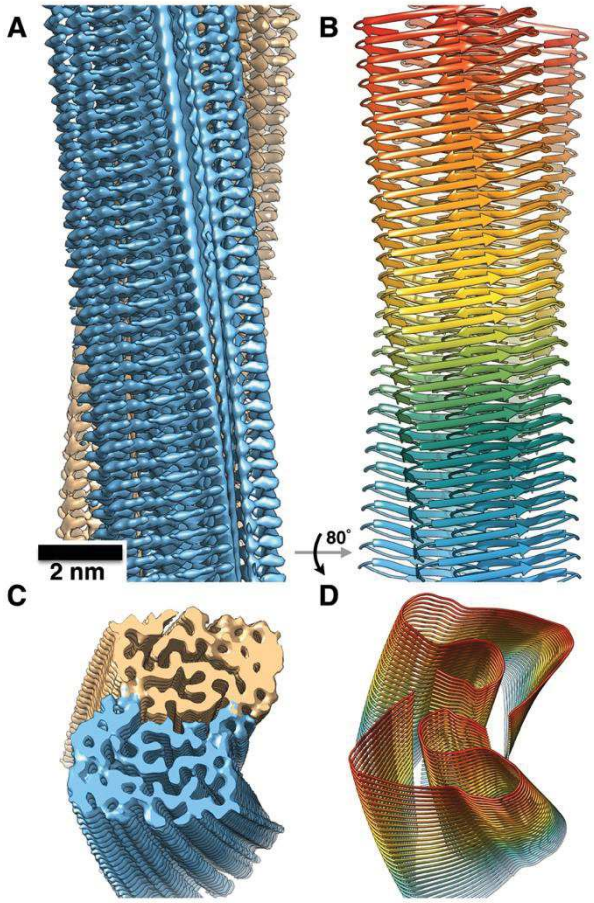


Figure 48. Structure quaternaire de l'Aβ$_{1-42}$. A. Représentation en 3D de deux protofilaments d'Aβ$_{1-42}$. **B.** Modèle atomique de deux protofilaments d'Aβ$_{1-42}$ où l'on aperçoit l'empilement des feuillets β en parallèle. **C-D.** Vue en coupe de deux protofilaments d'Aβ$_{1-42}$ (extrait de Gremer et al., 2017).

IV.2. Propagation des agrégats

Tout comme la protéine prion PrP^{Sc}, les agrégats d'Aβ ont la capacité de se propager au sein du système nerveux central, selon des mécanismes identiques tels que l'excrétion de vésicules (Rajendran et al., 2006), l'endocytose des peptides (Omtri et al., 2012), la recapture au niveau synaptique (Song et al., 2014) ou encore l'utilisation de nanotubes (Domert et al., 2014) (**Figure 49**). L'utilisation des mécanismes cellulaires physiologiques permet aux peptides amyloïdes de se propager de cellules en cellules et donc de permettre l'invasion de régions cérébrales interconnectées.

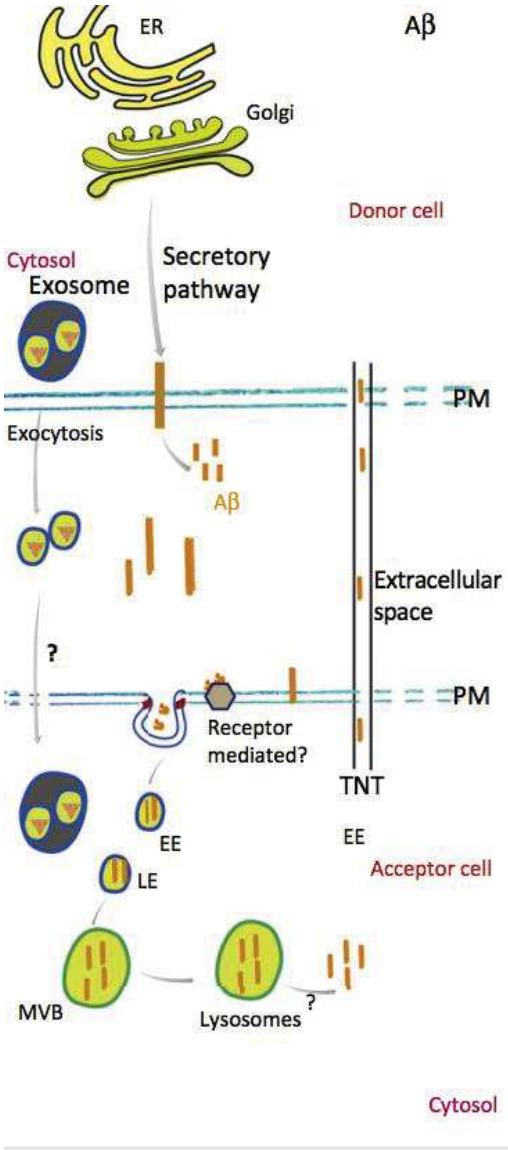


Figure 49. Synthèse de quelques voies de propagation des peptides Aβ entre cellules. PM : membrane plasmique, EE : endosomes précoces, LE : endosomes tardifs, MVB : corps multi-vésiculaires et TNT : nanotubes (extrait de Aguzzi and Lakkaraju, 2016).

IV.3. Phénomène d'ensemencement

L'injection en intracérébral d'un homogénat de cerveau de souris transgéniques âgées APP23 (exprimant l'hAPP contenant la mutation Swedish) ou CRND8 (hAPP possédant les mutations Swedish et Indiana) à des souris APP23 jeunes, induit une amyloïdose plus précoce (Stöhr et al., 2012). L'injection initiale en unilatéral dans le cerveau a permis la propagation des agrégats en bilatéral. Des fibrilles d'Aβ purifiées à partir d'homogénats de cerveaux de souris transgéniques âgées APP23 et CRND8 sont suffisantes pour induire la pathologie plus

précocement (Stöhr et al., 2012). Afin de démontrer que seul le peptide Aβ est capable d'induire la pathologie, des fibrilles synthétiques d'Aβ (250 µg/mL) ont été inoculées en intracérébral à des souris APP23. Les résultats ont confirmé les données obtenues avec les homogénats de cerveaux (Stöhr et al., 2012).

De manière plus surprenante, des expériences ont révélé que la voie intrapéritonéale permet aussi le déclenchement d'une amyloïdose dans le cerveau. Eisele et ses collaborateurs ont inoculé un homogénat de cerveau de souris âgée APP23 en intrapéritonéal (2 injections de 100 µL, espacées d'1 semaine) à des souris APP23 âgées de 2 mois. Sept mois après l'inoculation les souris ont déclaré la pathologie avec la présence de nombreux agrégats au niveau du cerveau (Eisele et al., 2010). Les souris APP23 injectées en intrapéritonéal ont un profil d'agrégation différent avec une majorité de plaques vasculaires rappelant une angiopathie amyloïde cérébrale (Eisele et al., 2010). D'autres voies d'inoculation testées telles que la voie orale, intraoculaire ou encore intranasale n'ont pas induit la formation d'une amyloïdose (Eisele et al., 2009). Il semblerait que pour induire la pathologie à partir d'une inoculation périphérique de très fortes concentrations d'Aβ soient requises afin de pouvoir atteindre le seuil critique de neuro-invasion. La question de la réplication des peptides dans des organes périphériques tels que le système lymphoïde secondaire est posée (comme pour les protéines prions). Si ce n'est pas le cas, ceci pourrait expliquer la nécessité d'utiliser de très fortes concentrations en Aβ pour obtenir une amyloïdose centrale.

Les études présentées ci-dessus utilisent des modèles qui surexpriment une forme humaine d'APP mutée et vont développer une amyloïdose plus ou moins rapidement selon le niveau d'expression du transgène et s'il y a ensemencement ou pas. L'équipe de C. Soto a testé la formation *de novo* de la pathologie chez des souris qui expriment la forme non mutée de l'hAPP. Ces animaux ne produisent pas d'agrégats d'Aβ et ne développent pas spontanément la maladie d'Alzheimer. Ces souris ont été inoculées par voie intracérébrale au

niveau de l'hippocampe (en bilatéral), avec un homogénat de cerveau d'un patient atteint de la MA ou avec un homogénat de cerveau d'un sujet jeune sain. L'apparition de plaques amyloïdes a été contrôlée à 30, 90, 285, 450 et 585 jours post-inoculation (Morales et al., 2012). Dès 285 jours post-inoculation les souris traitées avec l'homogénat de cerveau atteint de la MA présentent des agrégats diffus de peptides Aβ et le nombre de dépôts augmente au cours du temps. Les souris contrôles inoculées avec l'homogénat de cerveau d'un sujet sain, ne présentent pas d'agrégats du peptide Aβ (Morales et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés chez des rats transgéniques exprimant une forme d'hAPP non mutée (lignée APP21) inoculés en intracérébral (hippocampe) avec un homogénat de cerveau provenant d'un patient atteint de la MA (Rosen et al., 2012).

V. Modèles transgéniques de la maladie d'Alzheimer

De nombreux modèles animaux ont été développés afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Les différents modèles de souris transgéniques miment les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, qui ne représentent que 5% des cas et sont liées à des mutations des gènes codant pour l'APP, la PSEN1 et la PSEN2. Actuellement, aucun modèle transgénique ne mime l'ensemble des symptômes de la MA ce qui limite la compréhension des mécanismes et l'impact des stratégies thérapeutiques développées (Ashe and Zahs, 2010). Les différents modèles murins de la pathologie diffèrent entre eux par la vitesse de développement des symptômes, les marqueurs de la pathologie (Aβ, Tau, inflammation,…), la progression et la gravité de la pathologie. Ci-dessous sont présentés très succinctement les principaux modèles de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer.

➔ ***Le modèle Tg2576 ($hAPP_{Swe}$)***

L'un des modèles les plus fréquemment utilisés pour étudier les plaques amyloïdes est le modèle Tg2576. Il se caractérise par l'expression d'une forme humaine de l'APP contenant la mutation « suédoise » (K670N / M671L) exprimée sous le contrôle du promoteur HamPrP (promoteur prion de hamster) (Hsiao et al., 1996). Ce promoteur permet l'expression de l'APP dans l'ensemble des types cellulaires du SNC. Cette mutation génère une augmentation de la production des peptides $A\beta_{1-40}$ (x5) et $A\beta_{1-42}$ (x14) conduisant à la production de nombreuses plaques amyloïdes au niveau du cortex et des structures limbiques. Ce modèle ne développe pas d'enchevêtrements neurofibrillaires ni des pertes neuronales (Hsiao et al., 1996). Les troubles de la mémoire de travail apparaissent entre 9 et 10 mois.

➔ ***Le modèle J20 ($hAPP_{Swe/Ind}$)***

Les souris J20 sont aussi un modèle couramment utilisé et expriment une forme humaine d'APP contenant les mutations « suédoise » (K670N / M671L) et « indiana » (V717F) sous le contrôle du promoteur PDGF-β exprimé au niveau neuronal (Mucke et al., 2000). Ce modèle conduit à une surproduction d'$A\beta_{1-42}$ et à l'apparition de plaques amyloïdes entre 3 à 7 mois. L'avantage de cette lignée de souris est qu'elle est « robuste » puisqu'entre 8 et 9 mois les animaux d'une même colonie ont un niveau de plaques amyloïdes assez homogène. Ce modèle présente une perte neuronale dans la région CA1 de l'hippocampe associée à des déficits cognitifs dès 12 semaines (Wright et al., 2013). Les souris J20 ont d'autres caractéristiques telles que des perturbations synaptiques dans l'aire CA1 de l'hippocampe couplées à des déficits de LTP (Saganich et al., 2006). Néanmoins, ces souris ne présentent pas d'enchevêtrements neurofibrillaires (Mucke et al., 2000).

➔ ***<u>Le modèle 5xFAD</u>***

Le modèle 5xFAD exprime l'hAPP contenant les mutations « suédoise » (K670N / M671L), « london » (V171I) et « floride » (I716V) ainsi que 2 mutations sur le gène de la *Psen1* (M146L et L28V) (Oakley et al., 2006) retrouvées dans des formes familiales de la MA. Ces 2 gènes sont exprimés sous le contrôle du promoteur Thy1, au niveau neuronal. La présence de ces 5 mutations permet un développement rapide de la pathologie avec une surproduction du peptide $A\beta_{1-42}$. Dès un mois et demi ces souris présentent une accumulation intraneuronale d'$A\beta_{1-42}$ avec apparition de plaques séniles à partir du deuxième mois, couplée à des processus de glioses. Les plaques amyloïdes sont retrouvées au niveau de l'hippocampe et du cortex aux alentours de 6 mois. On observe également une dégénérescence synaptique, une perte neuronale, des déficits mnésiques (Oakley et al., 2006) ainsi que des troubles de la LTP (Kimura and Ohno, 2009), par contre on ne retrouve pas d'enchevêtrements neurofibrillaires. Ce modèle « agressif » de la MA ne présente pas d'homogénéité en termes de plaques amyloïdes entre les différentes souris de la même colonie ce qui rend difficile les études de quantification.

Chapitre III. Les pesticides : facteurs de risque pour les maladies neurodégénératives

L'origine des formes sporadiques des maladies neurodégénératives, plus particulièrement des maladies à prions et de la MA, n'est pas clairement identifiée même s'il est admis dans la communauté scientifique que les causes sont multifactorielles. Des facteurs de risque génétiques, tels que l'allèle APOE ε4 ou le polymorphisme M/M au codon 129 de la protéine prion ont un rôle majeur dans l'incidence de la maladie d'Alzheimer et des ESST, respectivement. Actuellement, l'influence des polluants environnementaux sur le développement et l'incidence de ces maladies est pointée du doigt. Dans ce chapitre, nous aborderons plus spécifiquement le rôle des pesticides dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives.

I. Généralités

Les pesticides ou produits phytosanitaires sont définis par la FAO (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) comme *« toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires* ».

Historiquement, les pesticides ont connu un essor considérable après la deuxième guerre mondiale avec le développement de l'agriculture intensive afin que la France et les pays d'Europe puissent être en autosuffisance alimentaire. Ainsi, les produits phytosanitaires ont été massivement utilisés pour garantir un rendement maximal des récoltes. L'objectif

d'autosuffisance atteint, une société de consommation s'est mise en place exerçant une pression sur le secteur agricole pour continuer à garantir l'abondance des fruits et des légumes en toutes saisons. L'usage abondant, constant et systématique des pesticides est devenu une pratique courante en agriculture. L'utilisation des produits phytosanitaires n'est pas sans conséquences pour la santé humaine et des données scientifiques montrent que l'exposition aux pesticides induit des pathologies différentes (cancers, maladies neurodégénératives, troubles de la fertilité,…) (INSERM, 2013).

I.1. Marché des pesticides

La France est le premier pays agricole de l'Union Européenne (UE) avec un peu plus de 27 millions d'hectares cultivés, représentant environ 16% de la valeur brute de production de l'UE (données Eurostat 2016). La vente des produits phytosanitaires en France s'élevait à 2,2 milliards d'euros en 2016 représentant environ 72 000 tonnes de pesticides. En France, l'évolution des tonnages montre une diminution globale de l'utilisation des pesticides entre 1999 (115 000 tonnes) et 2006 (72 000 tonnes) (**Figure 50**). En 2006, la Comission Européenne a présenté une directive dans le but de mettre en place au sein de l'UE des plans nationaux pour réduire leur utilisation (directive 2009/128/CE). Ainsi, la France s'est inscrite dans ce mouvement et après le Grenelle de l'environnement de 2007, a proposé le plan « Ecophyto » (ou Ecophyto 2018), mis en œuvre en 2008. Ce plan, qui s'étalait sur une période de 10 ans, avait pour objectif de réduire de 50% l'utilisation des pesticides dans notre pays (Butault et al., 2010; Jacquet et al., 2011). Cependant, ce plan s'est soldé par un échec car entre la période 2009 - 2016 l'utilisation de pesticides a augmenté de 9 000 tonnes soit près de 15% (**Figure 50**). En 2014, le rapport Potier entérine l'échec du plan Ecophyto (Potier, 2014) et le gouvernement a lancé le plan « Ecophyto 2 » (ou Ecophyto 2025), en 2015. Les objectifs de ce deuxième plan visent à réduire de 25% le recours aux produits

phytosanitaires d'ici 2020, et de 50% à l'horizon 2025. Ce dernier objectif de 50% en 2025 fera l'objet d'une évaluation en 2020. L'augmentation des pesticides en 2014 et 2016, qui a contribué à l'échec du plan Ecophyto, est liée à des conditions climatiques particulières. Ces deux années ont été marquées par un climat doux et humide favorisant le développement de champignons demandant des traitements plus nombreux et plus fréquents. La réussite ou l'échec des plans Ecophyto est également dépendante des conditions climatiques qui ne sont pas prises en compte lors de l'élaboration de ce type de plan et des objectifs à atteindre. Une critique majeure du plan Ecophyto, présentée dans le rapport Potier, est que la diminution drastique de l'utilisation des pesticides (50%) sur 10 ans n'a pas été accompagnée d'une transformation du système agricole français telles que la diversité et la rotation des cultures (Potier, 2014). Le rapport stipule aussi d'opter pour des variétés ou des cultures plus résistantes, de développer les moyens de biocôntrole et la modernisation des équipements. Ces mesures pourraient conduire à une diminution des pulvérisations de pesticides d'environ 30%.

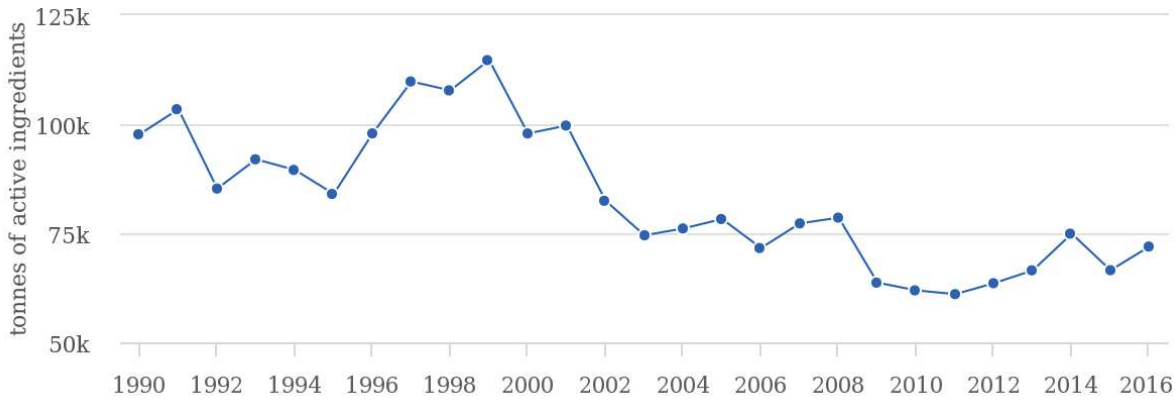


Figure 50. Evolution du tonnage total de pesticides vendus en France entre 1990 et 2016 (source FAOstat).

En 2016, plus de la moitié du tonnage des produits phytosanitaires utilisés étaient des fongicides (environ 53%) suivis par les herbicides (environ 35%) (source : FAOstat).

Au niveau Européen, la France est le plus gros acheteur de pesticides avec un marché représentant plus de 2 milliards d'euros par an (**Figure 51**). Le tonnage de l'UE est en

augmentation depuis 2010, avec en 2016 un tonnage total d'environ 370 000 tonnes de pesticides utilisées (**Figure 52**), rattrapant quasiment le niveau des années 1990. La consommation française représente près de 20% du tonnage de l'UE.

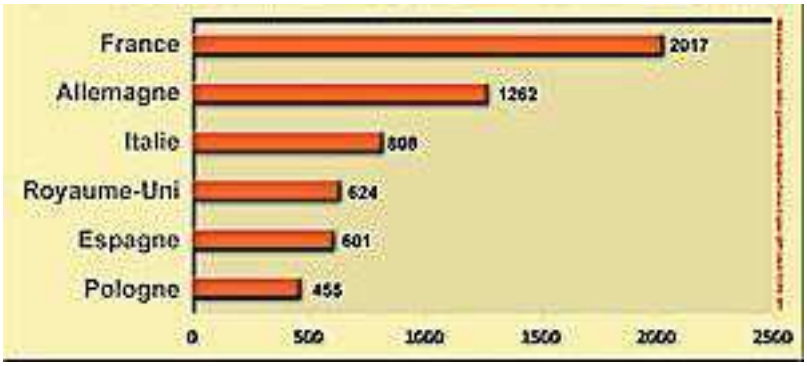


Figure 51. Valeurs monétaires de la vente de pesticides en 2009, en millions d'euros, pour les 6 principaux pays agricoles européens (selon l'UIPP, Union des Industries de la Protection des Plantes).

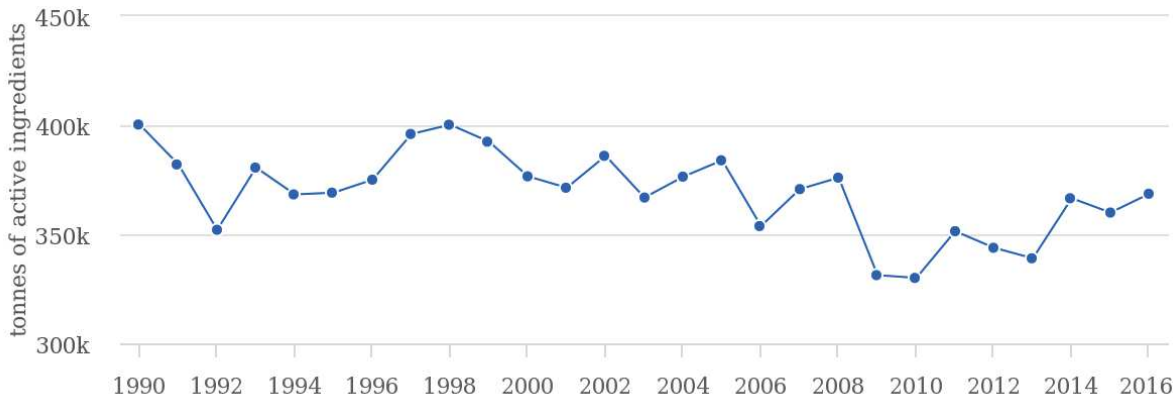


Figure 52. Evolution du tonnage de l'Union Européenne des produits phytosanitaires vendus entre 1990 et 2016 (source FAOstat).

Lorsque la consommation de pesticides est ramenée à la surface agricole par hectare, la France occupe alors la dixième place des pays européens consommateurs de pesticides avec une valeur de 3,72 kg/ha en 2016 (**Figure 53** ; source FAOstat), légèrement au-dessus de la moyenne européenne (3,14 kg/ha ; données FAOstat) (**Figure 54**).

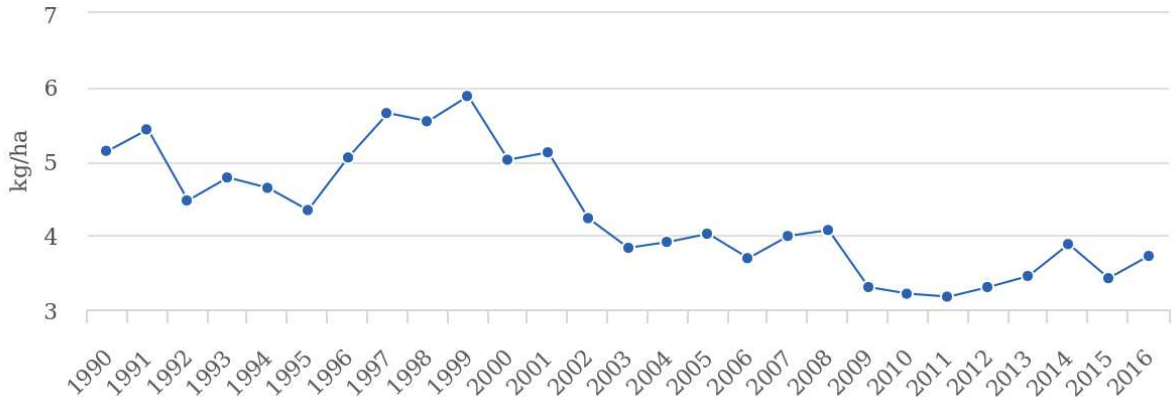


Figure 53. Evolution du tonnage des produits phytosanitaires rapporté à la surface agricole (kg/ha) entre 1990 et 2016 en France (source FAOstat).

En France, nous pouvons constater une augmentation de l'utilisation des pesticides rapportée à la surface agricole entre 1990 et 1999 atteignant un pic de près de 6 kg/ha (**Figure 53**). Depuis 2000, des efforts considérables ont été fournis pour réduire la quantité de pesticides utilisés avec un minimum atteint en 2011 (environ 3 kg/ha). Cette diminution, principalement observée entre 2008 et 2009 peut être liée au plan Ecophyto 1, promouvant une baisse de 50% de l'utilisation des pesticides pour 2018, avec une prise de conscience des professionnels s'intéressant à des produits phytosanitaires plus efficaces utilisés en moindres quantités. Cependant, depuis 2011 le tonnage de pesticides par hectare repart à la hausse, les niveaux restent en dessous de la barre des 4 kg/ha (**Figure 53**). En cause, des conditions climatiques propices au développement des nuisibles (champignons, pucerons vecteurs de virus,…) qui ont nécessité des traitements plus fréquents. Ce fût particulièrement le cas en 2016, où la drosophile Suzuki a endommagé la récolte de cerises et a necessité de nombreuses applications de pesticides différents.

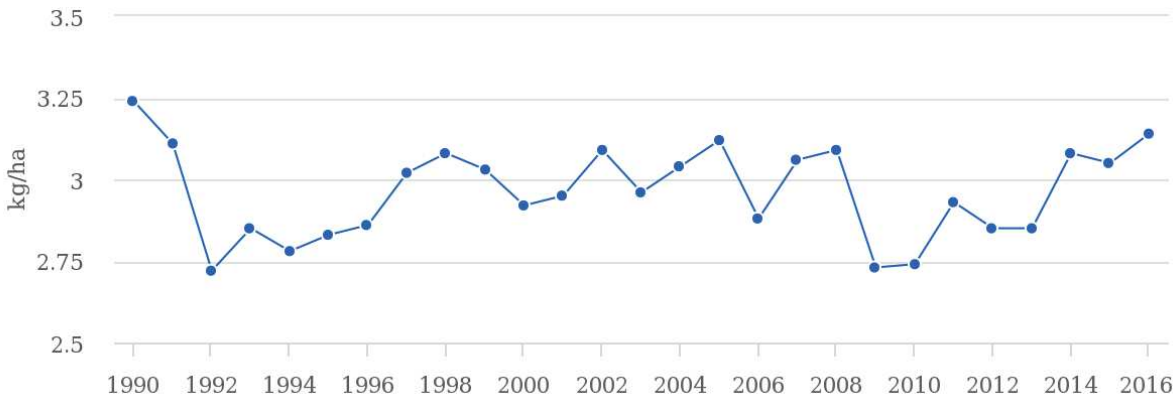


Figure 54. Evolution du tonnage des produits phytosanitaires rapporté à la surface agricole (kg/ha) entre 1990 et 2016 au niveau de l'Union Européenne (source FAOstat).

Le marché mondial des pesticides représente environ 40,5 milliards de dollars de chiffre d'affaires en 2016 avec un peu plus de 4 millions de tonnes vendues (source FAOstat) (**Figure 55**). Depuis 1990 l'évolution de ce chiffre montre une constante augmentation du tonnage mondial, notamment liée à l'augmentation des zones agricoles dans les BRICS (Brésil, Russie, Inde, Chine et Afrique du Sud) (source FAO). En 26 ans, la consommation totale de pesticides dans le monde a doublée (**Figure 55**).

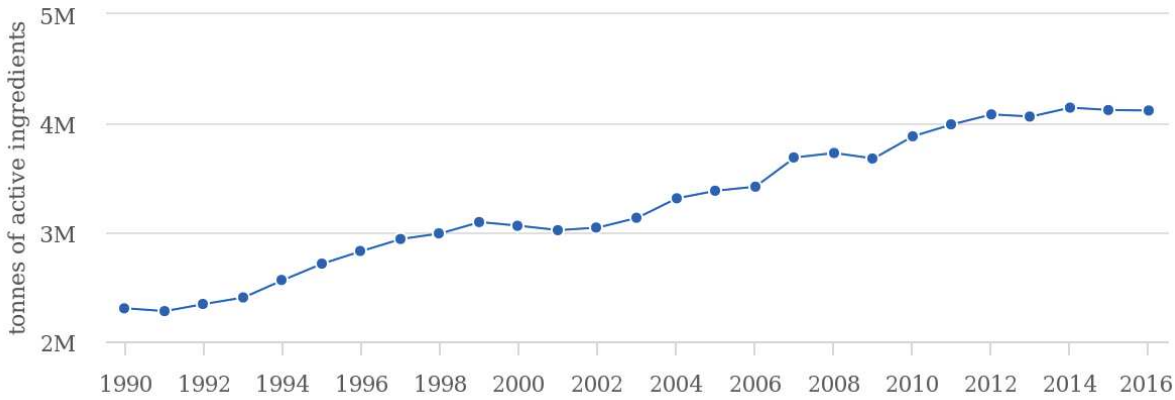


Figure 55. Evolution du tonnage mondial des produits phytosanitaires vendus entre 1990 et 2016 (source FAOstat).

Au niveau mondial, la France se situe au septième rang des 10 pays les plus gros utilisateurs de pesticides, en tonnes de substances actives en 2016 (**Figure 56**).

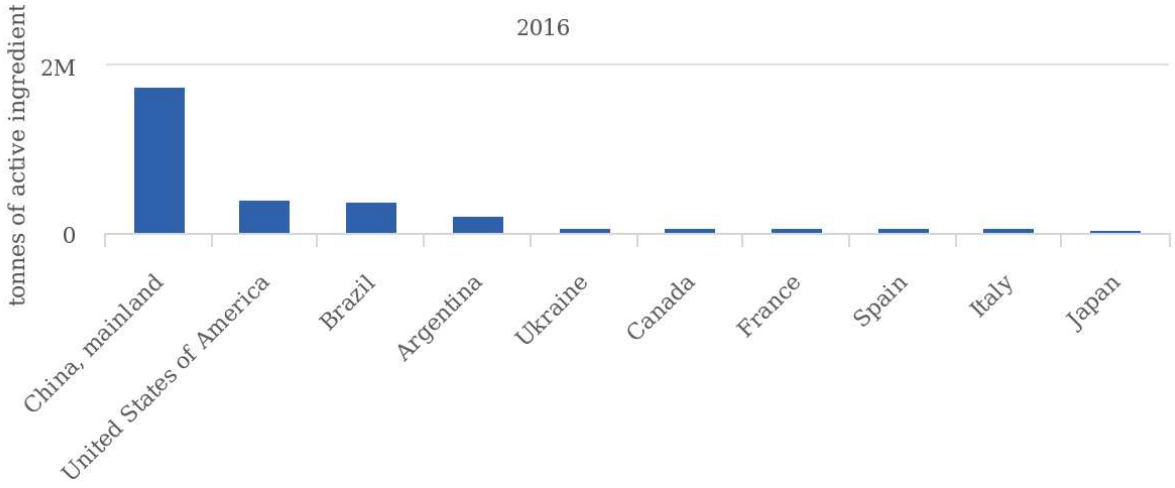


Figure 56. Classement des 10 pays achetant le plus de pesticides dans le monde en 2016. Nombre de tonnes de substances actives utilisées en 2016 : Chine : 1,8M ; USA : 407 779, Brésil : 377 176, Argentine : 207 706, Ukraine : 78 201, Canada : 75 318, France : 71 951, Espagne : 61 895, Italie : 60 259 et Japon: 51 006 (source FAOstat).

On remarque que la Chine est de loin le pays qui utilise le plus de pesticides avec 1,8 M de tonnes en 2016 soit 4 fois plus que les USA (0,4 M) qui sont au deuxième rang mondial. Cette énorme différence est exclusivement liée à une utilisation massive de pesticides par hectare en Chine par rapport aux USA (13,06 kg/ha versus 2,63 kg/ha) pour des surfaces totales agricoles comparables (528 M d'hectares pour la Chine et 406 M d'hectares pour les USA) (Source : FAOstat).

Les données présentées ci-dessus sont principalement issues de lobbys de l'agroalimentaire (UIPP) ou de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) qui présentent quasi exclusivement des données sur des substances actives de synthèse. Dans certains pays occidentaux commence à émerger une transition vers l'utilisation de pesticides d'origine « biologique » extrait de plantes pour lesquels on ne dispose que de peu de données. D'autre part la « chimie verte » est en plein essor. Elle vise à développer des procédés chimiques plus respectueux de l'environnement, à dériver des produits à partir de molécules extraites de plantes, et ainsi générer des produits sensés être

plus « inoffensifs » (Campos et al., 2016). Dans les années 90, l'arrivée de nouvelles technologies telles que le criblage à haut débit et la spectrométrie de masse a promu l'identification de nouvelles molécules extraites de plantes et la production de molécules dérivées aux propriétés améliorées (Benelli et al., 2017; Murugan et al., 2016). Cependant, l'appelation « biologique » ou « naturelle » de ces produits phytosanitaires ne veut pas nécessairement dire inoffensif pour la santé humaine. C'est le cas par exemple de la roténone, isolée en 1902 à partir d'une plante (*Paraderris Elliptica* ou *Roten* en japonnais) puis commercialisée comme pesticide biologique. Elle a été retirée du marché européeen en 2008 et du marché français en 2011, pour ses effets neurotoxiques qui sont plus amplement abordés dans la partie **III.1.** de ce chapitre. Le commerce de la « chimie verte » représente pour l'instant peu de parts de marché mais des prévisions réalisées en 2013 ont suggéré que d'ici 2020 le marché des biopesticides pourrait représenter 5 milliards de dollars (**Figure 57**).

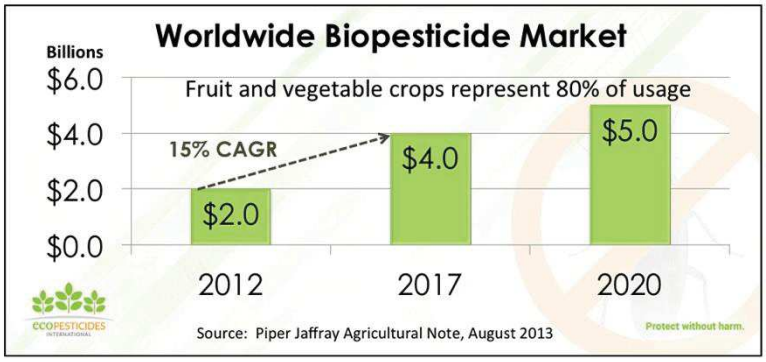


Figure 57. Prévisions d'évolution du marché des biopesticides (source : ecopesticides.net).

I.2. Les différentes classes de pesticides

Il existe trois grandes classes de produits phytosanitaires : les fongicides, les herbicides et les insecticides qui sont encadrés par le règlement du Parlement Européen CE n°1107/2009 relatif à la mise sur la marché des produits phytosanitaires (abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE).

➔ ***Les fongicides***

Les fongicides sont des substances utilisées pour limiter ou éliminer le développement de champignons parasites sur les plantes cultivées et les fruits. Ces champignons peuvent entrainer des pertes importantes des récoltes. Ils peuvent également affecter la qualité des récoltes en favorisant les mycotoxines, toxiques pour l'Homme, ou entrainer des modifications organoleptiques comme la présence de *Botrytis Cinerea*, provoquant la pourriture des fruits.

Les modes d'actions variés des fongicides vont perturber le développement des champignons en inhibant des fonctions biologiques indispensables telles que :

- la respiration mitochondriale
- la synthèse des stérols, acides aminés, acides nucléiques et les glucides
- la division cellulaire

Certains fongicides, d'origine minérale ou de synthèse peuvent avoir des effets multiples et inhiber plusieurs voies métaboliques en même temps. Ces composés doivent être utilisés avec beaucoup de précautions et ne doivent pas avoir d'effets néfastes pour les manipulateurs et les consommateurs. En effet, ces produits phytosanitaires ciblent des processus biologiques présents également chez l'Homme et les mammifères et peuvent aussi se révéler toxiques chez ces espèces.

En France, les fongicides sont les produits phytosanitaires les plus utilisés pour le traitement de la vigne, des produits fruitiers et maraîchers. Leur marché représentait presque 32 000 tonnes en 2016 (**Figure 58**) plaçant la France au deuxième rang mondial des plus grands utilisateurs de ces substances.

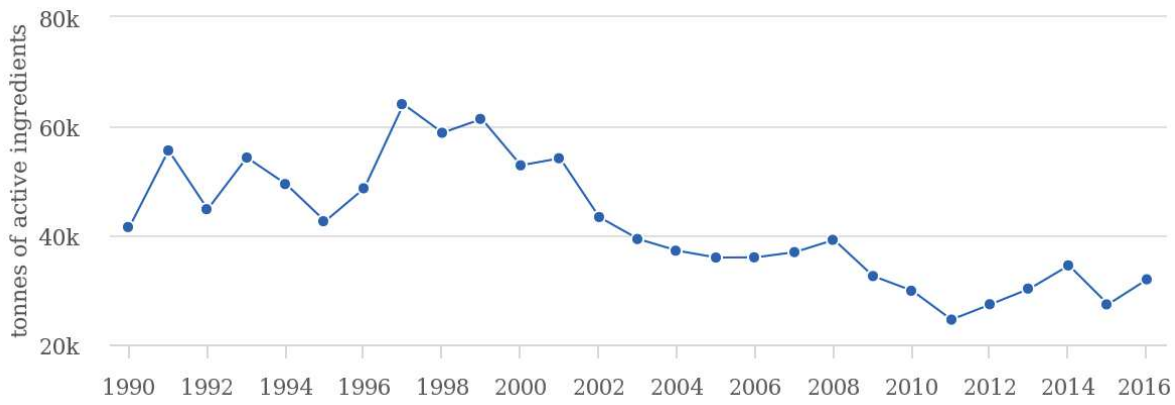


Figure 58. Evolution du tonnage de fongicides vendu en France entre 1990 et 2016 (source FAOstat).

➔ ***Les herbicides***

Les herbicides sont des substances phytosanitaires utilisées pour lutter contre la croissance ou la destruction de mauvaises herbes aussi appelées plantes adventices. La lutte contre les plantes adventices s'intensifie car elles entrent en compétition avec les cultures pour les ressources organiques des sols mais aussi pour l'eau et la lumière.

Les sites d'actions des herbicides se trouvent au niveau des feuilles ou des racines perturbant plusieurs processus biologiques de la plante. Selon le comité d'action sur la résistance aux herbicides (HRAC, www.hracglobal.com) qui classe les herbicides en fonction de leur mode d'action, ces substances peuvent inhiber différents processus biologiques :

- la synthèse de lipides et d'acides aminés
- la photosynthèse
- la synthèse des caroténoïdes
- la division cellulaire
- la synthèse de cellulose

En France, le marché des herbicides représentait 30 000 tonnes en 2016 (**Figure 59**), plaçant le pays au huitième rang mondial des plus grands utilisateurs de ces substances (source : FAOstat). Il est à noter que depuis 2010 le marché des herbicides a augmenté.

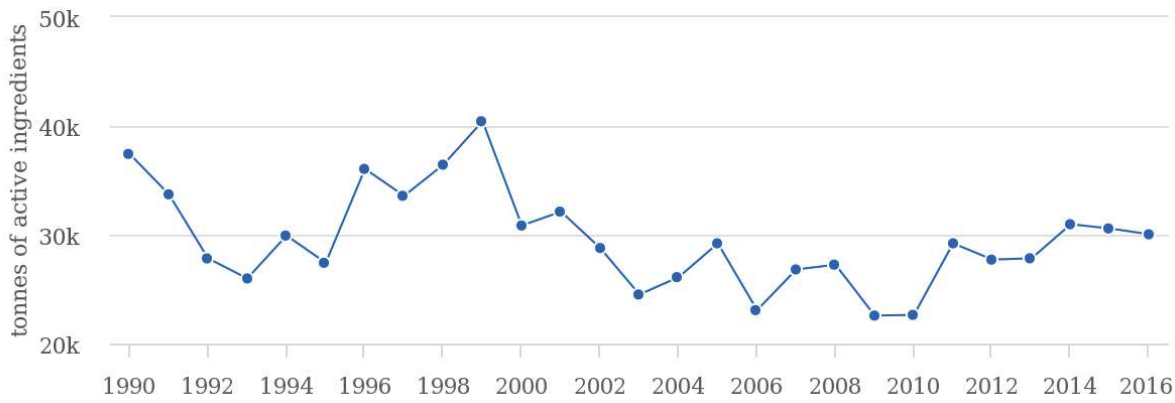


Figure 59. Evolution du tonnage d'herbicides vendu en France entre 1990 et 2016 (source FAOstat).

➔ ***Les insecticides***

Les insecticides sont des substances actives permettant de lutter contre les insectes ravageurs de cultures, leurs larves et/ou leurs œufs. Dans ce groupe de substances actives, il existe trois grandes familles : les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes. De nos jours, peu d'insecticides sont utilisés dans les productions agricoles car il existe peu de molécules commercialisées. En effet, de nombreuses molécules actives de la famille des organophosphorés et des carbamates ont été retirées du marché à cause de leur toxicité envers l'Homme, comme par exemple l'implication du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) dans les lymphomes non-hodgkiniens (INSERM, 2013) ou encore du carbofuran dans l'inhibition de l'acétylcholinestérase (Bertrand et al., 1998).

Les insecticides peuvent agir à différents niveaux pour lutter contre les insectes ravageurs. Ils peuvent avoir :

- une action sur le système nerveux en inhibant les canaux ioniques responsables de l'influx nerveux ou en perturbant les synapses et les neurotransmetteurs
- une action d'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale
- une action sur la croissance des insectes

En France, le marché des insecticides représentait en 2016 (**Figure 60**) une très faible part des produits phytosanitaires avec 4 460 tonnes. Cependant, nous pouvons constater une augmentation du tonnage depuis 2010 (1 033 tonnes) qui pourrait être lié notamment à la chasse du moustique tigre et autres insectes, porteurs de virus et maladies.

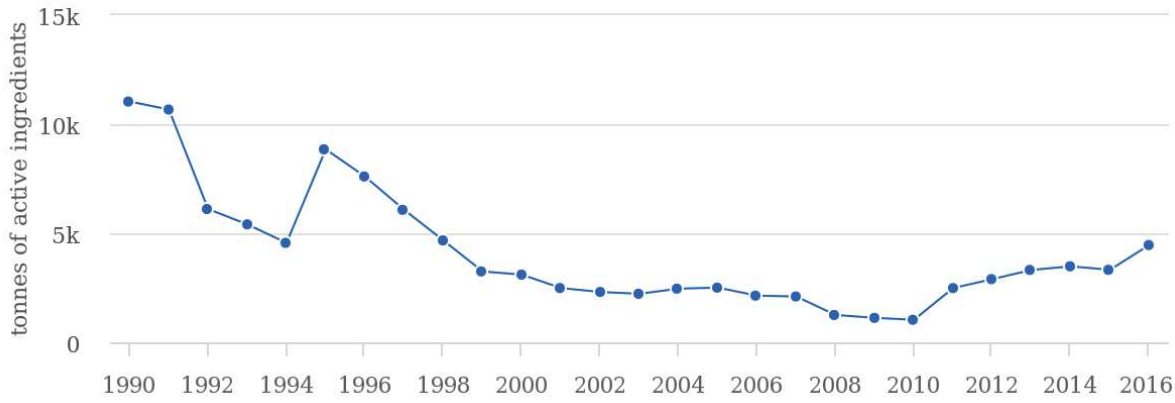


Figure 60. Evolution du tonnage d'insecticides vendu en France entre 1990 et 2016 (source FAOstat).

I.3. Tests toxicologiques et limites règlementaires

Avant toute commercialisation, chaque substance active doit faire l'objet d'une autorisation de mise sur le marché. Pour cela, des essais toxicologiques sur ces molécules doivent être conduits en laboratoire pour déterminer la toxicité et, par la suite, les doses à appliquer. Ces essais sont soumis à des règles dictées par l'UE par le règlement REACH (Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals) entré en vigueur en juin 2007. Ce règlement permet de protéger la santé humaine et l'environnement contre les risques des substances chimiques tout en permettant une compétitivité des industries chimiques. Ce règlement impose aux entreprises de prouver, identifier et gérer les risques liés aux substances chimiques qu'elles fabriquent et commercialisent. Les données toxicologiques produites par les entreprises sont envoyées à l'ECHA (European CHemical Agency) qui évalue la conformité, puis sont étudiées et approuvées par la Comission Européenne. Concernant les produits phytosanitaires, les tests toxicologiques permettent d'évaluer la toxicité des substances actives et les risques d'intoxication pour l'Homme et de déterminer différents

paramètres tels que la toxicité aiguë, la toxicité chronique, la dose journalière admissible et la limite maximale de résidus.

I.3.1. Toxicité aiguë (DL50)

La toxicité aiguë d'une substance active est mesurée par la toxicité induite suite à l'administration unique et massive d'un produit à un animal d'une espèce donnée. Elle permet la détermination de la dose létale médiane (DL50) ou de la concentration létale médiane (CL50) selon la voie d'administration. La DL50 se définit comme la dose de la substance active administrée entrainant la mort de 50% des animaux testés. Plusieurs voies d'exposition peuvent être utilisées : l'ingestion, la voie cutanée ou l'inhalation ; pour cette dernière on parlera de CL50. La DL50 s'exprime en mg de substance par kg d'animal ou en mg par m^3 pour la CL50. Plus la valeur obtenue de DL50 ou de CL50 est petite plus le produit est toxique. Les expériences de toxicité aiguë ont été mises en place pour mimer les effets possibles d'une intoxication de personnes manipulant ces substances actives.

Depuis 2002, la DL50 ou la CL50 des nouvelles molécules commercialisées est calculée approximativement avec peu d'animaux (5 à 9) suivant les méthodes préconisées par l'OCDE (Hartung, 2007). La valeur obtenue de DL50 ou CL50 est une estimation de la toxicité aiguë (ETA) qui permettra de classer les substances en différentes catégories selon le danger (1 à 4) et en fonction de leur toxicité (**Tableau 7**) (règlement n° 1272/2008 du 16/12/08 de la commission européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges).

Voie d'exposition	Catégorie 1	Catégorie 2	Catégorie 3	Catégorie 4
Orale (mg/kg de poids corporel)	ETA ≤ 5	5 < ETA ≤ 50	50 < ETA ≤ 300	300 < ETA ≤ 2 000
Cutanée (mg/kg de poids corporel)	ETA ≤ 50	50 < ETA ≤ 200	200 < ETA ≤ 1 000	1 000 < ETA ≤ 2 000
Gaz [ppmV (1)]	ETA ≤ 100	100 < ETA ≤ 500	500 < ETA ≤ 2 500	2 500 < ETA ≤ 20 000
Vapeurs (mg/l)	ETA ≤ 0,5	0,5 < ETA ≤ 2,0	2,0 < ETA ≤ 10,0	10,0 < ETA ≤ 20,0
Poussières et brouillards (mg/l)	ETA ≤ 0,05	0,05 < ETA ≤ 0,5	0,5 < ETA ≤ 1,0	1,0 < ETA ≤ 5,0

(1) La concentration des gaz est exprimée en partie par million de volume (ppmV).

Tableau 7. Classement des substances en différentes catégories de danger et estimation de la toxicité aiguë (ETA) en fonction des voies d'exposition (extrait du règlement n° 1272/2008 du 16/12/08 de la commission européenne).

Les substances dont l'ETA se situe dans l'intervalle de valeurs les classant dans les catégories de danger 1 ou 2 signifient qu'en cas de contact cutané, d'ingestion ou d'inhalation, celles-ci peuvent provoquer la mort de l'utilisateur. La catégorie de danger 3, alerte l'utilisateur sur la toxicité de la substance active, alors que la catégorie 4 avertie plutôt d'une nocivité comme par exemple des irritations.

I.3.2. Toxicité chronique (NOAEL)

La toxicité chronique d'une substance active est déterminée par une exposition répétée à une substance à plus ou moins faible dose. Les effets de cette exposition sont mesurés sur le

long terme, sur une période pouvant aller de quelques semaines à plusieurs années, pendant et après le traitement.

Contrairement aux tests de toxicité aiguë, les tests de toxicité chronique ont pour but de déterminer la dose maximale pour laquelle la substance active n'induit pas d'effets sur la santé (Dorato and Engelhardt, 2005). Cette valeur est appelée la dose sans effet nocif observable (DSENO) ou « Non observable adverse effect level » (NOAEL) en anglais. Le calcul du NOAEL permet d'étudier le caractère cancérigène et reprotoxique d'une substance active.

I.3.3. Dose journalière admissible (DJA)

A partir de la valeur du NOAEL, un nouveau paramètre peut être calculé : la dose admissible journalière (DJA). Cette dose correspond à la quantité d'une substance active que peut théoriquement ingérer quotidiennement un individu sans risques pour la santé. La DJA s'exprime en mg de substance par kg de masse corporelle. Il est à noter que la DJA n'est calculée que pour une seule substance active et ne tient pas compte de possibles effets synergiques lorsque cette substance est associée à d'autres molécules.

Le calcul de la DJA est basé sur la valeur du NOAEL. Ainsi pour obtenir cette valeur, il faudra diviser la valeur du NOAEL par 10 pour prendre en compte la variabilité du passage de l'animal à l'Homme et de diviser par un deuxième facteur 10, pour tenir compte des variabilités interindividuelles. Ainsi la DJA, de manière générale, est égale au NOAEL divisé par 100.

I.3.4. Limite maximale de résidus (LMR)

La limite maximale de résidus (LMR) est la concentration règlementaire de résidus de pesticides, retrouvés dans ou sur les aliments, au-delà de laquelle la commercialisation des

produits alimentaires n'est plus autorisée. La valeur de la LMR est déterminée pour que la quantité de résidus de pesticides ingérés quotidiennement par l'alimentation ne dépasse pas la DJA. La LMR s'exprime en mg de substance active par kg de produit et pour un même pesticide peut varier selon l'aliment pris en compte. Théoriquement, la LMR est utilisée dans le cadre des bonnes pratiques agricoles pour déterminer les doses et le nombre d'applications par saison ainsi que le délai avant récolte.

II. Les sources d'exposition aux pesticides

Il existe deux principales voies d'exposition aux pesticides. La première appelée exposition « primaire » concerne les personnes manipulant directement les substances actives (industriels et agriculteurs) et sont donc potentiellement exposées à de fortes doses sur des périodes plus ou moins longues et variables selon la fréquence d'application des produits. La deuxième voie d'exposition dite « secondaire », concerne l'ensemble de la population, qui se retrouve exposée à des résidus de pesticides, à de faibles doses mais sur de très longues périodes. Ces résidus proviennent de la pollution de l'environnement (sols, eaux, air) et de l'ingestion de nourriture contaminée par les pesticides. Dans cette partie, nous développerons uniquement les voies d'expositions secondaires aux pesticides.

Les expositions secondaires aux pesticides sont liées au cycle des produits phytosanitaires (**Figure 61**). Dès leur application en milieu agricole, majoritairement sous forme de pulvérisations, les pesticides vont interagir avec l'environnement proche : l'atmosphère, la culture traitée et les sols. Les pesticides sous forme d'aérosols vont pouvoir diffuser dans l'atmosphère et selon leurs propriétés physico-chimiques persisteront plus ou moins longtemps, en fonction des paramètres atmosphériques (température, pression, indices U.V., pluies,…). En conditions dépressionnaires, les substances en suspension dans l'air vont retomber sur les sols. Lors de l'épandage, une partie des pesticides utilisés va se retrouver en

contact direct avec les sols et leur demi-vie dépendra des conditions du milieu (composition des sols, pH, présence de métaux,…) et de son taux d'adsorption. Lors de pluies, le ruissellement de l'eau sur le sol va déplacer les composés vers les cours d'eau mais aussi vers les nappes phréatiques par leur infiltration dans les sols. La pollution des cours d'eau et des nappes souterraines conduit à la présence de pesticides dans l'eau potable consommée par la population générale.

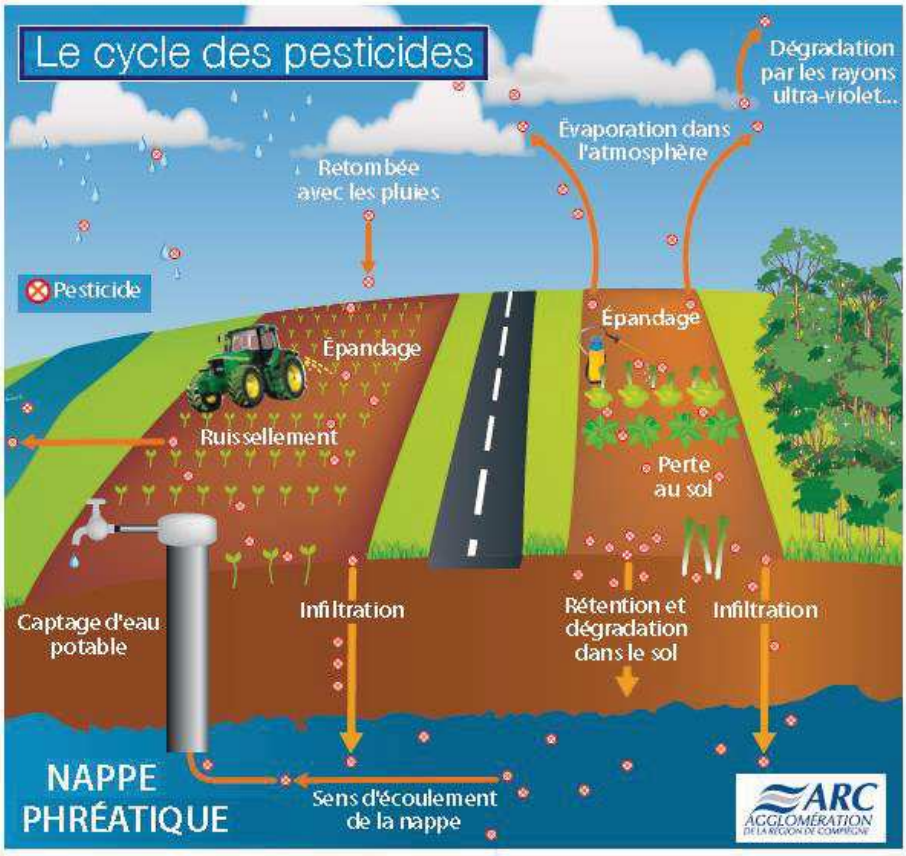


Figure 61. Schématisation du cycle des pesticides (extrait de www.pesticides.igepac.over-blog.com).

Un organisme public, l'observatoire des résidus de pesticides (ORP) géré par l'ANSES, évalue régulièrement l'exposition de la population française aux résidus de pesticides. L'ORP a mené une étude sur l'exposition de la population générale aux pesticides entre 2006 et 2008. Leur rapport conclut que les pesticides sont présents dans l'ensemble des compartiments de l'environnement (sols, eaux, air) et dans l'alimentation. Cette pollution à

bas bruit serait retrouvée sur l'ensemble du territoire français,à des niveaux variables en fonction des zones testées (ANSES, 2010a).

II.1. Pollution de l'air

L'épandage libère les produits phytosanitaires sous forme d'aérosols et selon certaines études jusqu'à 50% des pesticides n'atteignent pas leur cible (van der Werf, 1996) et peuvent persister dans l'atmosphère (Scholtz et al., 2002). La contamination de l'air par ces pesticides dépend de nombreux facteurs dont la volatilité de la substance active, des conditions météorologiques mais aussi de la technique d'épandage utilisée (**Figure 62**). Leur persistance dans l'atmosphère dépend des propriétés physico-chimiques de la molécule et de leur photo-réactivité. Par exemple, Li et ses collaborateurs ont recherché la présence de pesticides de la famille des organochlorés, pendant 1 an, dans l'atmosphère de Guangzhou et de Hong Kong (Chine), et ont montré que 3 pesticides appartenant à cette famille étaient persistants dans l'atmosphère et pouvaient être transportés sur de très longues distances (Li et al., 2007).

Figure 62. Epandage aérien pouvant conduire à la pollution de l'atmosphère (extrait de www.lelotenaction.org).

De nombreuses études ont mis en évidence la présence et la persistance dans l'atmosphère de certains produits phytosanitaires, dont la grande majorité appartient à la famille des organochlorés et sont interdits depuis les années 70. C'est le cas par exemple du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) encore détecté dans de nombreux pays, comme la Chine (Li et al., 2007), les USA (Gioia et al., 2005), le Canada (Hung et al., 2005), la France (Scheyer et al., 2005) ou encore la Corée du Sud (Park et al., 2011). Les concentrations mesurées sont de l'ordre du pg/m^3. On retrouve aussi des résidus de pesticides commercialisés et utilisés sur notre territoire. C'est le cas du folpel, du kresoxim-méthul et du trifloxystrombine retrouvés en Alsace (Schummer et al., 2010) ou encore du trifluraline, de l'acétochlore ou de la pendiméthaline dans le centre de la France (Coscollà et al., 2010). Ces études ont fait un lien entre le moment des épandages et la contamination atmosphérique avec des pics mesurés de l'ordre de quelques dizaines de ng/m^3.

Les réglementations française et européenne n'ont défini aucune valeur règlementaire concernant la contamination de l'atmosphère par les pesticides. Même si d'autres composés font l'objet d'une surveillance (métaux lourds, particules fines dont celles émises par les moteurs diesels, ozone,…), aucun programme n'a été mis en place sur le territoire français pour suivre l'évolution des pesticides dans l'atmosphère. Cependant, en 2000, les associations agréées de surveillance de la qualité de l'air (AASQA) ont réalisé les premières mesures de la présence des pesticides dans l'air. En 2005, les données accumulées par l'AASQA ont été compilées dans une base de données gérée par l'INERIS (institut national de l'environnement industriel des risques).

En 2010, l'ANSES a initié la mise en place d'un plan de surveillance des pesticides dans l'atmosphère et a édité un rapport de synthèse dressant l'état des lieux de la contamination française (ANSES, 2010b). Dans ce rapport, l'ANSES a montré que plusieurs pesticides étaient retrouvés à de fortes concentrations ($> 10\ ng/m^3$) tout le long de l'année

entre 2001 et 2006, dont le chlorpyriphos-éthyl (maximum détecté : 97,76 µg/m^3), le cyprodinil (maximum détecté : 35,9 µg/m^3) ou encore le captane (maximum détecté : 35,37 µg/m^3) (ANSES, 2010a, 2010b).

II.2. Pollution des sols

Tout comme la pollution de l'atmosphère aucune réglementation française ou européenne, ne fixe de seuil de teneur en pesticides dans les sols. En France, ce n'est qu'en 2001, que le groupement d'intérêt scientifique des sols (GIS sol) a été créé pour répertorier des données sur la contamination du territoire français. Ce groupement est composé par différents ministères, l'INRA (institut national de la recherche agronomique), l'ADEME (agence de l'environnement et de la maitrise de l'énergie), l'IRD (institut de recherche pour le développement) et l'IFN (institut forestier national).

Les pesticides les plus fréquemment identifiés dans les sols sont, comme pour la pollution atmosphérique, des composés appartenant à la famille des organochlorés. En France, le plus étudié est la chlordécone utilisée dans les Antilles françaises principalement entre 1972 et 1978 pour traiter les plantations bananières et fût bannie du marché des pesticides en 1993. Des études conduites par la direction régionale de l'environnement de Fort-de-France et la direction santé et développement social de la Martinique ont révélé en 2001 la présence de chlordécone dans les sols et les rivières (DIREN, 2001; DSDS, 2001; Multigner et al., 2016). Etant donné sa persistance dans les sols liée à une demi-vie longue (3,8 à 46 ans selon les conditions), des études ont estimé qu'il faudrait entre 10 et 500 ans avant que la chlordécone ne soit plus détectée sur le sol de la Martinique (Cabidoche et al., 2009).

Des études menées dans des domaines viticoles de Galice (Espagne), ont montré la présence de fortes concentrations en fongicides dans les sols en post-traitement des vignes. Ainsi, du metalaxyl et de la procymidone ont été retrouvés à des concentrations pouvant

atteindre 1000 µg/kg, ou encore du cyprodinil et du fludioxonil de l'ordre de 400 µg/kg (Bermúdez-Couso et al., 2007; Rial-Otero et al., 2004).

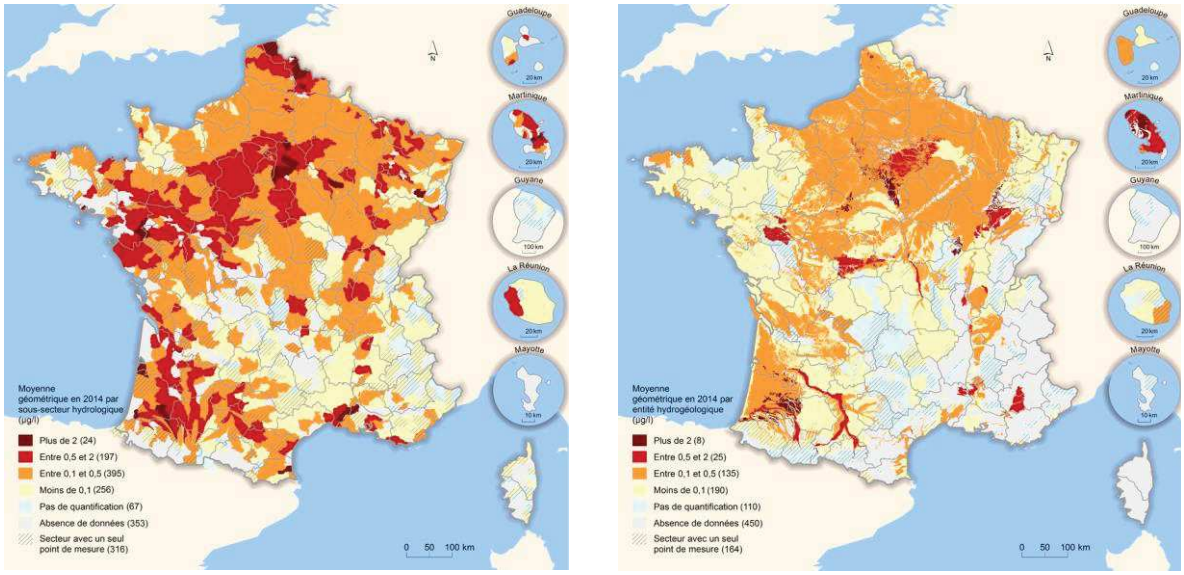
II.3. Pollution des eaux

Les pesticides déposés au niveau des sols après épandage peuvent, après une pluie, être lessivés vers les eaux de surface ou les eaux souterraines. Contrairement à l'atmosphère et aux sols, il existe des règlementations concernant la présence des produits phytosanitaires dans l'eau. Ainsi, selon la directive européenne 98/83 les limites à ne pas dépasser sont :

- 0,1 µg/L par substance active pour les eaux ayant un traitement simple. Exceptions pour l'aldrine, l'heptachlore et l'heptachlorepoxyde dont la limite est fixée à 0,03 µg/L.
- 0.5 µg/L pour le total des substances contenues dans l'eau
- pour des concentrations supérieures à 2 µg/L, les eaux ne peuvent plus être consommées par les populations

La pollution des cours d'eaux et des eaux souterraines est actuellement très surveillée sur le territoire français. Les données sont publiées chaque année par le Ministère de la Transition écologique et solidaire et sont collectées à partir de 3052 points de mesure pour les cours d'eau et de 2121 points de mesure pour les eaux souterraines (en 2014). Le rapport des données de 2014 mentionne que sur les 700 pesticides surveillés, au moins un d'entre eux est quantifié dans 87% des mesures dans les rivières et dans 73% des eaux souterraines. Pour les cours d'eau, une moyenne de 17 pesticides a été quantifiée par point de mesure (avec un maximum de 89) et de 5 pour les eaux souterraines (maximum de 39) (source : www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/surveillance-pesticides-eaux-françaises.fr). Parmi les pesticides quantifiés on retrouve des métabolites (produits de dégradation) (environ

10%) et près de 50% des substances détectées sont des pesticides interdits lors des analyses. A partir de l'ensemble des données collectées, une carte de la pollution des cours d'eaux et des eaux souterraines est réalisée chaque année (**Figure 63**). On peut observer sur les cartes de 2014 que la présence des pesticides est généralisée à l'ensemble du territoire et seules les zones montagneuses (Pyrénées, Alpes, Massif Central) sont épargnées. Les zones les plus contaminées sont les grandes plaines (petite et grande Beauce) où la culture y est intensive (blé, maïs, betteraves) ainsi que les zones d'arboriculture (vallée du Rhône) et de viticulture (Bordelais, Val de Loire). Les eaux souterraines sont, de manière générale, moins polluées que les cours d'eaux.



Eaux de surface par sous-secteur hydrographique de la BD Carthage

Eaux souterraines par ent té hydrogéologique du niveau supérieur de la BD Lisa

Figure 63. Concentration moyenne en pesticides, en 2014 pour les eaux de surface (à gauche) et les eaux souterraines (à droite) en France (extrait de www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr).

L'ANSES, dans son rapport de 2013 sur l'évaluation des risques liés aux résidus de pesticides dans l'eau de distribution (eau potable), a établi un classement des pesticides les plus retrouvés (ANSES, 2013) (**Figure 64**). Les principaux polluants retrouvés dans l'eau de distribution sont l'atrazine et ses métabolites.

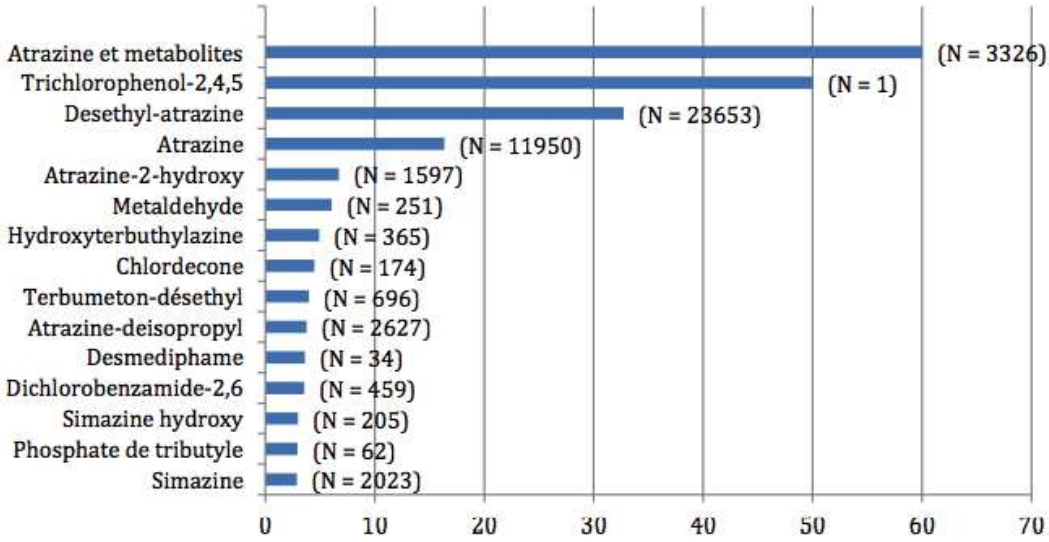


Figure 64. Liste des 15 pesticides ou résidus de pesticides les plus fréquemment détectés dans l'eau potable (%). N= nombre d'analyses quantifiées (ANSES 2013).

II.4. Résidus de pesticides dans les aliments

Comme expliqué précédemment, les limites maximales de résidus (LMR) fixent la quantité maximale d'un pesticide sur un type de fruit ou légume. Cette valeur est calculée de façon à ce que la DJA (dose journalière admissible) ne soit pas dépassée.

En 2018, l'EFSA (agence européenne de sécurité des aliments) a publié un rapport sur une étude menée en 2016 concernant les résidus de pesticides dans l'alimentation européenne. Cette étude rassemble les résultats obtenus dans les 28 états membres de l'UE (EFSA, 2018). Ce rapport présente les analyses conduites sur 84 657 échantillons pour lesquels 791 pesticides ont été testés. En moyenne, pour un type d'aliment donné, 230 résidus de pesticides ont été retrouvés. Les conclusions de ce rapport sont (EFSA, 2018) :

- 96,2% des échantillons analysés ont une teneur en résidus de pesticides ne dépassant pas les LMR fixées par l'UE
- 50,7% des échantillons ont une concentration inférieure à la limite de quantification pour les substances testées
- 45,5% des échantillons contenant des résidus ont une concentration supérieure à la limite de quantification mais ne dépassent pas les LMR

- 3,8% des échantillons ont une concentration en pesticides supérieure aux LMR

Ce rapport présente aussi les résultats d'une étude quantifiant les résidus de pesticides sur 11 aliments fréquemment consommés dans l'UE (12 168 échantillons analysés dans lesquels 165 pesticides ont été recherchés). A titre d'exemple, j'ai choisi de présenter les résultats obtenus pour les fraises.

L'EFSA a analysé 1 206 échantillons de fraises : 273 (22,6%) avaient une concentration en pesticides inférieure à la limite de quantification et 933 (77,4%) avaient un ou plusieurs résidus de pesticides quantifiables. Parmi ces 933 échantillons, 771 possédaient de multiples résidus de pesticides avec un maximum de 16 résidus (**Figure 65**).

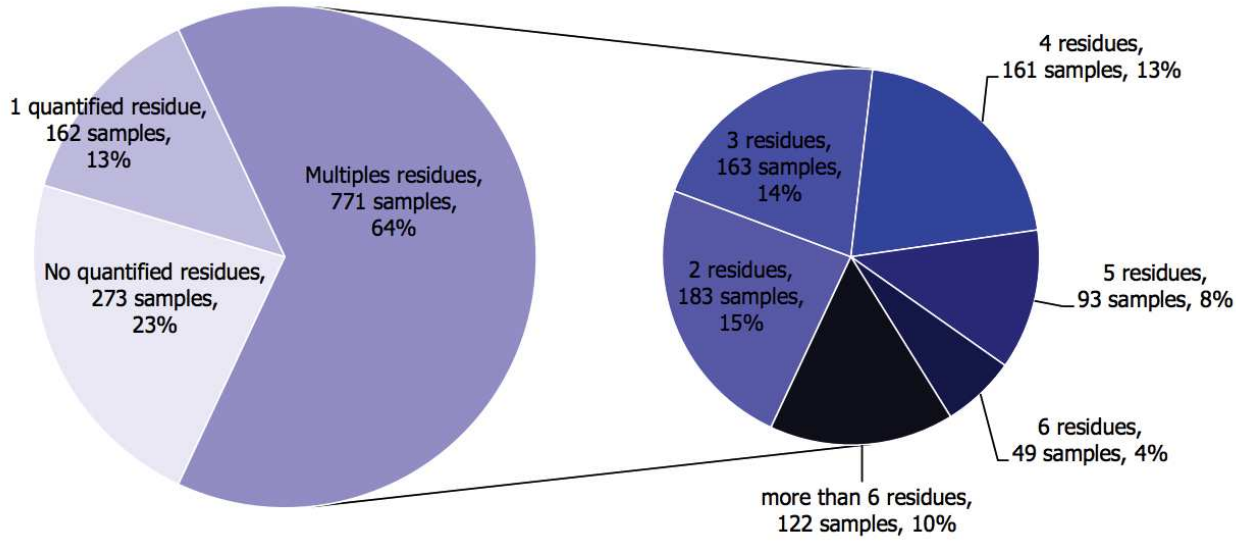


Figure 65. Résidus de pesticides quantifiés sur les fraises (selon EFSA, 2018).

Au total, dans les 12 168 échantillons de fraises testés, 76 pesticides différents ont été identifiés à des concentrations supérieures ou égales à la limite de quantification. Les pesticides les plus fréquemment retrouvés sont des fongicides tels que le cyprodinil, le fludioxonil ou le boscalid. Dans la **Figure 66**, sont présentés les 50 résidus de pesticides et leur fréquence de quantification à des doses inférieures ou supérieures aux LMR. Les fréquences de quantification des résidus de pesticides à des doses inférieures aux LMR sont

représentées en bleu. Les résidus quantifiés à des doses supérieures aux LMR sont représentées en orange (EFSA, 2018). Il est intéressant de noter que sur les 50 résidus de pesticides présentés, 15 ont été quantifiés à des doses supérieures aux LMR, même si la fréquence de détection reste peu importante (> 1%). Ainsi, le cyprodinil est le résidu de pesticide le plus fréquemment détecté dans les fraises avec un pourcentage de quantification de 35%.

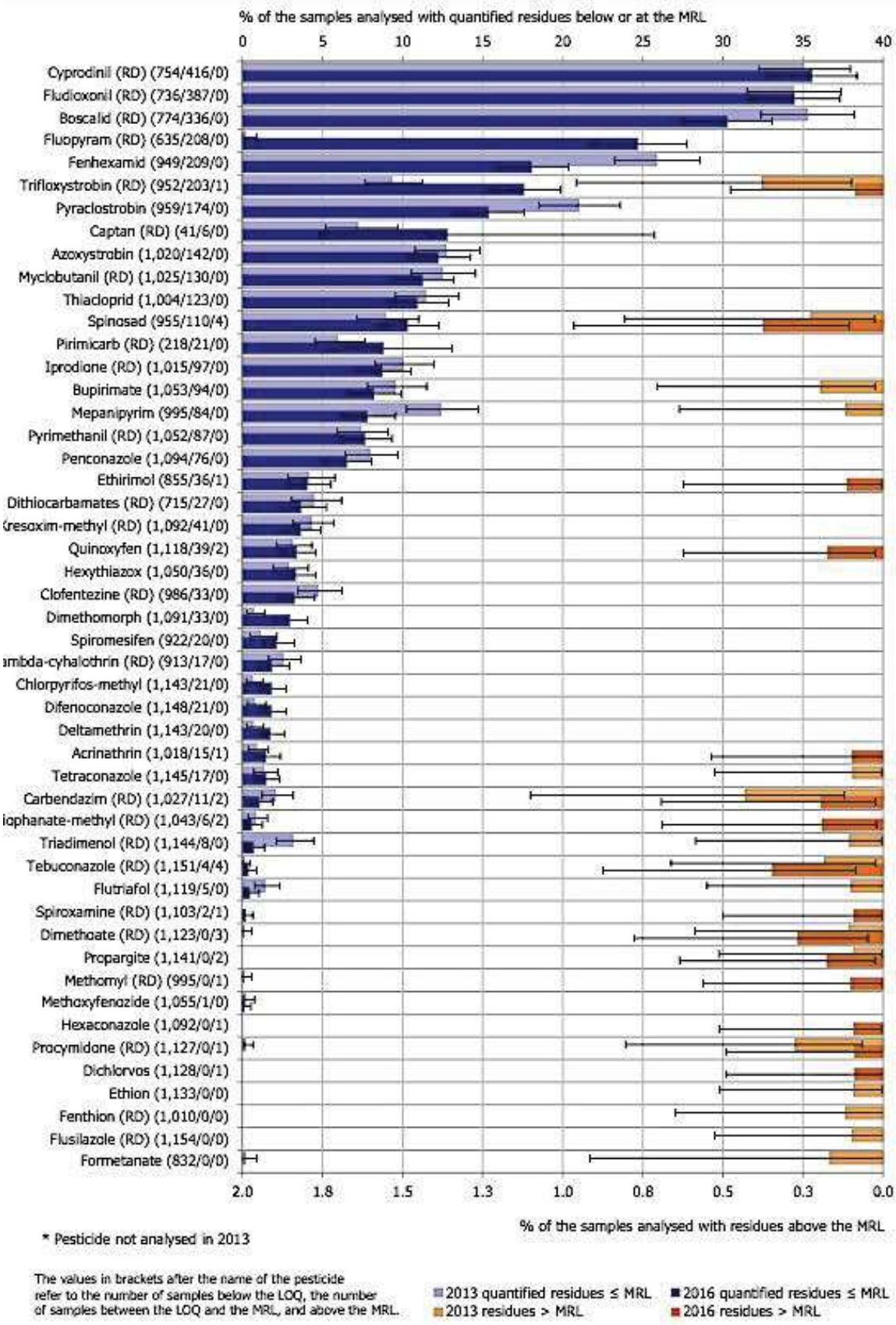


Figure 66. Echantillons de fraises contenant des résidus de pesticides inférieurs ou égaux aux LMR (bleu) ou supérieurs aux LMR (orange) (selon EFSA, 2018).

Des modélisations, prenant en compte le nombre de résidus de pesticides dans les 11 aliments les plus consommés en Europe, ont permis d'évaluer la toxicité à court et à long terme liée à l'exposition aux résidus de pesticides. Le rapport conclu que la probabilité d'avoir des effets délétères sur la santé consécutif à l'exposition aux résidus de pesticides est faible. Cependant, pour un nombre limité d'échantillons dépassant les LMR et contenant de multiples résidus de pesticides, un risque ne peut être complètement exclu (EFSA, 2018).

Toutefois, il est à noter que dans les études conduites par l'EFSA le calcul des fréquences de détection des résidus de pesticides exclut les pesticides ayant des doses inférieures ou égales à leur limite de quantification (LOQ). Tout résidu de pesticide détecté mais non quantifié, situé entre la limite de détection (LOD) et la LOQ, n'est pas comptabilisé dans l'étude. Ainsi, les chiffres avancés par l'EFSA sous-estiment le nombre de résidus de pesticides retrouvés dans l'alimentation européenne.

D'autres études, moins récentes, confirmaient déjà la présence de nombreux résidus de pesticides dans l'alimentation. C'est le cas par exemple de l'étude TDS-2 (second french total diet study) conduite par l'ANSES en 2011, réalisant un état des lieux des résidus de pesticides dans l'alimentation française (ANSES, 2011). Dans cette étude, 20 000 produits alimentaires français ou vendus en France ont été analysés et 445 substances d'intérêt ont été recherchées. Les conclusions de cette étude mettent en avant l'exposition de la population française à de multiples résidus de pesticides ainsi qu'à d'autres substances telles que les métaux ou l'acrylamide. Tout comme pour l'étude de l'EFSA, l'ANSES n'a trouvé que peu d'aliments pour lesquels les LMR étaient dépassées pour une substance donnée. Cependant, l'organisme français souligne le fait qu'un risque pour la santé pourrait être associé chez les populations ayant une consommation élevée d'un aliment ou d'un groupe d'aliments. L'ANSES préconise d'avoir une alimentation diversifiée et équilibrée (ANSES, 2011).

Dans la littérature scientifique, de nombreuses études rapportent la présence de résidus de pesticides dans différents produits alimentaires notamment les fruits et les légumes. La très grande majorité de ces études sont réalisées dans le but de trouver de nouvelles techniques de détection des résidus et/ou d'améliorer les techniques existantes en abaissant les limites de quantification. Ces études ne seront pas abordées dans cette partie.

D'après les différents rapports présentés ci-dessus nous sommes chroniquement exposés à des résidus de pesticides via notre environnement (eaux, air, sols, alimentation). Même si dans la plupart des cas les limites règlementaires des résidus dans l'eau potable et dans les aliments ne sont pas dépassées, les rapports montrent que nous sommes exposés à un nombre très important de résidus de pesticides. Au final, il est difficile d'évaluer précisément le nombre de résidus de pesticides auxquels nous sommes continuellement exposés, leur quantité et leurs effets. Même si les autorités sanitaires (ANSES, EFSA) concluent dans leurs rapports que le risque pour la santé humaine reste faible vis-à-vis de l'exposition aux résidus de pesticides, à des doses inférieures aux limites règlementaires, aucune donnée épidémiologique n'est connue concernant les effets cumulatifs ou synergiques de l'ensemble de ces molécules.

L'impact des pesticides sur la santé a été clairement établi. Des études épidémiologiques et/ou biochimiques ont montré que certains pesticides peuvent augmenter le risque de développement de certains types de cancers tels que les mélanomes (organochlorés) (Patterson et al., 2016), les leucémies (INSERM, 2013; Vinson et al., 2011), les tumeurs cérébrales (Van Maele-Fabry et al., 2017) ou encore le cancer du sein (DDT) (Cohn et al., 2007). Mais les pesticides peuvent être aussi associés à d'autres problèmes de santé tels que des allergies, des problèmes de reproduction ou des effets perturbateurs endocriniens

(INSERM, 2013; WHO, 1992). Dans son rapport de 1992, l'OMS avait répertorié plus de 3 millions de cas de contamination aux pesticides dans le monde et auraient entrainé la mort de 220 000 personnes (WHO, 1992). Concernant les maladies neurodégénératives, de plus en plus de données sont recueillies sur l'impact des pesticides sur ces pathologies.

III. Impact des pesticides dans les maladies neurodégénératives

III.1. La maladie de Parkinson : cas de référence de l'exposition aux pesticides

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer, touchant 6,2 millions de personnes dans le monde en 2015 (GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2016). Cette pathologie se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire conduisant à des troubles moteurs (tremblements, rigidité, bradykinésie,…) et à une démence (Sveinbjornsdottir, 2016). Au niveau histopathologique, la maladie se caractérise par des dépôts d'une protéine: l'α-synucléine. Tout comme pour la maladie d'Alzheimer les formes familiales de la maladie de Parkinson sont plutôt rares (4-5%) et sont associées à des mutations de 6 gènes différents dont les mutations les plus fréquentes sont sur le gène *LRRK2* (Healy et al., 2008). Les formes sporadiques, plus fréquentes (≈95% des cas) résultent d'un mélange de facteurs de risque génétiques et de facteurs de risque environnementaux (de Lau and Breteler, 2006). Excepté pour les formes familiales de la maladie, l'origine des formes sporadiques est très mal connue. A ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible pour la maladie de Parkinson.

Le lien entre la maladie de Parkinson et les pesticides a d'abord été établi grâce à des études épidémiologiques. La première étude épidémiologique ayant fait ce lien a porté sur 5270 cas de patients atteints de la MP au Québec. Dans cette étude, une analyse a été menée entre le lieu d'habitation des patients et la vente ou l'utilisation de pesticides dans ces zones.

Les résultats ont montré que l'utilisation des pesticides corrélait avec la prévalence des cas de la MP (Barbeau et al., 1987). Parmi les 14 études épidémiologiques entre 1987 et 2015, répertoriées sur Pubmed, qui testent l'association entre pesticides (au sens large) et MP, 8 montrent une corrélation entre ces deux facteurs (Brouwer et al., 2015; Engel et al., 2001) et 6 montrent une absence de corrélation (McCann et al., 1998; Wan and Lin, 2016). Il est donc difficile d'établir un lien épidémiologique clair entre pesticides et MP. Cependant, lorsque les études épidémiologiques ciblent des familles de pesticides ou plus spécifiquement, des substances actives, les associations sont plus nettes et un consensus entre les études est retrouvé. Parmi les différents pesticides identifiés, un lien a pu être établi entre l'exposition à la roténone et au paraquat à de fortes doses et l'apparition de la MP chez les agriculteurs (Ritz et al., 2009; Rosen et al., 2012).

La roténone est un pesticide d'origine végétale utilisée pour ses propriétés insecticides. Pendant longtemps, la roténone a été considérée comme inoffensive pour les humains du fait de son origine naturelle. Cependant, il a été démontré que cette substance active était une toxine mitochondriale capable d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire (Saravanan et al., 2005). Cette inhibition provoque la production de ROS conduisant à la dégénérescence des neurones à dopamine (très sensibles au stress oxydatif), mais aussi d'autres populations neuronales non-dopaminergiques (Betarbet et al., 2000; Milusheva et al., 2005). L'administration quotidienne de roténone à des rats conduit à la manifestation de symptômes de type Parkinson tels qu'une bradykinésie et une instabilité posturale. Des études *post-mortem* sur des rats traités avec de la roténone montrent que près de la moitié des neurones de la substance noire ont dégénéré (Cannon et al., 2009). De plus, après traitement à la roténone, des agrégats d'α-synucléine sont observés au niveau des neurones dopaminergiques, proche des corps de Lewy observés chez les patients atteints de la

maladie de Parkinson, et également retrouvés au niveau du système nerveux entérique (Drolet et al., 2009; Pan-Montojo et al., 2010).

Le paraquat est un pesticide de synthèse utilisé pour ses propriétés herbicides à large spectre. Il provoque des lésions tissulaires en créant un cycle d'oxydo-réduction qui produirait des radicaux libres superoxydes toxiques. Chez la drosophile, les effets toxiques des superoxydes liés au traitement au paraquat, peuvent être contrecarrés par l'utilisation d'un composé mimant l'activité de la superoxyde dismutase (enzyme neutralisant les radicaux libres superoxyde) réduisant les perturbations mitochondriales et le ralentissement moteur (Filograna et al., 2016). De plus, le paraquat est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique par l'intermédiaire de transporteurs d'acides aminés (Shimizu et al., 2001) et est aussi re-capturé par les neurones dopaminergiques via les transporteurs de la dopamine (Shimizu et al., 2003). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que le traitement de rats avec du paraquat (10 mg/kg en sous-cutané, 1 fois/jour pendant 5 jours) provoquait une augmentation transitoire de glutamate et de dopamine au niveau du striatum (Shimizu et al., 2003). Le glutamate ainsi libéré activerait les récepteurs NMDA conduisant à la stimulation de la NO synthase, augmentant la production de NO, qui pourrait alors diffuser vers les terminaisons des neurones dopaminergiques et amplifier les dysfonctionnements mitochondriaux. Des études *in vitro* ont mis en évidence un rôle du paraquat dans l'agrégation de l'α-synucléine. Ainsi, l'incubation d'α-synucléine recombinante purifiée avec du paraquat (10, 100, 500 et 1000 µM) augmente la cinétique d'agrégation de l'α-synucléine de manière dose-dépendante (Manning-Bog et al., 2002). L'injection intrapéritonéale de paraquat (10 mg/kg, 1 fois/semaine pendant 3 semaines) à des souris mâles C57BL/6 augmente l'expression de l'α-synucléine et des agrégats de la protéine sont retrouvés au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire (Manning-Bog et al., 2002). Le traitement de rats à de fortes doses de paraquat de manière chronique (10 mg/kg en intrapéritonéal, 1

fois/semaine pendant 4 à 24 semaines) induit une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques et une diminution de la neurotransmission dopaminergique (Ossowska et al., 2005). Le traitement de souris transgéniques TgM83 (exprimant une forme humaine d'α-synucléine mutée A53T) par le paraquat via l'eau de boisson (10 mg/kg/jour) pendant 6-8 semaines a mis en évidence une apparition précoce de la synucléinopathie associée à une surexpression de la GFAP, au niveau du système entérique (Naudet et al., 2017). Dans la **Figure 67**, sont schématisées certaines des actions intracellulaires de la roténone et du paraquat.

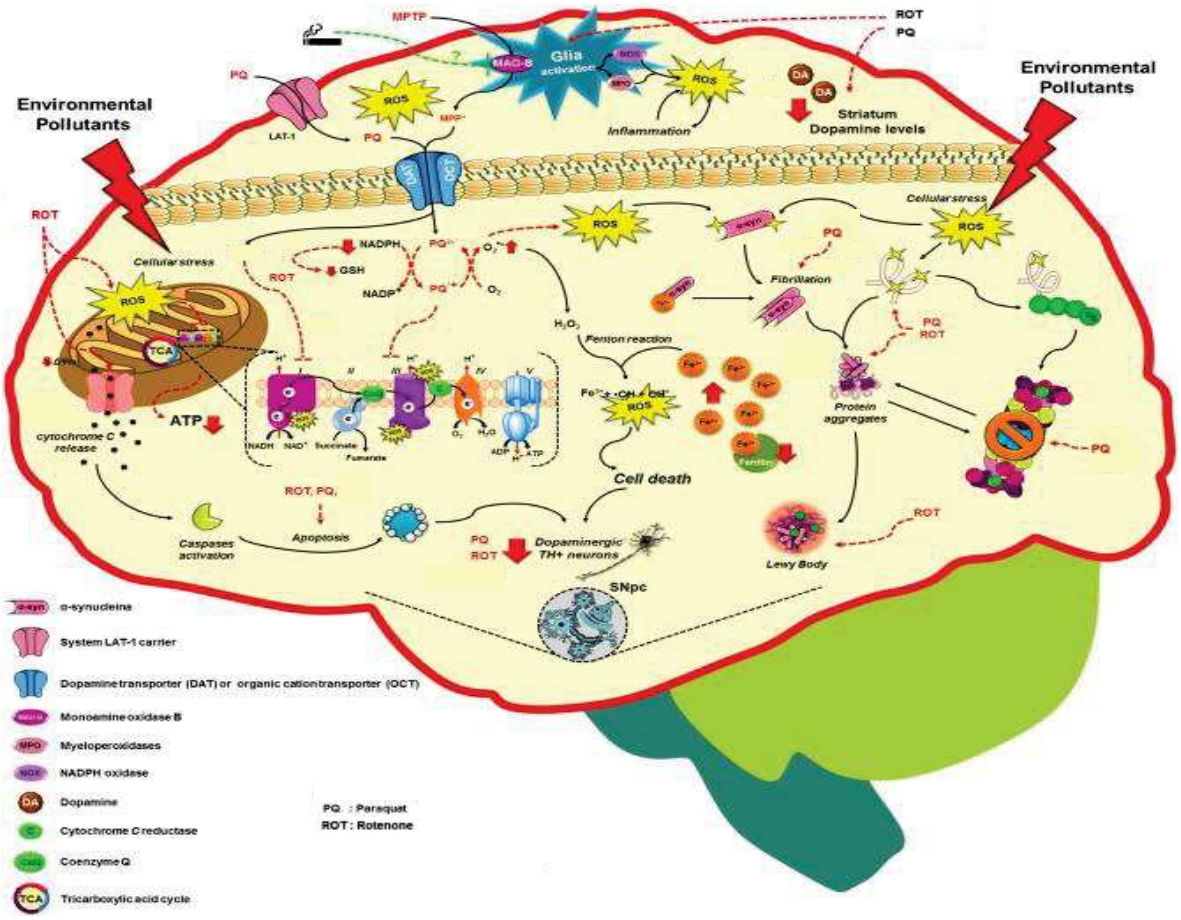


Figure 67. Schéma illustrant les différents mécanismes moléculaires de la roténone et du paraquat. Les différentes altérations de ces deux pesticides conduisent à des dysfonctionnements mitochondriaux, une altération de la qualité des protéines formées, une activation microgliale et une augmentation de la production de ROS. L'ensemble de ces mécanismes conduit à la dégénérescence des neurones à dopamine causant le développement de la maladie de Parkinson (adapté de (Chin-Chan et al., 2015)).

Au vu des différents travaux scientifiques montrant la toxicité de la roténone et du paraquat et des données épidémiologiques établissant leur lien avec la MP, la Mutualité Sociale Agricole (MSA) a reconnu la maladie de Parkinson comme maladie professionnelle en 2012 pour les agriculteurs (Delamarre and Meissner, 2017).

III.2. Les maladies à prions

Très peu d'études ont été réalisées sur le rôle des pesticides dans les maladies à prions. A partir d'une réflexion faite sur l'origine de l'ESB au Royaume-Uni, le Dr. Purdey a émis l'hypothèse en 1996 que le phosmet, un insecticide de la famille des organophosphorés, pourrait être à l'origine de cette épidémie. Ainsi, dans une première publication, il émet l'hypothèse que l'exposition d'embryons bovins à de fortes doses de pesticides organophosphorés contenant des phtalimides puisse être le principal déclencheur de l'épidémie d'ESB (Purdey, 1996a). Selon lui, le traitement systémique des bovins avec le phosmet pourrait induire une interaction directe du composé avec la PrP^{C} fœtale. Cette liaison empêcherait l'action des protéines chaperonnes et des protéases et favoriserait un mauvais repliement de la PrP^{C} en feuillets β. Ce complexe PrP^{C}-phosmet formé, dont les propriétés sont proches de la PrP^{Sc}, pourrait s'agréger dans le SNC. Ainsi, une exposition à de fortes de doses de phosmet pendant la période fœtale *in utero*, induirait sur le long terme le déclenchement de l'ESB (Purdey, 1996a) (**Figure 68**). L'hypothèse de Purdey a été remise en cause par le manque de données épidémiologiques, et par le fait que le phosmet a été utilisé à de fortes doses dans d'autres pays alors que l'épidémie d'ESB ne s'est déclenchée qu'au Royaume Uni. Purdey avance une explication par un changement de législation (Purdey, 1996b). En effet, en 1982, la législation vétérinaire anglaise a exigé que deux traitements au phosmet, au lieu d'un, soient réalisés chaque année (printemps et automne) à de fortes doses.

Ainsi, selon lui, cette surdose expliquerait pourquoi le foyer principal de l'épidémie a eu lieu au Royaume-Uni (Purdey, 1996b).

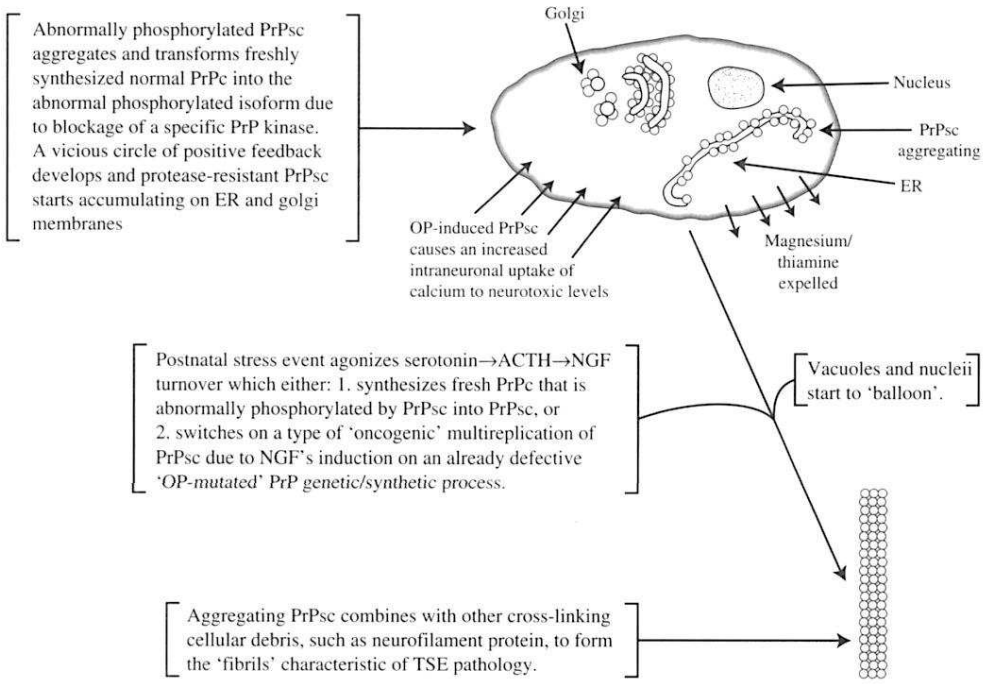


Figure 68. Hypothèse détaillée des effets intracellulaires possibles induits par un stress durant le stade adulte, après exposition à de fortes doses de phosmet *in utero* (selon Purdey, 1996a).

Des expériences conduites sur des neuroblastomes humains incubés pendant deux jours avec différentes concentrations de phosmet, induit une augmentation dose dépendante de la PrP^{C} à la surface cellulaire (Gordon et al., 1998). Ces données suggèrent que l'augmentation de PrP^{C} à la surface membranaire pourrait augmenter la capture de la PrP^{Sc} et la propagation des isoformes pathologiques. Cependant, une étude *in vitro*, sur des protéines recombinantes de PrP^{C} de souris incubées avec du phosmet puis analysées par dichroïsme circulaire, ont montré que le phosmet n'induisait pas de modifications de la structure secondaire, caractéristiques du changement de conformation de la PrP^{C} en PrP^{Sc} (Shaw et al., 2002). Il semblerait donc que le phosmet ne puisse pas activer directement le changement de conformation de la PrP^{C} en PrP^{Sc}.

Ces études posent la question d'un lien possible entre pesticides et maladies à prions. A ce jour, aucune étude épidémiologique ou expérimentale n'a pu établir un lien direct de cause à effet entre ces facteurs environnementaux et les ESST.

Première problématique de mes travaux de thèse :

Les facteurs environnementaux tels que les pesticides semblent contribuer à l'apparition ou à l'aggravation des maladies neurodégénératives. Pour les maladies à prions, très peu d'études ont été réalisées et la question se pose de savoir si les pesticides sont capables de modifier l'équilibre entre les différentes espèces de la protéine prion (protéine native, oligomères, fibrilles,…). Mon premier objectif a été d'étudier l'effet d'un herbicide biologique, nommé A6, à différentes doses (5, 10 et 20 mg/kg) sur l'agrégation et la propagation de la protéine prion pathologique dans un modèle murin de maladies à prions.

III.3. La maladie d'Alzheimer

L'association de la maladie d'Alzheimer avec l'exposition aux produits phytosanitaires n'a pas encore été pleinement explorée.

Dans le sud de la France, une étude menée sur une cohorte de personnes âgées (65 ans ou plus) a été réalisée pour évaluer le lien entre l'exposition aux pesticides et l'incidence des maladies neurodégénératives avec un suivi de 5 ans. Les résultats ont montré un lien entre exposition professionnelle aux pesticides et la maladie d'Alzheimer mais qui n'est statistiquement significative que chez les hommes (Baldi et al., 2003). Hayden et ses collaborateurs ont étudié une cohorte de plus de 3 000 personnes âgées d'au moins 65 ans. Leur conclusion est que l'exposition professionnelle à des pesticides de la famille des organophosphorés et organochlorés augmente le risque d'incidence de la MA. La corrélation est plus marquée pour les pesticides de la famille des organochlorés (Hayden et al., 2010). De

même, une étude réalisée sur différents districts en Andalousie (région espagnole) révèle que la prévalence de la maladie d'Alzheimer est augmentée dans les districts où l'exposition aux pesticides est importante avec un risque 2 fois plus important de déclarer la maladie pour les Hommes (Parrón et al., 2011). Une étude américaine a mis en évidence la présence de DDE, un métabolite du DDT, dans le sérum de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, avec un taux 3,8 fois plus élevé que chez des sujets sains (Richardson et al., 2014). Les auteurs ont trouvé une corrélation entre les taux de DDE sériques et les taux de DDE présents dans le cerveau et une association entre DDE et MA. En parallèle, les patients présentant des niveaux élevés de DDE sériques et possédant l'allèle APOE ε4 avaient un score plus faible au « mini-mental state » par rapport aux patients APOE ε3, suggérant que la population APOE ε4 serait plus susceptible aux effets du DDE (Richardson et al., 2014).

Au niveau mécanistique, des études ont montré une action de certains pesticides sur la production et la clairance des peptides Aβ. En effet, Richardson et ses collaborateurs ont détecté une augmentation de l'expression de l'APP lorsque des lignées cellulaires (SH-SY5Y) ont été traitées avec du DDE (1 µM pendant 48h) (Richardson et al., 2014). De même, le traitement de cellules de neurogliome avec du DDT induit une augmentation de l'expression de l'APP et de BACE1 et la diminution de l'expression de la NEP, ce qui a pour conséquence une augmentation de la production de peptides Aβ (Li et al., 2015).

Peu d'études *in vivo*, sur l'exposition aux pesticides en lien avec la maladie d'Alzheimer ont été conduites. L'injection aigüe en sous cutané de chlorpyrifos (insecticide, 50 mg/kg) à des souris transgéniques Tg2576 ($hAPP_{Swe}$) provoque une augmentation de la production de peptides Aβ au niveau du cortex et de l'hippocampe, associée à des troubles moteurs et mnésiques (Salazar et al., 2011). L'injection en intrapéritonéal de paraquat à des souris WT ou Tg2576 (10 mg/kg, 2 fois par semaine, pendant 3 semaines) conduit à une augmentation de la production des peptides Aβ associée à des troubles moteurs et mnésiques

(Chen et al., 2012). Si ces études montrent la dérégulation de la cascade amyloïde avec une augmentation de la production de peptides Aβ consécutive à l'injection de pesticides, les doses utilisées et les voies d'injection sont sujettes à débat.

Deuxième problématique de mes travaux de thèse :

La majorité des études réalisées sur les effets des pesticides sur la maladie d'Alzheimer se basent sur un composé seul, en particulier à de fortes doses. Cependant, il est rare d'être exposé à de telles doses dans notre environnement. Nous sommes chroniquement exposés à de multiples résidus de pesticides, c'est-à-dire à de faibles doses voire très faibles, via notre environnement et plus particulièrement par notre alimentation et l'eau de boisson. Le deuxième objectif de mes travaux de thèse a consisté à évaluer l'impact d'un traitement chronique à de faibles doses (0,1 µg/L) d'un cocktail de trois fongicides (cyprodinil, mépanipyrim et pyriméthanil), via l'eau de boisson, dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (J20).

Résultats

I. Dualité d'effet d'un herbicide biologique sur l'agrégation et la propagation des prions

➔ ***Contexte de l'étude***

Selon l'hypothèse de la « protéine seule » proposée par Prusiner, la PrP^{Sc} peut induire la conversion auto-catalytique de la PrP^{C} en PrP^{Sc} (**Figure 69**) (Prusiner, 1982). Par un mécanisme d'oligomérisation complexe, les monomères de PrP^{Sc} vont s'associer entre eux pour former des petites espèces oligomériques solubles qui s'auto-assembleront pour former des fibrilles amyloïdes (Govaerts et al., 2004; Silveira et al., 2005) (**Figure 69**). Ces fibrilles peuvent se fragmenter pour produire de nouveaux noyaux de nucléation qui dissémineront la PrP^{Sc} et propageront les prions par un processus de conversion et de réplication (Baskakov et al., 2002; Saborio et al., 2001) (**Figure 69**).

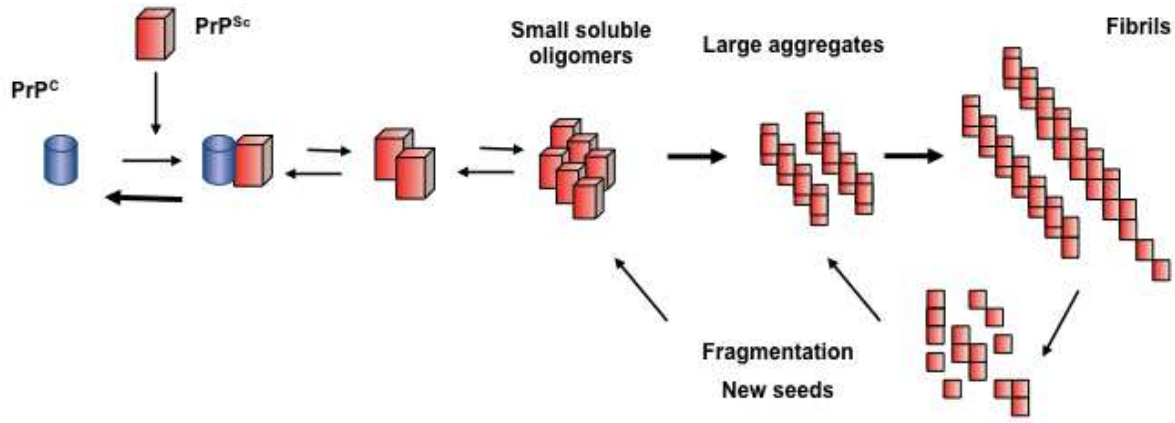


Figure 69. Schéma illustrant la conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc} et le mécanisme de réplication de la PrP^{Sc} (selon Imberdis et al., 2013).

Les différentes espèces conformationnelles de ce cycle sont autant de cibles spécifiques pour des interventions thérapeutiques. Des études ont montré que les espèces les plus neurotoxiques sont les petits oligomères solubles plutôt que les fibrilles amyloïdes, qui

constitueraient un mécanisme de protection pour piéger les formes neurotoxiques (Silveira et al., 2005; Simoneau et al., 2007).

Certaines approches ont ciblé la PrP^{Sc} en se basant sur le marqueur PrP(27-30), la forme partiellement résistante à la protéinase K (PK) (**Figure 70.1**). Les criblages « classiques » utilisés pour identifier des molécules « anti-prions » se sont basés sur la réduction du taux de PrP(27–30), corrélée parfois à une diminution de l'infectiosité (**Figure 70.2**). Cette stratégie a permis l'identification de composés « anti-prions » potentiels, mais qui n'ont pas abouti à des résultats concluants lors des expériences *in vivo* (Ludewigs et al., 2007).

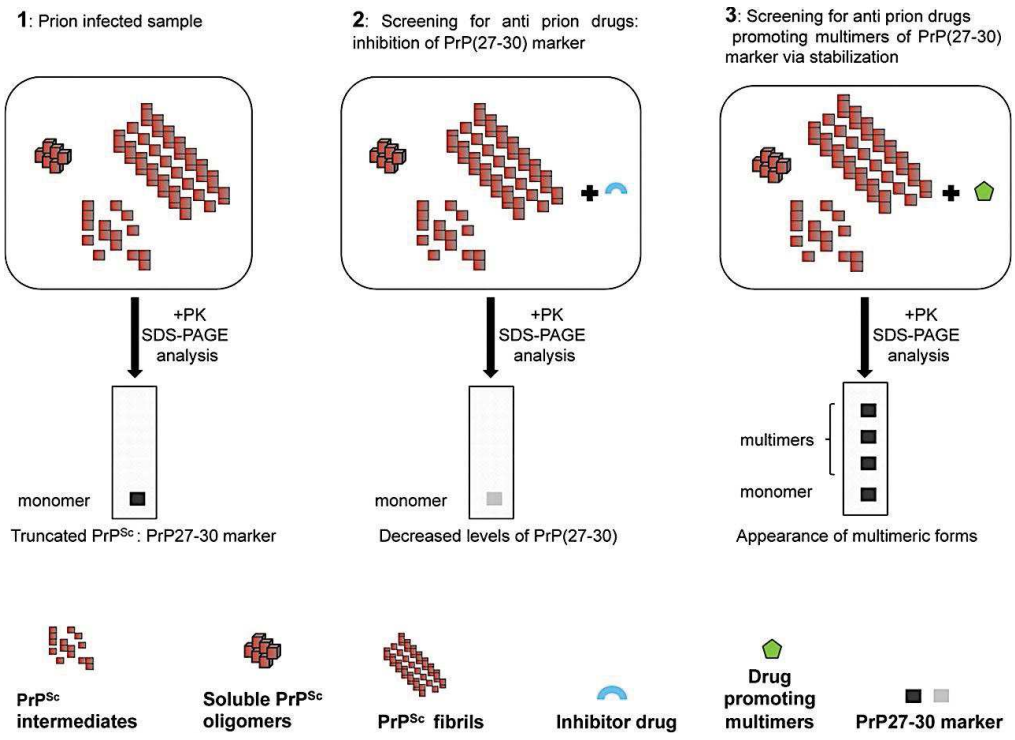


Figure 70. Schéma décrivant les différents stratégies de criblage de composés anti-prions dans des cultures cellulaires infectées (N2a58/22L) (extrait de Ayrolles-Torro et al., 2011).

En s'appuyant sur le concept que les fibrilles amyloïdes auraient un rôle protecteur, l'équipe du Dr. Perrier a émis l'hypothèse, qu'il serait possible de piéger la PrP^{Sc} dans des structures fibrillaires insolubles, non compétentes pour permettre la réplication des prions afin

de réduire leur propagation. Dans ce but, des molécules capables d'interagir avec les différentes isoformes de PrP conduisant à la formation d'espèces multimériques du marqueur PrP(27-30) ont été recherchées (**Figure 70.3**).

Dans un premier temps, des études de modélisation moléculaire ont été réalisées pour identifier des sites d'interaction communs à la forme humaine de la PrP^{C} et de la PrP^{Sc}. Les résultats ont montré la présence d'un site de liaison entre les hélices α 2 et 3, proche du pont disulfure entre les cystéines 179 et 214 (Ayrolles-Torro et al., 2011). Cette région est particulièrement intéressante car elle est impliquée dans l'oligomérisation de la protéine prion (Lee et al., 2010). Dans un second temps, un criblage *in silico* réalisé à partir de la banque de données « Bioinfo Chemical Library » composée de 350 000 molécules, a permis l'identification de 37 molécules pouvant interagir avec la région identifiée. Parmi ces composés, 32 étaient commercialement disponibles et ont été testés sur des cultures cellulaires chroniquement infectées par les prions, les N2a58/22L (Nishida et al., 2000). A l'issu de ce criblage cellulaire, un seul composé était capable d'induire des formes multimériques SDS résistantes de la PrP^{Sc} (rSDS-PrP^{Sc}) (**Figure 71A**) : le composé P30 (4-(5-bromo-2-thiényl)-2-(méthylthio)pyrimidine) appartenant à la famille des thiényls pyrimidines (**Figure 71B**) (Ayrolles-Torro et al., 2011).

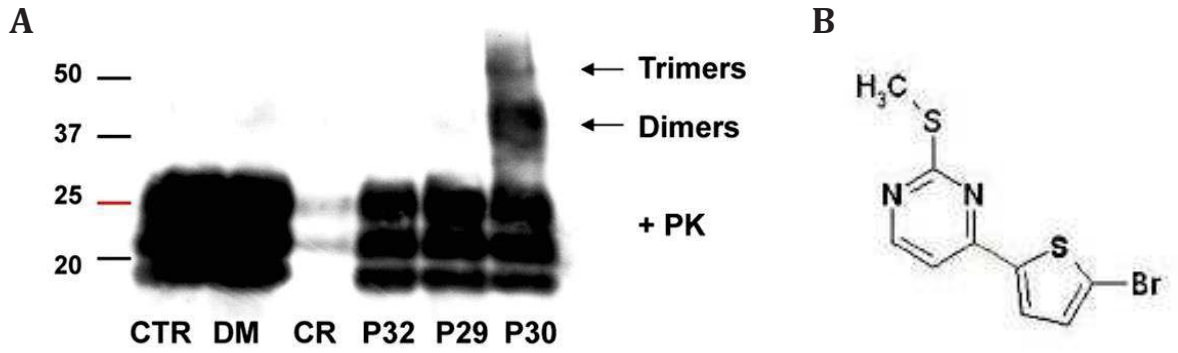


Figure 71. Criblage des composés identifiés *in sillico* dans des cellules N2a58/22L. A. Seul le composé P30 est capable d'induire des formes oligomériques (dimères et trimères) de PrP^{Sc}, après digestion à la PK. CTR : sans produit, DM : incubation avec du DMSO, CR : incubation avec du rouge Congo (contrôle positif d'inhibition) **B.** Représentation de la structure du composé P30 (extrait de Ayrolles-Torro et al., 2011).

Afin de tester si l'effet d'oligomérisation observé *in cellulo*, pouvait être reproduit *in vitro*, des homogénats de cerveaux de souris infectés par la souche de prions 22L ont été incubés avec le composé P30 puis partiellement digérés par la protéinase K. Des oligomères rSDS-PrP^{Sc} ont été détectés par western blot, dans les échantillons incubés avec le composé P30.

L'étape suivante a été de tester l'effet du composé P30 sur la réplication des prions *in vivo* et de déterminer si les formes oligomériques générées étaient plus ou moins infectieuses après inoculation chez l'animal. Ainsi, des souris Swiss wild-type (WT) ont été inoculées, en intracérébral, avec des homogénats de cerveaux de souris infectés par la souche 22L préalablement traités soit avec 1,5 mM de P30 pendant 2h, soit avec un volume équivalent en DMSO. Les souris inoculées avec la souche pré-incubée avec P30 avaient un temps de survie augmenté de 8% par rapport aux souris contrôles (22L+P30 : 167 ± 2,3 jours versus 22L+DMSO : 154 ± 1,3 jours) (**Figure 72**). Ces résultats suggèrent que ce composé piègerait une partie des prions et diminuerait leur infectiosité (Ayrolles-Torro et al., 2011).

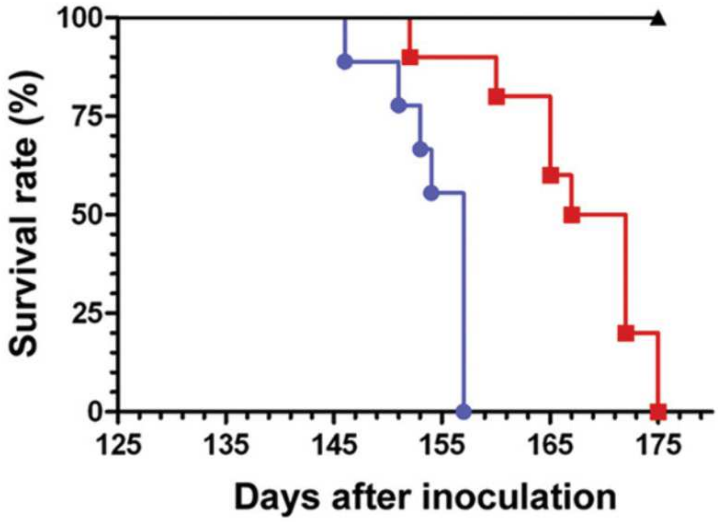


Figure 72. Augmentation du temps de survie des souris inoculées avec des homogénats de cerveaux infectés avec la souche de prions 22L et prétraités avec le composé P30. Courbes de survie des souris inoculées avec des homogénats prétraités avec le composé P30 (courbe rouge) ou avec un volume équivalent de DMSO (courbe bleue) (extrait de Ayrolles-Torro et al., 2011).

En collaboration avec le Dr. Mike Robitzer, une nouvelle molécule nommée MR100 (6,6'-(2,2' :5',2'' :5'',2'''quaterthiophene-5,5'''-diyl)bis(1,3,5-triazine-2,4-diamine)) (**Figure 73**) a été synthétisée. Ce composé possède une forte activité d'oligomérisation des prions sur des homogénats de cerveaux infectés par la souche 22L par comparaison avec le composé P30 (Imberdis et al., 2016).

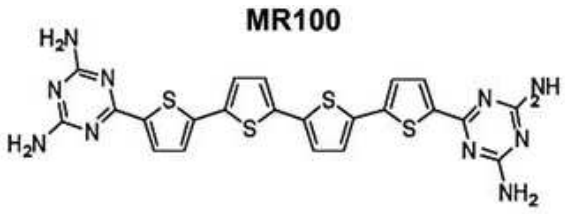


Figure 73. Schéma de la structure du composé MR100. Ce composé est un ligand bi-fonctionnel, analogue au composé A6 (c.f. Figure 77) (extrait de Imberdis et al., 2016).

Lors d'expériences conduites sur des homogénats de cerveaux de patients atteints d'une forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (sMCJ), le composé MR100, de couleur orange, précipitait au fond du tube. Après 1h d'incubation des échantillons avec le composé MR100 et suivi d'une centrifugation rapide (5min à 8 000g), l'analyse des surnageants et des culots par western blot a montré que MR100 était capable de précipiter la PrP^{C} et la PrP^{Sc} (**Figure 74**). Ce protocole a été nommé « test de centrifugation rapide » ou « Rapid Centrifugation Assay » en anglais (RCA). L'analyse de 10 échantillons de patients sMCJ par le test RCA en utilisant le composé MR100, a révélé la présence de formes oligomériques rSDS-PrP^{Sc}, non détectées sur des homogénats de patients sains (**Figure 75A**) (Imberdis et al., 2016).

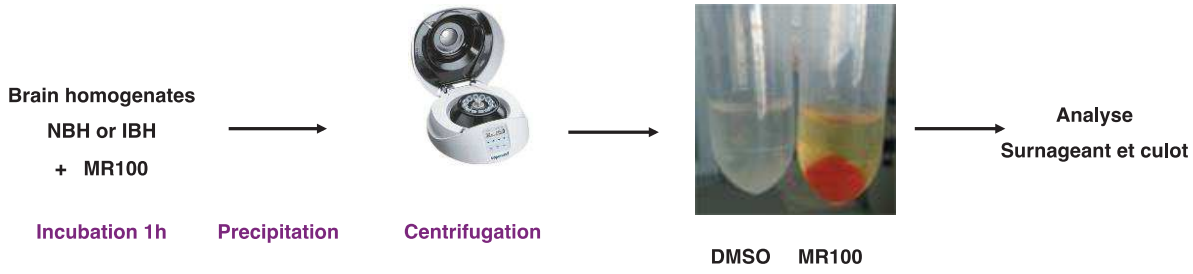
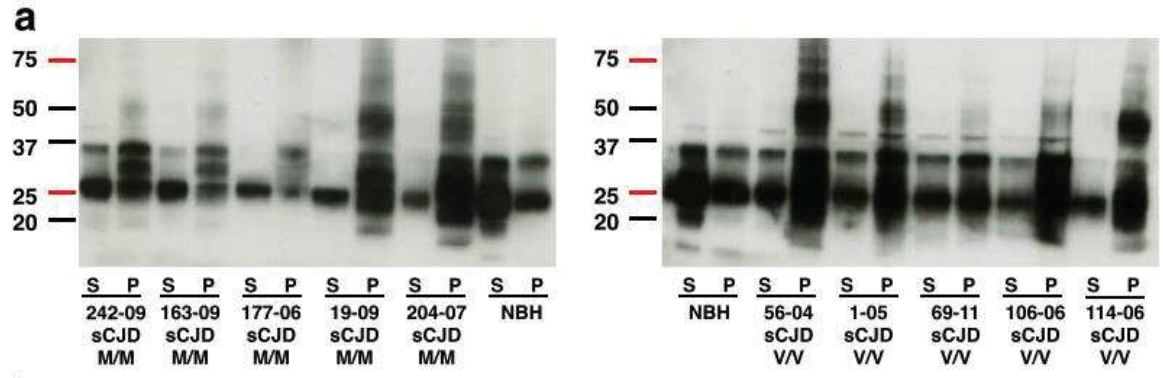


Figure 74. Schématisation du protocole RCA et précipitation induite par le composé MR100. NBH : nornal brain homogenate, IBH : infected brain homogenate.



b

3	4	2	6	8	-	Duration (months)	-	8	4	3	4	5
18	11	13.4	73	59.6	-	Densitometry of oligomers (P) (A.U. x10³)	-	104	29.5	1.5	14.7	46
2.7	2.2	2.5	6.7	7.9	1	Densitometry of Monomers: Ratio (P/S IBH or NBH) / (P/S NBH)	1	2.8	2.3	1.8	3.4	3.3

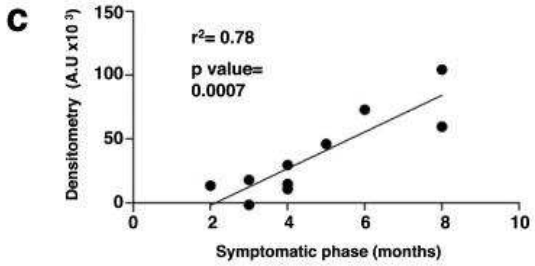


Figure 75. Détection d'oligomères rSDS-PrP^{Sc} sur des homogénats de cerveaux de patients atteints de formes sporadiques de la MCJ, avec le test RCA. A. Analyse d'homogénats de cerveaux de patients sMCJ possédant les polymorphismes M/M ou V/V au codon 129 après RCA. **B.** Dans le tableau sont représentés : (i) la durée en mois de la phase symptomatique de la maladie, (ii) les résultats de l'analyse densitométrique des formes oligomériques rSDS-PrP^{Sc}, et (iii) les résultats de l'analyse densitométrique des monomères (ratio culot/surnageant). **C.** Corrélation entre la quantité d'oligomères et la durée de la phase symptomatique (extrait de Imberdis et al., 2016).

L'analyse densitométrique du profil électrophorétique montre une corrélation entre la quantité d'oligomères présents dans le culot et la durée de la phase symptomatique des patients. Ainsi, plus la phase symptomatique est longue, plus la quantité d'oligomères rSDS-PrP^{Sc} est importante, suggérant un rôle « protecteur » de ces espèces (**Figure 75 B-C**). Pour démontrer cet effet un homogénat de cerveau de souris infecté par la souche 22L a été pré-incubé avec le composé MR100 et inoculé en intracérébral à des souris Swiss. Les résultats ont montré qu'après 314 jours post-inoculation, 50% des animaux injectés avec l'homogénat prétraité avec MR100 ont survécu à la maladie et ne présentent aucun symptôme d'ESST. Les 50% restants ont une augmentation de leur durée de vie (médiane : 281 jours post-inoculation,

j.p.i.) par rapport aux souris contrôles inoculées avec un homogénat de cerveau de souris prétraité avec un volume équivalent de DMSO (191 j.p.i.) ou avec du PBS (199 j.p.i.) (Imberdis et al., 2016).

Une recherche d'analogues du composé P30 a permis l'identification de 23 molécules appartenant à la famille des thiényls pyrimidines. Le criblage de ces composés dans les cellules N2a58/22L a révélé que 6 d'entre eux étaient capable d'induire des oligomères rSDS-PrP^{Sc} (Ayrolles-Torro et al., 2011) (**Figure 76**). Les recherches se sont orientées sur un composé, nommé A6, présentant l'activité d'oligomérisation la plus importante.

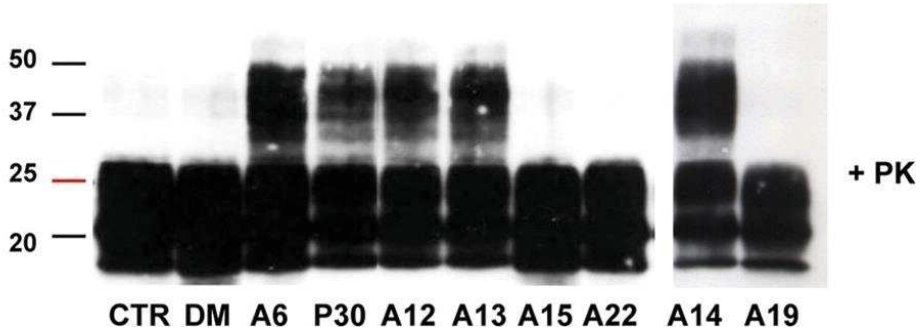


Figure 76. Criblage des 23 composés analogues au P30 dans des cultures cellulaires chroniquement infectées par des prions (N2a58/22L). Parmi ces 23 molécules, le composé A6 induit le plus de formes oligomériques rSDS-PrP^{Sc}, après PK digestion (extrait de Ayrolles-Torro et al., 2011).

Le composé A6 est un analogue structurel des α-terthiényls (α-Ter), des molécules naturelles synthétisées par des plantes telles que les œillets d'inde (Nivsarkar et al., 2001), et possède une activité herbicide (**Figure 77**) (Friedman and Friedman, 1995). Sa toxicité sur les plantes est liée à la production de radicaux libres sous l'action des ultra-violets. Les α-Ter ainsi que leurs dérivés font l'objet d'un nouveau marché en expansion en raison d'un mouvement environnemental en faveur de la « chimie verte ». De plus, en janvier 2015, l'Assemblée nationale française a voté la loi « 0'Phyto » qui interdit l'utilisation de pesticides dits « synthétiques » dans les jardins publics et privés à partir de 2017. On peut donc

s'attendre à une recrudescence de l'utilisation de pesticides « biologiques » ou de leurs dérivés dont les effets sur la santé sont inconnus.

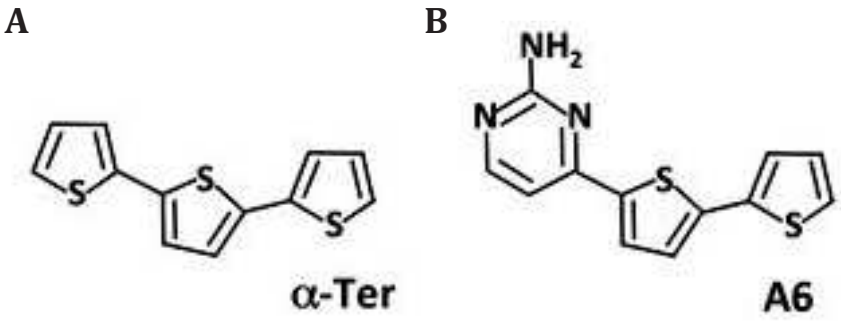


Figure 77. Représentation de la structure de l'α-terthiényl (A) et du composé A6 (B) (extrait de Lafon et al., 2018).

➔ ***Résultats***

Grâce aux propriétés de fluorescence du composé A6, des expériences d'interaction ont montré qu'il a la capacité d'interagir avec les fibrilles amyloïdes obtenues à partir de protéines recombinantes de souris PrP(23-230) (**Figure 78A**), ou de hamster (**Figure 78B**). Cependant, le composé A6 n'interagit pas avec les formes solubles de la PrP (α-MoPrP) (**Figure 78A**).

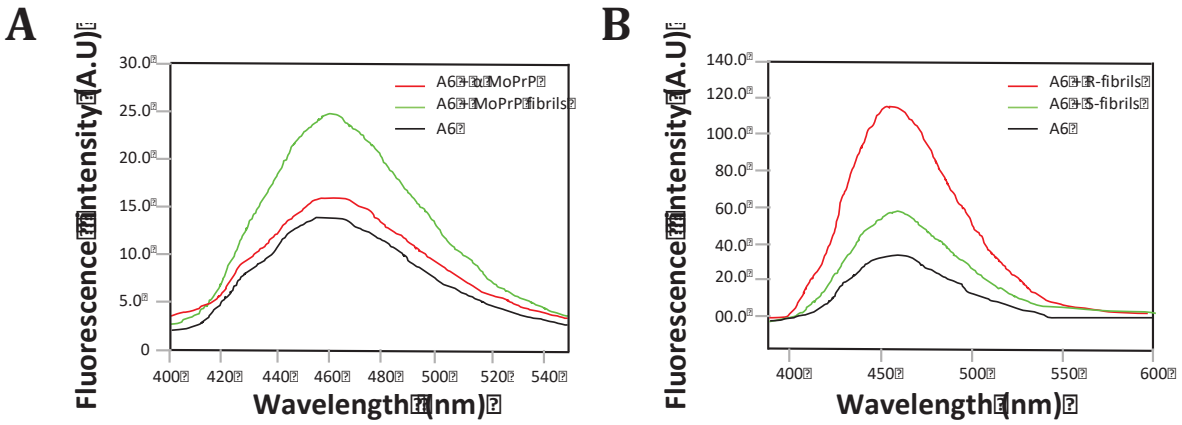


Figure 78. Etudes d'interaction du composé A6 avec des protéines recombinantes de souris (A) solubles (α-MoPrP) ou fibrillaires (MoPrP fibrils), et des fibrilles de hamster (B) de type R ou S (extrait de Lafon et al., 2018).

Le composé A6 est capable d'interagir avec les formes fibrillaires de la PrP et peut former des oligomères rSDS-PrP^{Sc} *in cellulo*. Nous avons donc voulu déterminer quels sont les effets du composé A6 sur l'agrégation et la propagation des prions *in vivo*.

Des souris Swiss WT inoculées avec la souche de prions 22L (en intracérébral) ont ensuite été traitées en intrapéritonéal avec différentes doses du composé A6 (5, 10 et 20 mg/kg). A la dose la plus faible de 5 mg/kg, nous avons observé que le traitement avec le composé A6 accélère la pathologie par rapport aux souris contrôles traitées avec un volume équivalent de DMSO (**Figure 79**). Ce phénomène est associé à l'apparition de dépôts de PrP^{Sc} plus précoces.

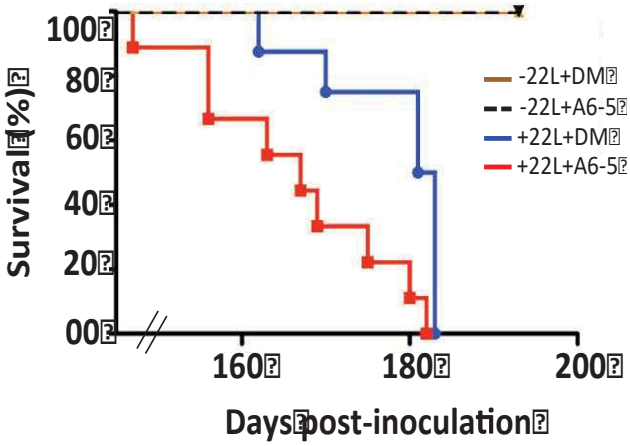


Figure 79. Diminution du temps de survie des souris inoculées avec la souche de prions 22L et traitées avec 5 mg/kg du composé A6. Courbes de survie des souris traitées avec le composé A6 (courbe rouge, temps médian de survie : 167 ± 19 jours) ou avec un volume équivalent de DMSO (courbe bleue, temps médian de survie : 182 ± 5 jours).

De manière surprenante, le traitement des souris à des doses plus élevées (10 et 20 mg/kg), a montré un effet opposé, augmentant le temps de survie des animaux avec moins de dépôts de PrP^{Sc} par rapport aux souris contrôles traitées avec un volume équivalent de DMSO (**Figure 80**).

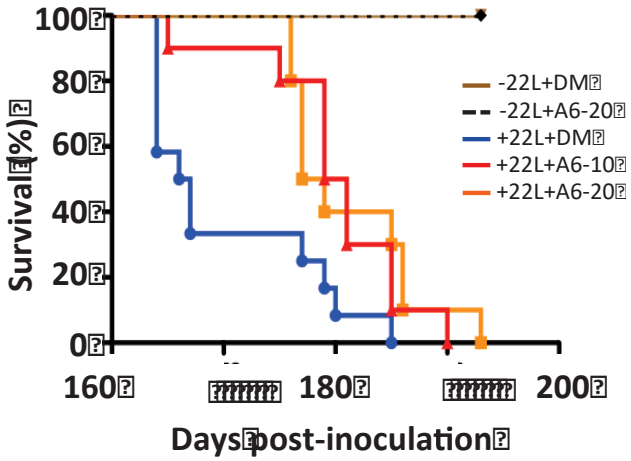


Figure 80. Augmentation du temps de survie des souris inoculées avec la souche de prions 22L et traitées avec 10 et 20 mg/kg du composé A6. Courbes de survie des souris traitées avec 10 mg/kg d'A6 (courbe rouge, temps médian de survie : 181,2 ± 1,9 jours), avec 20 mg/kg d'A6 (courbe orange, temps médian de survie : 179,9 ± 2,1) ou avec un volume équivalent de DMSO (courbe bleue, temps médian de survie : 170,1 ± 2,2 jours).

L'analyse des homogénats de cerveau des souris traitées avec le composé A6 à 5 mg/kg ou avec un volume équivalent de DMSO, montre l'absence d'oligomères rSDS-PrP^{Sc} après PK digestion (**Figure 81A**), alors que des oligomères rSDS-PrP^{Sc} ont été détectés dans tous les homogénats de cerveau des souris traitées avec 10 ou 20 mg/kg, après digestion à la PK (**Figure 81B**).

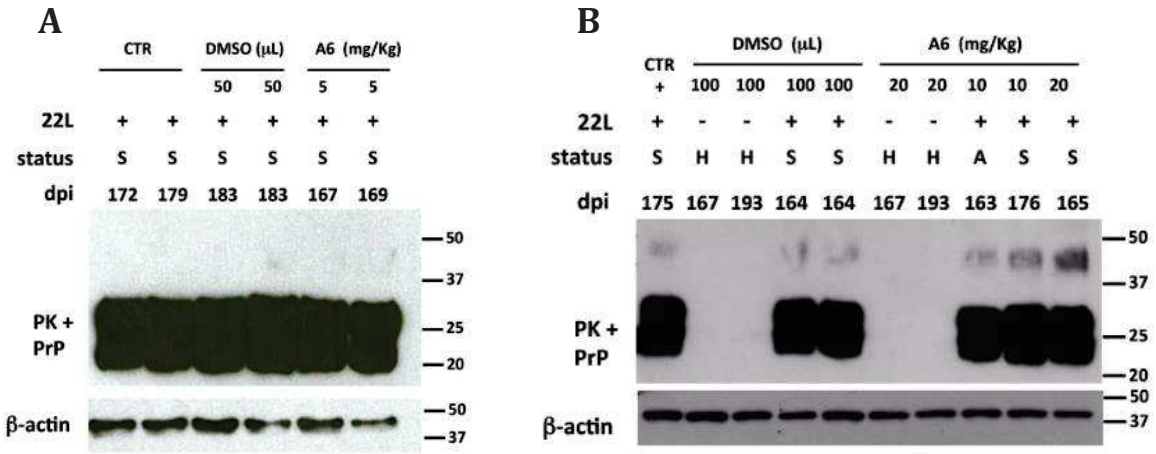


Figure 81. Western blots d'homogénats de cerveaux des souris traitées avec 5, 10 ou 20 mg/kg du composé A6. A. Pas de détection de formes oligomériques rSDS-PrP^{Sc} dans les homogénats de cerveaux de souris traitées avec 5 mg/kg du composé A6, contrairement aux souris traitées avec 10 et 20 mg/kg (**B**).

La détection de dimères rSDS-PrP^{Sc} chez les souris traitées avec 10 et 20 mg/kg du composé A6 suggère fortement que ces espèces oligomériques sont impliquées dans l'augmentation de la durée de vie des animaux.

Afin d'analyser les propriétés d'agrégation du composé A6 sur les prions, nous avons adapté le test RCA et avons testé une gamme croissante du composé A6 (0,25 mM - 1,5 mM). Nos résultats ont montré qu'à la plus faible dose utilisée (0,25 mM), le composé A6 induit des oligomères rSDS-PrP^{Sc} qui sont détectés dans le surnageant, mais pas dans le culot, montrant que ces formes sont solubles (**Figure 82B**). A des doses plus élevées en composé A6 (>1 mM), les prions s'agrègent en un précipité jaune (**Figure 82A**) et des taux élevés d'oligomères insolubles rSDS-PrP^{Sc} sont détectés dans le culot par immunoblot (**Figure 82B**).

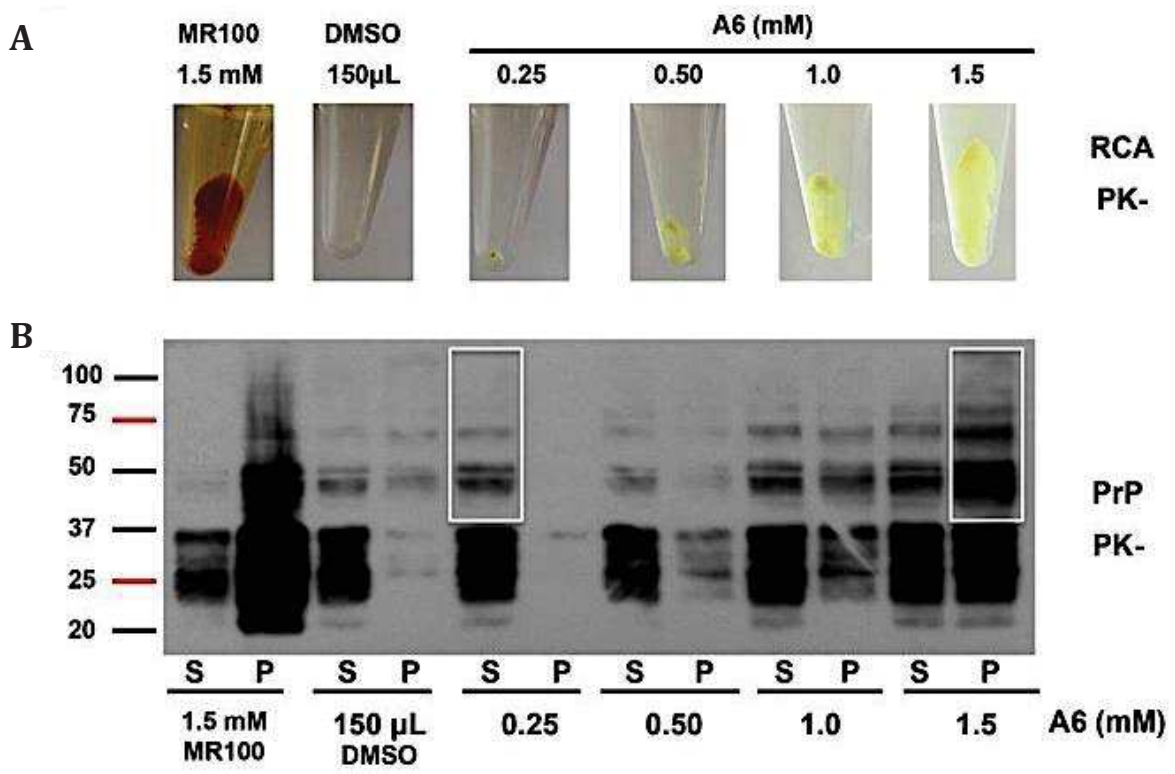


Figure 82. Le composé A6 induit des formes oligomériques rSDS-PrP^{Sc} solubles ou insolubles de manière dose-dépendant. A. Images des précipités obtenus après le test RCA en présence du composé A6. **B.** Analyse par western blot des culots et des surnageants obtenus après centrifugation. A de faibles doses, le composé A6 promeut des formes oligomériques solubles (encadré blanc, à gauche) alors qu'à de plus fortes doses, ces formes oligomériques sont insolubles (150 µL de DMSO correspond au volume utilisé pour obtenir 1,5 mM de A6).

Ainsi, à de faibles concentrations, le composé A6 favorise la formation d'oligomères solubles rSDS-PrP^{Sc}, considérés comme les espèces les plus neurotoxiques ce qui est cohérent avec nos résultats obtenus *in vivo* sur les souris traitées avec A6 à 5 mg/kg et présentant une période d'incubation plus courte. Cependant, à de plus fortes doses, le composé A6 favorise la formation d'oligomères insolubles rSDS-PrP^{Sc}, piégeant une partie de l'infectiosité des prions, permettant à un allongement de la période d'incubation comme observé sur nos souris traitées avec 10 et 20 mg/kg d'A6.

Article 1

« Low doses of bioherbicide favour prion aggregation and propagation »

Lafon Pierre-André, Imberdis Thibaut, Wang Yunyun, Robitzer Mike, Huetter Elisabeth, Alvarez-Martinez Maria-Teresa, Chevallier Nathalie, Givalois Laurent, Desrumaux Catherine, Liu Jianfeng and Perrier Véronique.

Scientific Reports, 2018, 8(1) : 8023-8036

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Low doses of bioherbicide favour prion aggregation and propagation *in vivo*

Received: 8 February 2018
Accepted: 1 May 2018
Published online: 23 May 2018

Pierre-André Lafon[1], Thibaut Imberdis[1,5], Yunyun Wang[1,2], Joan Torrent[1], Mike Robitzer[3], Elisabeth Huetter[1], Maria-Teresa Alvarez-Martinez[4], Nathalie Chevallier[1], Laurent Givalois[1], Catherine Desrumaux[1], Jianfeng Liu[2] & Véronique Perrier[1]

Public concerns over the use of synthetic pesticides are growing since many studies have shown their impact on human health. A new environmental movement in occidental countries promoting an organic agriculture favours the rebirth of botanical pesticides. These products confer an effective alternative to chemical pesticides such as glyphosate. Among the biopesticides, the α-terthienyls found in the roots of *Tagetes* species, are powerful broad-spectrum pesticides. We found that an α-terthienyl analogue with herbicidal properties, called A6, triggers resistant SDS oligomers of the pathogenic prion protein PrP^{Sc} ($rSDS\text{-}PrP^{Sc}$) in cells. Our main question is to determine if we can induce those $rSDS\text{-}PrP^{Sc}$ oligomers *in vitro* and *in vivo*, and their impact on prion aggregation and propagation. Using wild-type mice challenged with prions, we showed that A6 accelerates or slows down prion disease depending on the concentration used. At 5 mg/kg, A6 is worsening the pathology with a faster accumulation of PrP^{Sc}, reminiscent to soluble toxic $rSDS\text{-}PrP^{Sc}$ oligomers. In contrast, at 10 and 20 mg/kg of A6, prion disease occurred later, with less PrP^{Sc} deposits and with $rSDS\text{-}PrP^{Sc}$ oligomers in the brain reminiscent to non-toxic aggregates. Our results are bringing new openings regarding the impact of biopesticides in prion and prion-like diseases.

With the increase of life expectancy in the developed countries, the prevalence of age-related disorders continues to rise. The neurodegenerative disease epidemic raises major concerns, among them, the absence of efficient treatments to cure these disorders and the prohibited costs for societies. Thus, reinforcing the prevention and a better identification of the exogenous environmental risk factors involved in these pathologies could also be a way to slow down the epidemic and limit the economic burden for occidental countries[1].

Retrospectively, the 20th century was marked by the tremendous development of heavy and fine petrochemical industries that led to an annual production of 500 million tons of chemical derivatives, among them 140 million tons of fertilizers and about 5 million tons of pesticides[2,3]. Fertilizers and pesticides were extensively used to develop industrial farming and agro-industry leading to their release into all environmental media (water, soil, air). In consequence, numerous pesticide residues were introduced into the food chain raising many concerns regarding their impact on human health[1,3,4]. The role of pesticides in the occurrence of neurodegenerative diseases is pointed-out since residues of pesticides were detected in human tissues and biological fluids, even decades after their use was prohibited, such as the organochlorine pesticide, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)[1]. Recently, it was demonstrated that dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) levels, a metabolite of the DDT banned in 1972, were almost 4 fold-higher in the serum of Alzheimer's disease (AD) patients with ApoE ε4 allele, than in control subjects[5]. Another category of pesticides, paraquat and rotenone, were suppressed from the European market in 2007 and 2008[6,7], respectively. These compounds were incriminated since several epidemiological studies in humans showed an increased incidence of Parkinson's disease (PD) in agricultural workers

[1]MMDN, University Montpellier, EPHE, INSERM, U1198- EiAlz team, PSL Research University, Montpellier, F-34095, France. [2]Cellular Signaling Laboratory, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China. [3]Institut Charles Gerhardt Montpellier, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé, Montpellier, France. [4]Etablissement Confiné d'Expérimentation A3/L3, CECEMA, US009 Biocampus, UMS 3426, Université Montpellier, Montpellier, F-34095, France. [5]Present address: Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. Pierre-André Lafon and Thibaut Imberdis contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.P. (email: veronique.perrier@umontpellier.fr)

who were exposed to high doses of these pesticides, as well as population living in contaminated rural environment[8,9]. Experimental studies aiming to mimic this contamination showed that the administration of rotenone is able to trigger a Parkinsonian's syndrome in rodent animal models[10]. Regarding prion diseases such as Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), the role of phosmet, an anti-parasitis used to decontaminate cows before their slaughtering, was suspected to have a role in the mad-cow disease epidemic[11]. Experiments in cell culture showed that the normal prion protein, PrP^{C}, was more expressed at the cell surface in the presence of phosmet. Thus, it was suggested that PrP^{C} was more prone to interact with the prion misfolded isoform PrP^{Sc} and initiate the transconformation process[12].

It has been shown that neurological disorders as diverse as AD, PD and Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) share a common pathogenic mechanism involving the aggregation and deposition of misfolded proteins in the central nervous system. Although the type of aggregated proteins is disease-specific (Aβ peptides, α-synuclein or PrP^{Sc}), they all share a "prion-like" mechanism of cell-to-cell propagation[13]. These aggregation pathways involve toxic oligomeric species leading to fibril formation and amyloid deposition[14]. Our hypothesis is that pesticides could modify the balance between the different species (native proteins, misfolded proteins, oligomers and fibrils) by shifting the equilibrium towards misfolded proteins, oligomers and/or aggregates. We previously showed, in a drug screening assay on prion-infected cells, that a compound, called A6 is a strong inducer of SDS-resistant oligomers of the pathogenic form of the prion protein PrP^{Sc} (rSDS-PrP^{Sc})[15,16]. Moreover, this compound was previously described for its herbicidal activity[17] and is structurally related to the family of α-terthienyls (α-Ter), natural molecules synthesized by plants such as marigolds and Asteraceae[18]. These plants were traditionally used by gardeners as ≪home made≫ preparations for pest control[18–20]. α-Ter and plant-derived insecticides are now the matter of a new expanding market because of the environmental movement in favour of organic agriculture that allows some botanical pest control. In addition, in January 2015, the French National Assembly voted a law (0'Phyto)[21] that prohibits the use of chemical pesticides in public and private gardens starting 2017. So we can expect a raise in the use of biopesticides whose effects on human health are largely unknown.

Since α-Ter biopesticide analogue A6 can trigger rSDS-PrP^{Sc} oligomers, our main question was to determine if we could induce *in vivo* those rSDS-PrP^{Sc} oligomers and what could be their impact on prion aggregation and propagation. Can this compound worsen or not the pathology? Indeed, many oligomeric species have been described in the literature: soluble oligomers were described as the most neurotoxic species in neurodegenerative diseases (AD, PD, prions)[22,23], whereas some oligomeric species, described as amorphous aggregates, are not able to replicate and propagate prion diseases[24–26]. Using wild-type mice challenged with prions, we showed that A6 can accelerate or slow-down prion disease depending on the concentration used. At 5 mg/kg, the prion pathology occurred earlier in mice and is associated with a faster accumulation of PrP^{Sc} deposits in brain tissue sections compared to control group. By contrast, at 10 and 20 mg/kg, prion disease occurred later in treated mice and is associated with a slower accumulation of PrP^{Sc} deposits in brain tissue sections compared to control groups. *In vitro* experiments performed on prion-infected brain homogenates to understand the mechanism of action showed that above a threshold of 1 mM, A6 induces a strong precipitation of PrP^{Sc}, with appearance of insoluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers in the pellets. However, at 0.25 mM of A6, rSDS-PrP^{Sc} oligomers were detected in the supernatant suggesting that at lower concentrations, A6 rather promotes soluble toxic species. Our results showed that the α-Ter biopesticide analogue A6 has opposite effects in a wild-type murine model of prion diseases. *In vitro* and *in vivo* exposures to low doses of A6 are likely more prone to induce soluble toxic species leading to shorter survival life in the exposed animals. These results are bringing new openings regarding the potential impact of biopesticides in prion and prion-like diseases.

Results

The biopesticide analogue A6 interacts with PrP fibrils. Previously, we identified from a cellular drug screening on prion-infected cells a family of thienyl pyrimidine compounds allowing us to detect proteinase K (PK) rSDS-PrP^{Sc} oligomers by immunoblotting[15]. Because A6 is an analogue of the compound α-Ter, and was also described for its herbicidal properties, our aim was to determine if α-Ter also exhibit an oligomer-inducing activity on prion-infected cells. In a fast comparison assay, we have incubated prion-infected cellular lysates with various compounds for 1 hour. Then after PK digestion, samples were analysed on immunoblot. The results showed that P30, one of the lead compounds identified is able to induce a strong signal of PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers, as well as A6 and MR100, although in a lesser extend due to their ability to precipitate prions in the tubes. However, α-Ter is not able to induce PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers from cellular lysates, nor has the ability to precipitate prions (Fig. 1a). Thus we decided to focus our study only on A6 compound and further explore the impact of rSDS-PrP^{Sc} oligomers on prion propagation.

In vitro interaction studies such as Surface Plasmon Resonance Studies (SPR or Biacore) to calculate binding affinities between A6 and PrP, were difficult to perform due to A6 insolubility in aqueous buffer[15,26]. However, since α-Ter, the plant molecule from which A6 is derived was originally isolated on its blue-fluorescent properties[27], we thus examined if A6 compound could exhibit the same property. The aim was to perform interaction studies based on A6 intrinsic fluorescence. A broad peak of absorption from 320 nm to 500 nm was found upon spectral analyses as previously described[28]. After excitation at 372 nm, we observed a fluorescent signal with a maximal emission at 460 nm, which is nearly identical to the one of α-Ter ($\lambda_{ex} = 361$ nm and $\lambda_{em} = 428$ nm) (Fig. 1b,c). Taking advantage of these physical properties, we performed interaction studies by following the fluorescence of A6 in presence or in absence of recombinant mouse PrP23–230 proteins, either soluble, folded in α-helices (α-MoPrP) or MoPrP fibrils (Fig. 1b). We observed a minor modification of fluorescence intensity after 2 hours of incubation of A6 with α-MoPrP, compared to the spectrum of A6 alone. By contrast, in presence of PrP fibrils, the maximal fluorescence signal at 460 nm is doubled compared to the control A6 alone. The fluorescence of A6 is strongly enhanced in the presence of PrP fibrils illustrating the binding of A6 with PrP fibrils but not with α-MoPrP (Fig. 1b). These results are consistent with our previous studies showing the specificity of P30

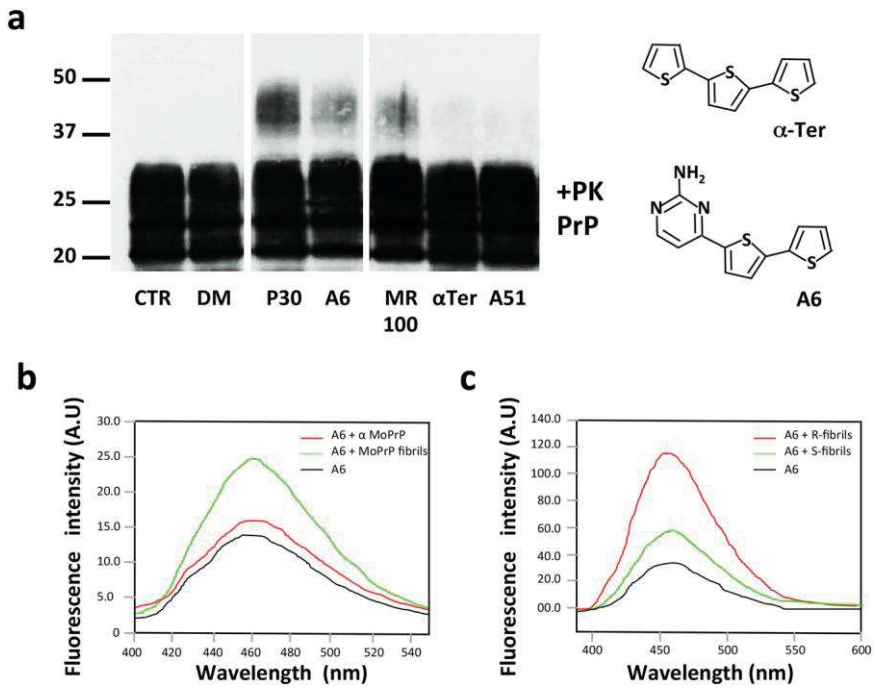


Figure 1. A6 promotes PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers and interacts with PrP fibrils. (**a**) Comparison of several compounds for their ability to induce PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers. Prion-infected N2a58/22L cellular lysates were incubated with 0.5 mM of P30, A6, MR100, α-Ter and A51 for 1 h. Samples were then PK digested at 37 °C for 1 h. Immunoblot was probed with SAF mix antibodies (mixture of three monoclonal anti-PrP antibodies: SAF60, SAF69 and SAF70) for prion detection. Molecular weight markers are indicated on the left side of the immunoblot. The cropped blot is used in this figure and the full-length blot is presented in Supplementary Figure S6. Chemical structures of A6 and α-Ter, 2 compounds described for their herbicidal properties. **(b)** Fluorescence interaction studies between A6 compound and PrP. Purified full-length recombinant mouse PrP (MoPrP23-230) protein, at 4.4 μM, either soluble or fibrillar, were incubated with 50 μM of A6 compound in 1% DMSO, 50 mM MES pH 6, during 2 h at 25 °C. Emission spectra were recorded between 400 and 550 nm by exciting at $\lambda_{ex} = 372$ nm: 50 μM of A6 (black), 50 μM of A6 + α-soluble MoPrP23-230 (red) and 50 μM of A6 + fibrils of MoPrP23-230 (green). **(c)** Interaction studies of A6 compound with hamster PrP fibrils. Hamster-S or -R fibrils at a concentration of 4.4 μM were incubated with 40 μM of A6 compound in 1% DMSO, 50 mM MES pH 6, during 2 h at room temperature. Fluorescence spectra were recorded between 400 and 600 nm: 40 μM of A6 (black), 40 μM of A6 + S-fibrils (green) and 40 μM of A6 + R-fibrils (red).

compound, one of the thienyl pyrimidine family members, towards PrP^{Sc} and not PrP^{C}[15,16]. We also performed fluorescence binding experiments using another model of fibrils, Hamster S- or R-fibrils produced by different agitation modes (shaking or rotated), and displaying distinctive morphologies (R-fibrils are curved, S-fibrils are straight) linked to different folding patterns of cross-β-structures (Fig. 1c)[29,30]. Our aim was to see whether A6 could preferentially bind to hamster S- or R- fibrils. Using the fluorescent property of A6 as a tracer, we showed that the compound interacts with both types of fibrils although the intensity of the fluorescence is higher for R-fibrils (about 5 fold) than S-fibrils (about 2 fold) by comparison to the A6 spectrum alone (Fig. 1c).

Treatment of prion-inoculated mice with 5 mg/kg of A6 decreased their survival time with a faster accumulation of PrP^{Sc} in their brains. Because A6 interacts with recombinant PrP fibrils and has the ability to form PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers in prion-infected cells, our objective was to determine if we could form those oligomers *in vivo* and if they could have an impact on prion propagation and animals' survival. Groups of animals were inoculated with 22L prion strain into the striatum through stereotaxic surgery to have precision in the injection site and in the volume injected. Indeed, it has been showed that the median survival time of mice challenged with prions varies with the brain inoculation site[31]. Mice were then treated with 5 mg/kg of A6 or with an equivalent volume of the solvent alone (50 μL of pure DMSO) by intra-peritoneal (i.p.) route (Fig. 2a). The treatment started one week after mice infection, twice a week for 5 weeks. All the prion-infected animals developed the disease and were sacrificed at the terminal stage, while PBS-inoculated mice remained healthy during the whole experiment, whatever the treatment was, DMSO or A6 (Fig. 2a). As shown in Fig. 2b, the median survival time ± IQR (interquartile range) of prion-infected mice treated with 5 mg/kg of A6 is significantly shorter than the control group having received 50 μL of pure DMSO, 167 ± 19 and 182 ± 5 days post-injection (dpi), respectively (Fig. 2a,b). Statistical significant difference between curves was performed using Log-rank (Mantel-Cox) test based on median survival time (p-value = 0.0067 **, n = 18), represented in a box-and-whiskers graph expressed as median values with 10 and 90 percentile interval (Supplementary Fig. S1a). When the first mouse in the A6-treated group needed to be euthanized (147 dpi), we also sacrificed animals in

a

Inoculum	Treatment	Group	Sick animals / total animals	Median survival time ± IQR
PBS	DMSO	-22L+DM	0/5	-
PBS	A6 5mg/kg	-22L+A6-5	0/5	-
22L	DMSO	+22L+DM	8*/9	182 ± 5
22L	A6 5mg/kg	+22L+A6-5	9/9	167 ± 19

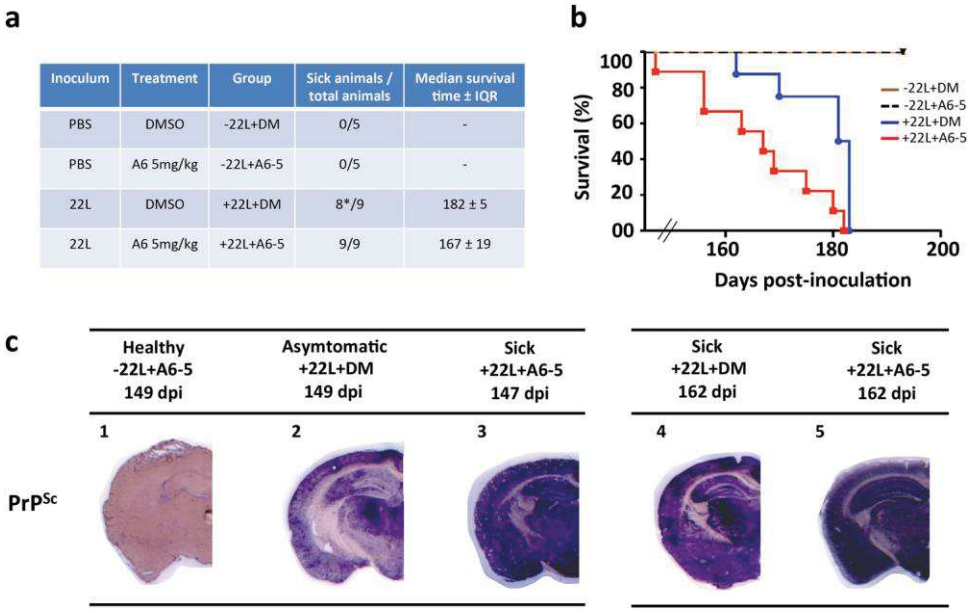


Figure 2. Mice treated with 5 mg/kg of A6 compound exhibit a decreased lifespan and an increased PrP^{Sc} burden. (**a**) Table summarizing the different groups of animals: prion inoculations, treatment performed, number of sick animals out of total number of animals (*means that in this group, one mouse was sacrificed while asymptomatic) and median survival time ± IQR (interquartile range). **(b)** Kaplan-Meier survival curves of mice intra-cerebrally (i.c.) inoculated with 5 µL of 22L prions, and treated with 50 µL of DMSO (n = 9, blue) or with 5 mg/kg of A6 (n = 9, red) by intraperitoneal (i.p.) route, (+22L + DM versus +22L + A6–5: non–parametric Mantel-Cox log-rank test, ** *p*-value = 0,0067). Healthy control mice, inoculated with 5 µL of PBS, were treated with 5 mg/kg of A6 (n = 5, black dashed, −22L + A6–5) or non-treated (n = 5, brown, −22L + DM). **(c)** Left panel: PET-blots analysis of coronal sections of control healthy mice non-inoculated with prions and treated with 5 mg/kg of A6 (−22L + A6–5) **(1)**; mice inoculated with 22L prions and either treated with DMSO (+22L + DM) **(2)** or treated with A6 (+22L + A6–5) **(3)**. Mice were all sacrificed at the same time (149, 149 and 147 dpi respectively) either in an asymptomatic or sick stage. Right panel: PET-blots analysis of coronal sections of sick mice: +22L + DM **(4)** and +22L + A6–5 **(5)** sacrificed at the same time (162 and 163 dpi, respectively). Sections were labelled with SAF84 antibody to detect PrP^{Sc} and revealed with Vectastain ABC-AmP kit.

the control groups: a DMSO-treated mouse and a PBS-inoculated mouse treated with 5 mg/kg of A6, nearly at the same time (149 dpi), even though they were without symptoms, in order to compare prion levels in their brains (Fig. 2c,1–3). Histological analyses using the PET-blot technique allow us to evaluate PrP^{Sc} deposits in brain tissue sections. It is rather a qualitative than quantitative method, allowing us to see the aggregation state in the brain between different groups at a given point. Our results showed that prion-inoculated mice treated with A6 has accumulated a substantial amount of PrP^{Sc} in the brain compared to the asymptomatic DMSO treated mouse, suggesting that the treatment with A6 induces a faster accumulation of PrP^{Sc} than in the control group. This result is consistent with the shorter median survival time observed for prion-infected mice treated with A6, suggesting that mice died earlier because they have accumulated PrP^{Sc} more quickly in their brains. As expected, the non-inoculated mice treated with A6 compound did not exhibit PrP^{Sc} deposits in their brains. Comparison of mice at the terminal stage of the disease (162–163 dpi) (Fig. 2c,4–5) showed that PrP^{Sc} deposits are equivalent in the brain tissue sections of the mice treated with A6 compared to DMSO-treated mice. To confirm that animals died of prion disease, histopathological analyses were done to check for spongiosis, by a Hematoxylin/Eosin (HE) staining (Supplementary Fig. S2a–d) and for astrogliosis, by GFAP immunolabelling (Supplementary Fig. S2e–h) on brain tissue sections of animals treated with DMSO or with A6 at 5 mg/kg. These two parameters are rather qualitative markers and informative of the pathological prion status of the animals.

Treatment of prion-inoculated mice with 10 and 20 mg/kg of A6 increased the survival time of animals with a slower accumulation of PrP^{Sc} in their brains. Because the treatment of prion-infected mice with 5 mg/kg of A6 led to shorter survival time and faster accumulation of PrP^{Sc} deposits in mice, our aim was to evaluate the effect of higher concentrations of A6, as 10 and 20 mg/kg, to see if the treatment can worsen or not the pathology. As expected, all the mice inoculated with 22L prion strain developed the disease, whereas PBS-inoculated animals did not, either they were treated with pure DMSO (100 µL) or A6 at 20 mg/kg (Fig. 3a). Surprisingly, mice treated with 10 and 20 mg/kg of A6 presented an increase of their survival time compared to the DMSO-treated group (Fig. 3b). The median survival time ± IQR of prion-infected mice treated with 10 and 20 mg/kg of A6 are 178 ± 8 and 180 ± 5 dpi, respectively, which are significantly higher than the 166 ± 13 dpi of the DMSO-treated group (Fig. 3a,b). Statistical significant difference between curves was calculated using Log-rank (Mantel-Cox) test based on median survival time for A6 groups *versus* DMSO (*p*-values < 0.05

a

Inoculum	Treatment	Group	Sick animals / total animals	Median survival time ± IQR
PBS	DMSO	-22L+DM	0/4	-
PBS	A6 20mg/kg	-22L+A6-20	0/5	-
22L	DMSO	+22L+DM	12/12	166 ± 13
22L	A6 10mg/kg	+22L+A6-10	10*/12	178 ± 8
22L	A6 20mg/kg	+22L+A6-20	10*/13	180 ± 5

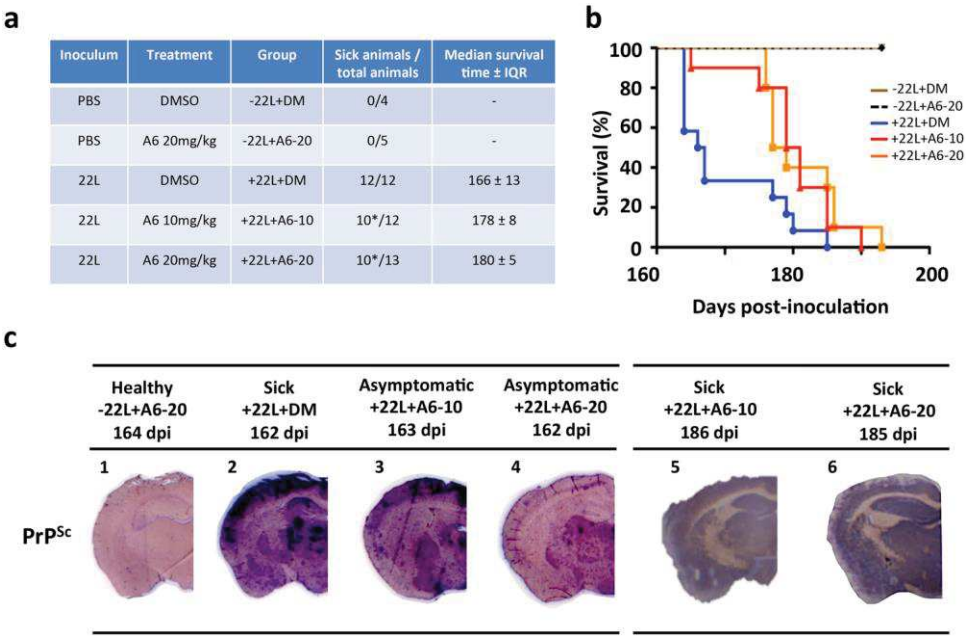


Figure 3. Mice treated with 10 and 20 mg/kg of A6 showed an increased survival time with a slower accumulation of PrP^{Sc} in their brains. (**a**) Table summarizing the different groups of animals (*means that in this group, 2–3 mice were sacrificed while asymptomatic). (**b**) Kaplan-Meier survival curves of mice i.c. inoculated with 5 µL of 22L prions, and treated i.p. either with 100 µL of DMSO (n = 12, blue), or with 10 mg/kg (n = 12, red) or 20 mg/kg of A6 (n = 13, orange) (+22L + DM versus +22L + A6–10: non–parametric Mantel-Cox log-rank test, *p-value = 0,012 and Wilcoxon test, **p-value = 0,0092. + 22L + DM versus +22L + A6–20: non-parametric Mantel-Cox log-rank test, *p-value = 0,016 and Wilcoxon test, **p-value = 0,0092). (**c**) Left panel: PET blot analysis of coronal tissue sections of healthy mice non-inoculated with prions and treated with 20 mg/kg of A6 (−22L + A6–20) (**1**); mice inoculated with prions and treated with equivalent volume of DMSO (+22L + DM) (**2**); mice inoculated with prions and treated either with 10 mg/kg of A6 (+22L + A6–10) (**3**), or 20 mg/kg of A6 (+22L + A6–20) (**4**). All mice were sacrificed at the same time either in an asymptomatic or sick status for comparison of amyloid load (164, 162, 163 and 162 dpi, respectively). Right panel: PET-blots analysis of sick mice: +22L + A6–10 (**5**) and +22L + A6–20 (**6**). Sections were labelled with SAF84 antibody to detect PrP^{Sc} and revealed with Vectastain ABC-AmP kit.

*n = 32) represented in a Box-and-whiskers graph expressed as median values with 10 and 90 percentile interval (Supplementary Fig. S1b). Thus, by increasing the concentration of A6 from 5 to 10 and 20 mg/kg, the effect observed on animal lifespan is opposite. As we previously did, when the first mouse in the DMSO-treated group needed to be euthanized (162 dpi), we also sacrificed animals at the same time in the A6-treated groups presenting no symptoms, as well as a healthy mouse non-inoculated with prions and treated with A6 at 20 mg/kg. In this way, we can evaluate prion levels in their brains at the same time and the impact of the A6 treatment at 10 and 20 mg/kg on prion propagation and aggregation. Histological analyses using PET-blot technique allow us to detect PrP^{Sc} deposits in animal brain tissues (Fig. 3c). Remarkably, we can see that the levels of PrP^{Sc} deposits are inversely proportional to the concentration of A6: the more A6 is concentrated, the less we observed PrP^{Sc} deposits in their brains (Fig. 3c,1–4). Our results suggest that the treatment with A6 slows down the rate of accumulation of PrP^{Sc} compared to the control group treated with DMSO. These results are consistent with the median survival times observed for prion-infected mice treated with A6 at 10 and 20 mg/kg, suggesting that mice die later, likely because they have accumulated PrP^{Sc} more slowly in their brains. Comparison of mice at the terminal stage of the disease (185 dpi) showed that PrP^{Sc} deposits are equivalent in brain tissue sections between the prion-inoculated groups (Fig. 3c,5–6). Histopathological analyses were also performed to confirm the presence of spongiosis (Supplementary Fig. S3a,1–6) and astrogliosis (Supplementary Fig. S3b,1–6) in brain tissue sections of animals. Results confirmed that all sick mice died of prion disease.

Mice treated with 5 mg/kg of A6 did not revealed PK SDS-resistant PrP^{Sc} oligomers in their brains. We then analysed brain homogenates of animals treated with A6 at 5 mg/kg to see if they contain some PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers, as observed previously when prion-infected cells were treated with A6. Brain tissue samples, with normalized protein amounts, were PK-digested during 1 h at 37 °C and reactions were stopped by addition of a protease inhibitor cocktail. Samples were analysed by immunoblotting, using the SAFmix anti-PrP antibodies, as we showed that this mix specifically recognized the rSDS-PrP^{Sc} oligomers[15,26]. Brain homogenates of animals treated with A6 at 5 mg/kg did not revealed the presence of PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers (Fig. 4a), and there is no difference in signal intensity between A6-treated animals and control samples either from non-treated (CTR), or DMSO-treated animals. Thus, A6 compound at a concentration of 5 mg/kg is not able to induce detectable PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers *in vivo* suggesting that the shorter survival time observed in this group is not

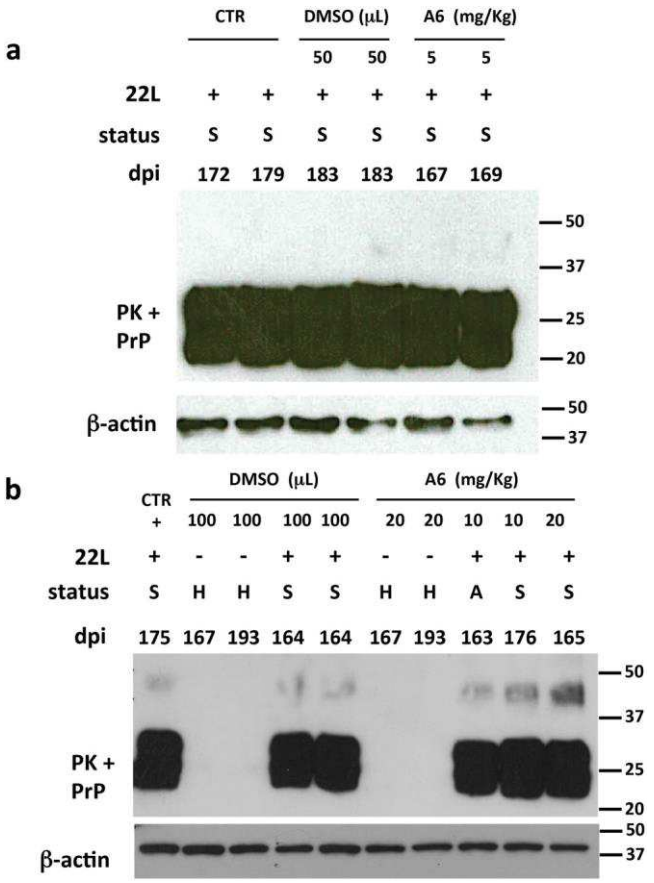


Figure 4. PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers are not detected in the brain of mice treated with 5 mg/kg of A6 but are present in mice brains treated with 10 and 20 mg/kg of A6. (**a**) Brain homogenates from sick (S) mice inoculated with 22L prion strain (+) and either non-treated (CTR) or treated with DMSO (50 µL), or with 5 mg/kg of A6 compound, were PK-digested (PK+) at 37 °C for 1 h. Reaction was stopped by a cocktail of proteases inhibitor. Samples were analysed by immunoblotting using SAF mix antibodies able to detect PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers. Numbers indicate the incubation time of animals (days post-inoculation, dpi) starting after prion infection. Protein loading controls were performed using an anti-β-actin antibody on each sample, taken before PK digestion. Molecular weight markers are indicated on the right side of immunoblots. (**b**) Brain homogenates from mice inoculated (+) or not (−) with the 22L prion strain, were either non-treated (CTR), or treated with DMSO (100 µL) or with 10 or 20 mg/kg of A6 compound, and were analysed by immunoblotting after PK digestion (PK+). General mice status at the time of the sacrifice is indicated by capital letters (S: sick, H: healthy and A: asymptomatic). Numbers indicate the incubation time of animals (days post-inoculation, dpi) starting after prion infection. Immunoblots were probed with SAF mix antibodies for prion detection or with anti-β-actin antibody, as protein loading controls. Molecular weight markers are indicated on the right side of immunoblots.

linked to these oligomeric species. No difference in the monomeric bands of PrP^{Sc} (20–37 kDa) is seen as all the brain homogenates analysed are at the terminal stage of the disease, which is consistent with the PET-blots at the terminal stage of the disease (Fig. 2c,3–5).

PK-resistant PrP^{Sc} oligomers are clearly detectable in the brain of mice treated with 20 mg/kg of A6. Brain homogenates of animals treated with A6 at 10 and 20 mg/kg were also analysed for the presence of PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers (Fig. 4b). For each sample, protein levels were measured and normalized in order to have equivalent protein amounts. Immunoblots were performed on samples, after PK digestion as described above. Immunoblots showed that brains from animals treated with higher concentrations of A6 present detectable levels of PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers. Interestingly, the levels of PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers are proportional to the concentration of A6: much more oligomers are present in the animals treated with 20 mg/kg of A6 compared to those treated with 10 mg/kg. Regarding the control groups treated with DMSO, traces of PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers were observed corresponding to background levels (Fig. 4b). The loading charge control was done using an anti-β-actin antibody and confirmed that all samples were equivalently loaded on the gel (Fig. 4b). Animals non-inoculated with prions that were either treated with DMSO, or with 20 mg/kg of A6, did not present any PrP^{Sc} as expected. No difference in the monomeric bands of PrP^{Sc} (20–37 kDa) is seen as all the brain homogenates analysed are at the terminal stage of the disease, excepted for the asymptomatic mouse treated with 10 mg/

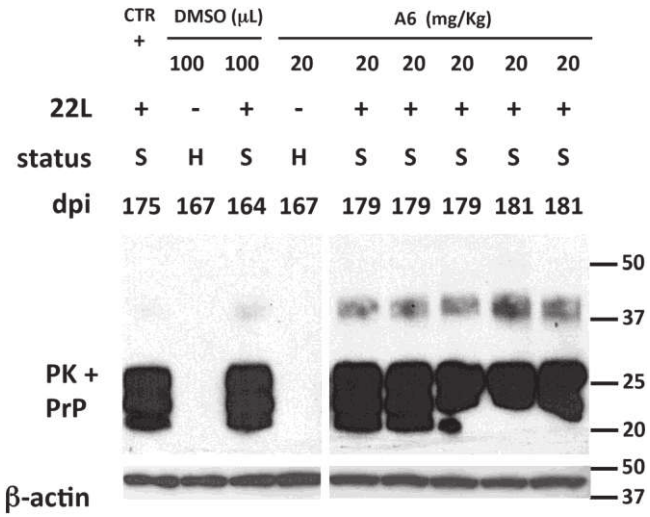


Figure 5. PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers are present in all the brains of mice treated with 20 mg/kg of A6. Brain homogenates of mice non treated (CTR); treated with DMSO (100 µL) or treated with 20 mg/kg of A6 compound, challenged (+) or not (−) with the 22L prion strain, were PK-digested. Samples were analysed by western blot using SAF mix antibodies showing PK resistant oligomers of PrP^{Sc}. Capital letters below each lane correspond to the general mice status at the time of sacrifice (S: sick; H: healthy). Numbers indicate the incubation time of animals (days post-inoculation, dpi) starting after prion infection. An anti-β-actin antibody was used as protein-loading controls, before PK digestion of samples. Molecular weight markers are indicated on the right side of each panel. The cropped blot is used in this figure and the full-length blot is presented in Supplementary Fig. S7.

kg that presented less monomeric PrP^{Sc} as expected (Supplementary Fig. S4). In order to confirm the presence of PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers in A6-treated mice at 20 mg/kg, we analysed brain homogenates of five different animals sacrificed at the terminal stage of the disease (Fig. 5). The immunoblot showed that all animals analysed exhibit these PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers illustrating the fact that treatment with higher doses of A6 can induce PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers *in vivo*.

Above a threshold of 1 mM, A6 induces a strong precipitation of PrP^{Sc} with appearance of rSDS-PrP^{Sc} oligomers in all fractions. The *in vivo* effects observed are visibly dependent on the concentration of A6 used. A6 compound is structurally related to another one, named MR100 that possesses a strong capacity to precipitate and aggregate prions *in vitro* with formation of rSDS-PrP^{Sc} oligomers on western blot. These properties have led to a diagnosis assay, called RCA (Rapid centrifugation assay) avoiding PK digestion step[26]. Due to the structural analogy between MR100 and A6 (Fig. 6a), and because A6 is able, as MR100, to induce rSDS-PrP^{Sc} oligomers on western blot, we believed that A6 could have the capacity to precipitate and aggregate prions *in vitro*. Thus, we have tested on a prion-infected brain homogenate, a range of concentrations of A6 (from 0.25 mM to 1.5 mM) using the same RCA protocol we previously developed with MR100, and by replacing MR100 compound by A6[26] (Fig. 6). After 1 hour of incubation of the brain homogenate with the molecule, samples were centrifuged briefly at 8 000 g for 5 min, and pellets (P) and supernatants (S) were analysed on western blot. We used MR100 as a positive control of the aggregation, and the orange precipitate is clearly visible in the tube after centrifugation (Fig. 6b). A yellow precipitate is also clearly distinguished in A6 treated samples, which size is proportional to the concentration used (Fig. 6b), suggesting that A6 has the capacity to aggregate prions such as MR100. Western blot showed that consecutive to MR100 incubation, prions are mainly concentrated in the pellet fraction, with formation of rSDS-PrP^{Sc} oligomers (Fig. 6c). DMSO, used with an equivalent volume of the highest concentration of A6 (150 µL), was used as a negative control. Results showed that the solvent is not able to precipitate prions in the pellet and to form rSDS-PrP^{Sc} oligomers. Western blot analysis showed that at low concentrations (0.25 to 0.5 mM), prions mostly remained in the supernatant as soluble species with the presence of soluble rSDS-PrP^{Sc} dimers (Fig. 6c, left white square). At 1 mM of A6, an aggregation threshold occurred and immunoblot revealed the presence of rSDS-PrP^{Sc} oligomers in both supernatant and pellet (Fig. 6c). For concentrations above 1 mM, rSDS-PrP^{Sc} oligomers are more abundant in the pellet (Fig. 6c, right white square). Thus, A6 exhibit aggregation capacity towards prions, which is concentration-dependent. In order to estimate the proportion of rSDS-PrP^{Sc} oligomers within and between doses, we performed densitometry analyses on several independent RCA gels. Then, the ratio of rSDS-PrP^{Sc} oligomers in the pellet versus oligomers in the supernatant was calculated for each concentration and presented as a histogram (Fig. 6d). Results showed that the proportion of oligomers in the pellet versus oligomers in the supernatant is about 10 times higher at high doses (ratio of 1.7) compared to low doses (ratio of 0.16) (one-way ANOVA, $^{**}p$-value = 0.0086).

This aggregation property of A6 compound likely reflects the difference observed *in vivo* regarding the incubation time and the rate of accumulation of prions in the brain of animals. Interestingly, RCA aggregation experiment with normal brain homogenate as a control was performed to see if A6 could also precipitate the normal

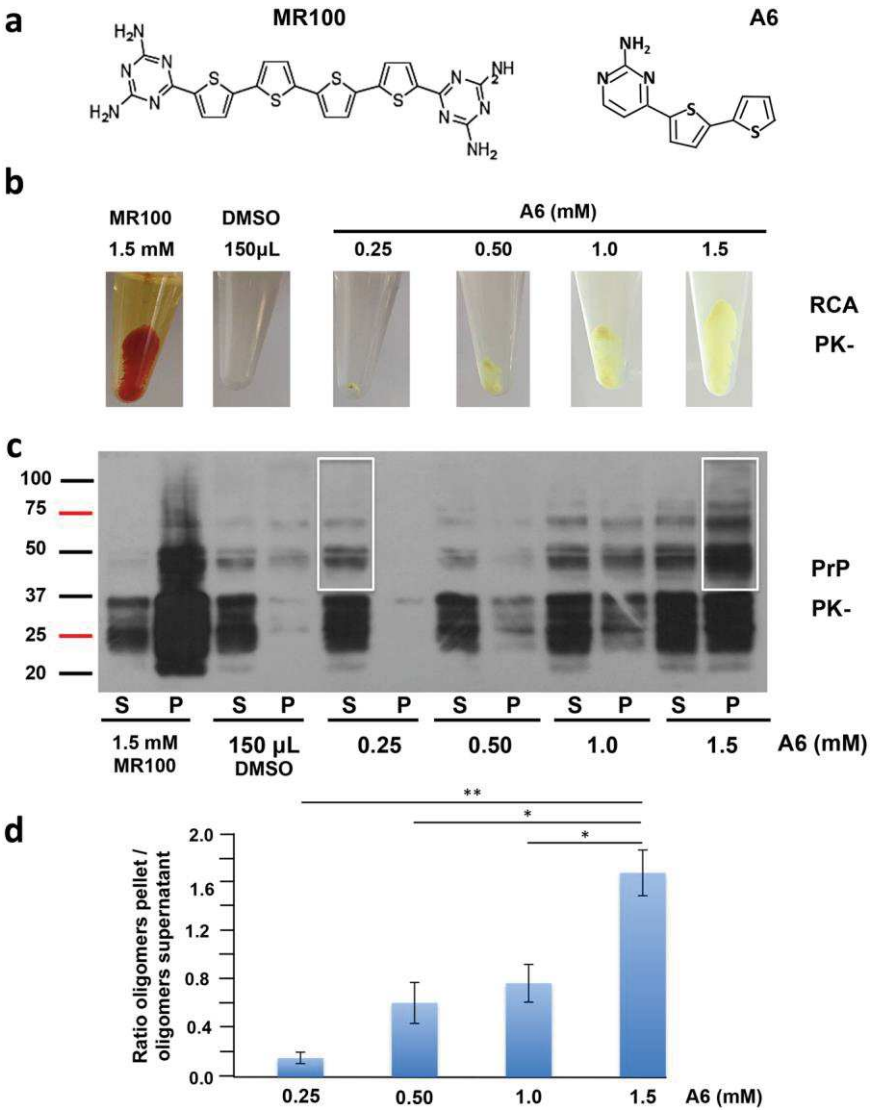


Figure 6. A6 induces *in vitro* soluble and/or insoluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers in a dose dependent manner. **(a)** Chemical structures of MR100 and A6 compounds. **(b)** Representative images of yellow precipitates after Rapid Centrifugation Assay (RCA)[26]. Prion-infected brain samples (50 µL) were incubated with 1.5 mM of MR100 compound (positive control), or with an equivalent volume of DMSO (150 µL, negative control), or with a range of concentrations of A6 compound (from 0.25 mM to 1.5 mM) according to RCA protocol described previously and performed without PK digestion (PK-). After a centrifugation step, a visible precipitate appeared for MR100 (orange colour) and A6 (yellow colour) but not for DMSO sample. The size of the pellet is proportional to the concentration of A6. **(c)** Western blot analysis of the supernatants and pellets after samples were processed by RCA. Immunoblot was probed with SAF mix antibodies to detect the presence of rSDS-PrP^{Sc}. Molecular weight markers are indicated on the left side of the panel. **(d)** Histogram representing the ratio of the levels of oligomers in the pellet versus oligomers in the supernatant for each concentration of A6. One-way ANOVA (**p-value = 0.0086) followed by Tukey's multiple comparison test was performed for statistical significance (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$).

PrP^{C} (Supplementary Fig. S4), as previously described for MR100 compound[26]. Pictures of the tubes showed that A6 pellets are visible but much smaller compared to the assay with infected brain homogenates (Fig. 6b), and the size of the pellets is not concentration-dependent (Supplementary Fig. S5). Remarkably, the immunoblot analysis showed that A6 is not able to precipitate PrP^{C} (Supplementary Fig. S5), by contrast to MR100 compound as described previously[26].

Discussion

Public concerns over the use of synthetic pesticides are growing since many studies have now shown their impact on human health including different kinds of cancers and neurodegenerative disorders[1,32–34]. Over the last decade, a new environmental movement in the occidental countries, promoting an organic agriculture has allowed the use of some botanical pest control and favoured the rebirth of botanical biopesticides[19]. Among them, the

α-terthienyls (α-Ter), also called thiophenes, found in abundance in the roots of *Tagetes* species (family of Asteracea), are a powerful class of insecticides very efficient against larvae of several species of mosquitos[18–20]. Because regulations regarding the natural insecticides appeared softer than for the synthetics, one can also ask whether biopesticides are harmless or not for the human health.

In the present study, we showed a dual effect of A6 (Fig. 7), an analogue of α-Ter described for its herbicidal property, on prion propagation depending on the doses administered.

At the lowest dose of 5 mg/kg: the treatment with A6 compound accelerates the prion pathology, with appearance of earlier PrP^{Sc} deposits and the survival time of mice is significantly reduced. However no PK rSDS-PrP^{Sc} dimers could be detected in brains (Fig. 7a)[15]. To analyse the aggregation property of A6 compound on prions, we performed an *in vitro* assay, the RCA described previously[26]. Our results on RCA showed that at the lowest dose of 0.25 mM, A6 can induce rSDS-PrP^{Sc} oligomers that were detected in the supernatant but not in the pellet, which means that those species are soluble (Fig. 7a). Thus, at lower concentrations, A6 rather promotes soluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers (ratio pellet/supernatant: 0.16, Fig. 6d), usually considered as neurotoxic species, which is consistent with our *in vivo* results of A6-treated mice at the lowest dose of 5 mg/kg exhibiting shorter incubation time.

At the highest doses of 10 and 20 mg/kg, we observed an opposite effect: A6 treatment delays the appearance of PrP^{Sc} deposits in mice brains and their survival times are significantly increased (Fig. 7b). We could also detect PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers in all brain homogenates of mice treated with 10 or 20 mg/kg that were analysed. The detection of PK rSDS-PrP^{Sc} dimers in the group of mice treated with 10 and 20 mg/kg of A6, but not in the group treated with 5 mg/kg, strongly suggests that these oligomeric species are implicated in the increasing survival time of animals. Those PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers could be either amorphous aggregates trapping a part of prion infectiosity or non-toxic aggregates not able to propagate prions. Our *in vitro* results obtained by the RCA method[26], are in agreement with this hypothesis since at high doses of A6, above 1 mM, prions aggregate into a yellow precipitate, and high levels of insoluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers were detected in the pellet (Ratio Pellet/Supernatant: 1.7, Fig. 6b–d), which is consistent with our *in vivo* results. Although the range of concentrations used *in vivo* and *in vitro* are quite different because the systems used cannot be comparable, one can notice that a ratio of 4 is observed. Indeed, we observed opposite effects *in vivo* between 5 and 20 mg/kg on prion propagation, while the same ratio is observed *in vitro* between 0.25 mM and 1 mM switching from soluble to insoluble PrP^{Sc} oligomers.

In addition, we also detected such kind of insoluble PK rSDS-PrP^{Sc} oligomers in different prion strains, including sporadic (sCJD) and new variant CJD[26] by using MR100 compound, structurally related to A6, with four thiophene cycles instead of two. Remarkably, we showed that levels of rSDS-PrP^{Sc} oligomers are correlated with the length of the symptomatic phase of sCJD patients[26]. The more they are abundant in the brain tissue, the longer is the symptomatic phase of the disease, as if they have a protective role, which is in agreement with our present data of A6-treated mice at high doses. Interestingly, Herrmann *et al.*[35] have shown that Luminescent Conjugated Oligothiophene (LCOs), molecules containing several thiophenes (n = 4–7) have the ability to generate SDS-stable PrP^{Sc} oligomers, very similar to A6, in a transgenic mouse model of prions. Administration of polythiophenes to the brain of prion-infected mice via osmotic minipump led to a survival of 80% and showed an anti-prion activity against mice and hamster strains[35].

Regarding the mechanism of action, we used the fluorescence property of A6 to study the interaction of the compound with either soluble or fibrillar recPrP. A6 is a hydrophobic compound and in aqueous environment its fluorescence is quenched. Upon binding with PrP fibrils, either mouse or Hamster R-fibrils, the environment of A6 is less aqueous and the intensity of the signal is doubled illustrating the interaction protein-molecule. Epifluorescence studies also showed that R-fibrils could be labelled in blue by A6, in a similar way as ThT labelled R-fibrils in green (data not shown). ThT is a referenced fluorescent dye known to interact with beta-sheets of amyloid fibrils suggesting that A6 has a potential to be a tracer to study PrP fibrils. Interestingly, A6 is an analogue of LCOs with two thienyl cycles, and previous studies on LCOs showed that the fluorescent properties of these molecules are exacerbated upon binding with amyloid fibrils, not only PrP but also beta-amyloid peptide, and they have a strong potential as tracer of amyloid deposits in brain tissue[36]. It could be interesting in the future to see if A6 can label other amyloid fibrils such as beta-amyloid peptide and eventually explore its potential as a tracer of amyloid fibrils in Alzheimer's disease tissues.

Our results showed that A6 interacts with PrP fibrils, but how to explain the precipitation observed and the formation of rSDS-PrP^{Sc} oligomers both *in vitro* and *in vivo*?

It was previously described that α-Ter generates oxygen radical species (superoxide anion radical, singlet oxygen) and α-Ter radical[18]. Because A6 interacts with PrP, we can make the hypothesis that A6-PrP• radicals can be generated and re-association of A6-PrP• radicals can lead to rSDS-PrP^{Sc} oligomers covalently bound. Preliminary mass spectrometry experiments with mouse recombinant PrP oligomers did not allow us to demonstrate it (data not shown, Human Rezaï, personal communication). However many reasons such as the fact that the fibrils tested may not be adapted or the necessity of other cofactors could explain it. It has been demonstrated that α-Ter also has the capacity to inhibit several enzymes such as superoxide dismutase and acetylcholinesterase (AChE) both *in vitro* and *in vivo* leading to important consequences in nervous, respiratory and digestive systems of mosquito larvae[18]. Remarkably, a recent study conducted by Torrent *et al.*[37] showed that: (*i*) AChE interacts with PrP monomers and aggregates them; (*ii*) upon AChE interaction with PrP fibrils, a complete rearrangement of the fibrils occurred and the enzyme looses its activity which worsen the cytotoxicity of prions; and (*iii*) in heterozygous AChE knock-out mice ($TgAChE^{+/-}$) presenting 25% decrease in the levels of AChE enzyme, a prolonged survival time was observed when these mice were challenged by prions compared to control wild-type (WT) animals[37]. Thus, we cannot exclude that A6 can impair the homeostasis of AChE, as well as a possible competition of A6 in the complex formed between AChE/PrP. It is likely that a combination of several mechanisms explains the observed phenotype in the mice treated with low or high doses of A6 compound and further experiments will be necessary in the future to clarify them. Our results showed that the α-Ter analogue A6 could trigger soluble or insoluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers that worsen or delay the prion pathology, depending on the doses used. The fact that the lower doses are more toxic than the high

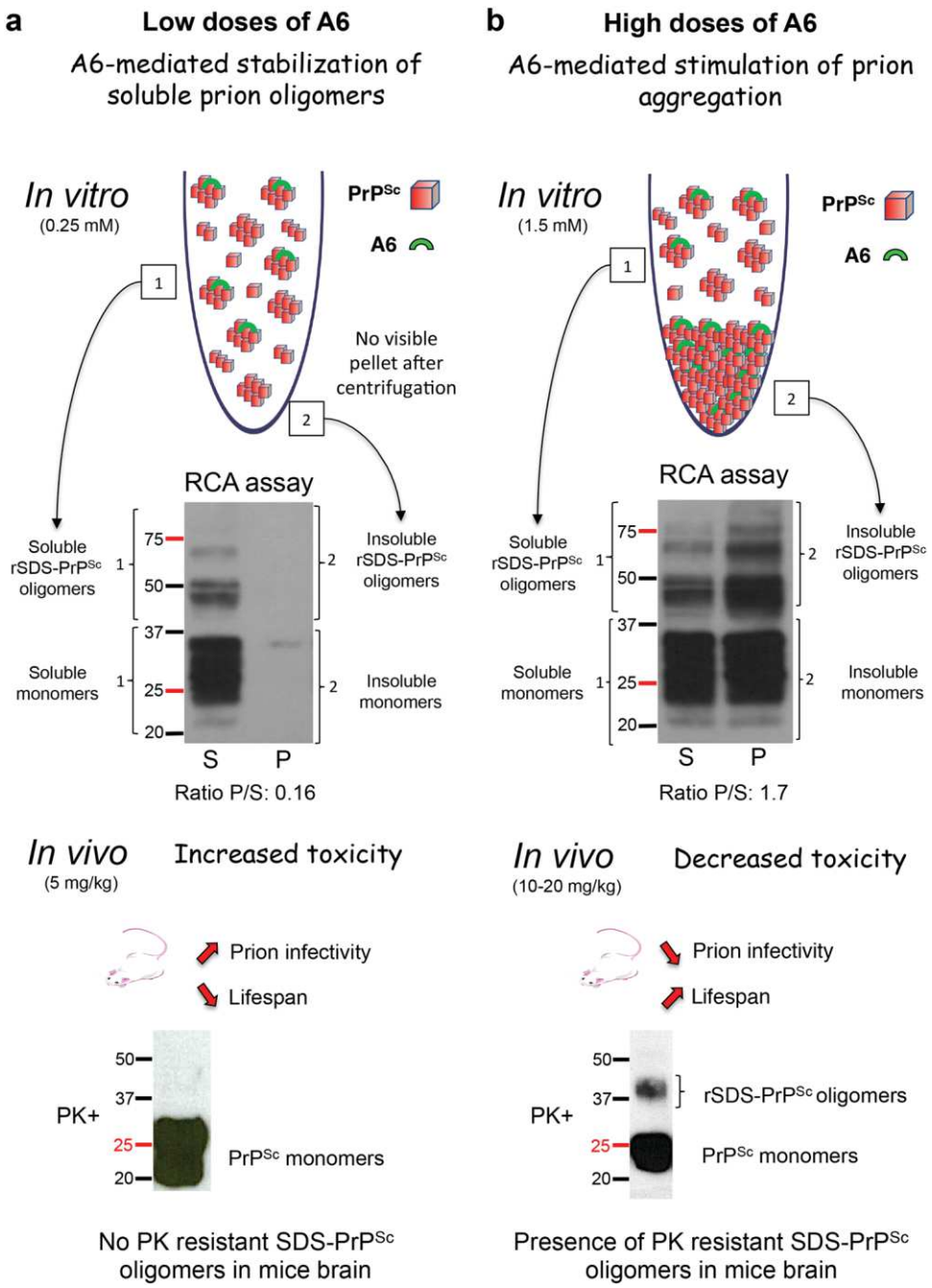


Figure 7. Schema illustrating the dual effect of A6 biopesticide on prion aggregation and propagation. (**a**) A6-mediated stabilization of soluble prion oligomers at low doses. Incubation of prion-infected brain homogenate with a low dose (0.25 mM) of A6 *in vitro*, allows formation of soluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers (50–75 kDa) (1) that remains in the supernatant (S), whereas insoluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers concentrated in the pellet fraction (P) are not formed (2). *In vivo* treatment of mice with a low dose of A6 (5 mg/kg) decreases animals' survival time and increases prion amyloid deposits suggesting that soluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers are toxic. These species are not visible in 5 mg/kg A6-treated mice brains. (**b**) A6-mediated stimulation of prion aggregation at high doses. Incubation of prion-infected brain homogenate with the highest dose (1.5 mM) of A6 *in vitro*, allows formation of insoluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers (50–75 kDa) (2) mainly in the pellet fraction (P). *In vivo* treatment of mice with higher doses of A6 (10 and 20 mg/kg) increases animals' survival time and decreases prion amyloid deposits suggesting that insoluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers are less toxic. These species are quite abundant in mice brains treated with 20 mg/kg of A6, suggesting that insoluble rSDS-PrP^{Sc} oligomers have a rather protective role.

ones, should alert us regarding the pesticides (synthetics or botanical pesticides). Since many pharmacological molecules are originally plant-derived extracts, we should revise our toxicological assays towards low doses for the future development of therapeutics in neurodegenerative disorders.

Materials and Methods

Ethics statement and animal housing. This project follows the specific French national guidelines on animal experimentation and animal well-being and was approved by the French National Ethic Committee for Animal Experimentation (Nr. CE-LR-11001). WT mice (4–6 weeks old) were housed in an A3/L3 biosafety facility, in an enriched environment with cotton pads placed in their cages. Animals had free access to water and food, and were fed under a standard chow diet (A03) (SAFE Diets, France).

Biological reagents and antibodies. Pefabloc and proteinase K were purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The protein assay kit based on the bicinchoninic acid (BCA) was purchased from Pierce (Thermofisher Scientific, Saint Herblain, France). For immunoblotting analyses, we used a mix (SAF mix) of three anti-PrP antibodies (SAF60, SAF69 both recognize epitope 157–161 of HuPrP and SAF70 recognizes epitope 156–162 of HuPrP) that were kindly provided by Dr. Jacques Grassi (CEA, Saclay, France). The SAF69 antibody is critical for detection of PrP oligomers. The SAF84 antibody (epitope 161–170 of HuPrP) used for PET-blot analyses was purchased from SpiBio (Montigny-le-Bretonneux, France). Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). All other chemicals and antibodies were purchased from Sigma (Paris, France).

Chemical reagents. The thienyl pyrimidine compounds A6, α-Ter, P30, A12, A14, A18 and A51 that exhibit or not rSDS-PrP^{Sc} oligomer-inducing activity[15,26] were purchased from Maybridge (Cornwall, United Kingdom) and Key Organics Limited (Cornwall, United Kingdom). Stock solutions were prepared at 5 mM and drugs were solubilized in DMSO according to the suppliers' recommendations. A6 was heated at 80 °C for 10–20 min to reach complete solubility. For the synthesis of MR100 (6,6′-(2,2′:5′,2″:5″,2‴-quaterthiophene-5,5‴-diyl) bis(1,3,5-triazine-2,4diamine)), reactions were carried out as described previously[26]. Drugs are stored in the dark at room temperature.

Cell culture and cell screening assay. The mouse neuroblastoma cell line N2a was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC CCL131). The N2a58 subclone, which over-expresses mouse PrP (MoPrP), was chronically infected with the mouse-adapted scrapie strain 22L (N2a58/22L cells), as described by Nishida *et al.*[38]. N2a58/22L cells were cultured as described previously[15,26]. For drug screening, N2a58/22L cells (~10^6 cells/25-cm^2 flasks) were incubated with the compounds (A6, P30, A12, A14 and A18) at a final concentration of 20 μM (corresponding to 20 μL of drug at 5 mM or 20 μL of solvent alone DMSO, in 5 mL of medium for a T25 plate) for 4 days. At confluence, cells were lysed in 400 μL lysis buffer (0.5% NP-40, 0.5% Deoxycholate, 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl).

For a fast screening of drugs, 500 μL of N2a58/22L cell lysates were incubated with 50 μL of drug (P30, A6, MR100, α-Ter, and A21) at a final concentration of 0.5 mM, for 1 hour at room temperature and processed as described below for western blotting analysis.

Immunoblotting. Protein concentration in cellular lysates was measured using the BCA assay. For western blots, all samples were normalized regarding their protein amounts and volumes. Normalized samples were digested with 20 μg/mL of proteinase K (PK) at a ratio of 1:25 (protease to protein) at 37 °C for 1 h. Digestion was stopped with 1X Complete (Roche, Boulogne-Billancourt, France) and samples were centrifuged at 20 000 g at 4 °C for 30 min. Pellets were dissolved in 20 μL lysis buffer and 20 μL 2X loading buffer (0.1 M DTT, 3% SDS, 20% glycerol, 0.4 M Tris-HCl pH 7.4 and bromophenol blue), then boiled for 3 min before loading on 12% SDS-PAGE Criterion precast gels (Biorad, Marne-La-Coquette, France). Western blotting was performed according to standard procedures and MoPrP was detected with the SAF mix, as mentioned above (Cf. § "Biological reagent and antibodies"). Membranes were revealed with an ECL solution (Luminata Crescendo western HRP substrate, Millipore, Guyancourt, France).

Purification of prion protein and formation of amyloid fibrils. Full-length recombinant mouse PrP encompassing residues 23–230 (MoPrP23–230) was expressed in *E. coli* and purified as described previously[39]. The purified recombinant MoPrP23-230 mostly folded into α-helices was confirmed by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry to be a single species with an intact disulfide bond and correct molecular weight as previously described by Ayrolles-Torro *et al.*[15]. After purification, MoPrP was stored in lyophilized form at −20 °C. Amyloid fibrils using full-length MoPrP23-230 were formed using the manual setup protocol of Breydo *et al.*[40], and fibrils formation was monitored after collecting aliquots to which 10 μM of thioflavin T (ThT) were added[41]. ThT fluorescence emission spectra were recorded after excitation at 450 nm as previously described[25,40]. The quality of freshly made fibrils was also confirmed by transmission electron microscopy as described previously[24]. Fibrils were stored at 4 °C until use for further analyses. Two amyloid strains: hamster S-fibrils (for "shaking") and hamster R-fibrils (for "rotation") were kindly provided by Dr. Ilia Baskakov (University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA). These hamster fibrils were produced *in vitro* using full-length hamster PrP, according to the manual format protocol as described by Makarava *et al.*[29].

Fluorescence spectra. The fluorescent properties of A6 compound were described previously (Nasri *et al.* 2016). The A6 molecule has a $\lambda_{ex} = 372$ nm and a maximal peak of emission of fluorescence at 460 nm. Interaction studies between PrPs (either α-folded or fibrils) and A6 were done by fluorescence and all spectra were recorded from 200–600 nm using a fluorimeter FluoroMax2 (JobinYvon Spex, Tokyo, Japan). Lyophilised MoPrP23-230 was solubilized at 0.5 mg/mL (0.2 mM) in 50 mM MES buffer pH 6, and filtrated on 0.2 μm filter. The α-folded MoPrP23-230 stock solution freshly made and the MoPrP fibrils stored at 4 °C were diluted in 50 mM MES buffer pH 6, at a final protein concentration of 4.4 μM, and mixed with 50 μM of A6 compound, 1% DMSO, during 2 h at

25 °C. Hamster S- or R-fibrils (4.4 μM) were incubated with 40 μM of A6 compound, diluted in 50 mM MES buffer pH 6, 1% DMSO during 2 h at room temperature. Then, fluorescence experiments were conducted as described previously by excitation of the A6 compound at 372 nm.

Aggregation assay. Brains from a terminally sick mouse (infected with 22L prions) or from a non-infected mouse were homogenized in 10% (w/v) sterile PBS solution using microbead-containing tubes and a Ribolysor apparatus (Biorad, Marnes la Coquette, France). Tubes were shaken for 45 s and homogenates were collected with an insulin syringe to obtain a homogeneous suspension, and immediately frozen at −80 °C. Then, we performed the aggregation test with a range of concentrations of A6 by following the protocol of the rapid centrifugation assay (RCA) initially described with the MR100 compound by Imberdis *et al.*[26]. Briefly, 50 μL of 22L-infected brain extracts (10% w/v) were diluted in PBS - 2% Sarkosyl and incubated with 1.5 mM (150 μL) of MR100, as a positive control of RCA, or a range of concentrations of A6 from 0.25 mM (25 μL) to 1.5 mM (150 μL), in a final volume of 0.5 mL for 1 h at room temperature. A sample incubated with 150 μL of DMSO was used as a negative control of RCA, corresponding to the highest concentration used (1.5 mM). Samples were then centrifuged in a benchtop centrifuge (Eppendorf) at 8 000 g for 5 min. Supernatants were removed and 50 μL aliquots were mixed with an equal volume of 2X loading buffer. Pellets were suspended in 50 μL of PBS -2% Sarkosyl and mixed with an equal volume of 2X loading buffer. Supernatants and pellets were analysed by western blotting using SAF mix antibodies.

Prion inoculations. Groups of C57Bl/6J females (n = 10–15 animals/group) were inoculated with 5 μL of 1% brain homogenate infected with 22L prion strain into their striatum using a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) with the following coordinates: L: 2.0 mm; A/P: 0 mm; and D/V: −3.0 mm[42]. For control female mice (n = 10) non-inoculated with prions, 5 μL of PBS was injected into the striatum using the same method and coordinates. In a first series of experiments, mice were treated by intra-peritoneal route with 5 mg/kg of A6 compound (50 μL at 3 mg/mL of A6) or with 50 μL of pure DMSO alone, for 5 weeks starting one week after prion infection. In a second series of experiments, mice were treated with higher concentrations of A6 compound by intra-peritoneal route: either at 10 mg/kg (100 μL at 3 mg/mL A6) or 20 mg/kg (100 μL at 6 mg/mL A6) or with 100 μL of pure DMSO alone, for 12 weeks starting one week after prion infection. For the highest treatment of A6 (10 or 20 mg/kg), the volume injected to mice was doubled due to the poor solubility of A6 (especially at 6 mg/mL). During the experiments, groups of five mice were housed in cages placed in a ventilated protective room. Mice were scored positive for prion disease when three signs of neurologic dysfunction were observed and when progressive deterioration (according to 16 diagnostic criteria) was apparent, as described previously[43,44]. Once clinical signs were detected, the animals were observed daily and killed *in extremis*, as described previously[43,44]. Their brains were removed and immediately frozen at −80 °C for homogenization, or fixed in AntigenFix (Diapath, France) for immunohistochemical analysis.

Immunohistochemistry. Brain tissues were fixed in AntigenFix solution (Diapath, France) for 24 h. Then, they were decontaminated for 30 min in formic acid solution according to the protocol described by Andréoletti *et al.*[45] and stored in 100 mM phosphate buffer at pH 7.4 with 0.02% sodium azide. Samples were dehydrated in graded ethanol, cleared in cedar oil and embedded in paraffin. Using a microtome, 6 μm frontal sections were cut and mounted on Superfrost Plus slides (Microm France, Francheville). Sections were dewaxed and stained with hematoxylin and eosin (HE) as described previously[46]. Immunolabelling with anti-GFAP (1:500; Dako, Les Ulis, France) antibodies was performed according to the instructions provided with the Strept ABC Complex Kit. Labelling was visualized using 3–3′-diaminobenzidine chromogen solution (Sigma, France). For paraffin-embedded tissue blots (PET-blots), 6 μm frontal sections were cut using a microtome and placed on nitrocellulose membrane. After drying at 50 °C for 48 h, sections were dewaxed, digested with 25 μg/mL PK at 56 °C overnight and then denatured with 3 M guanidine thiocyanate for 10 min. Membranes were blocked with casein for 30 min. The SAF84 antibody was used to label PrP^{Sc} and the Vectastain ABC-AmP kit (Vector laboratories, USA) to reveal antibody binding.

Softwares and statistical analyses. Kaplan-Meier survival curves were done using the GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA). The difference between curves was tested using the non-parametric Mantel-Cox test and Wilcoxon test, with a probability of 0.05 defined as a significant difference. Survival times are expressed as median values. Oligomer fractions were quantified using Fiji software (2.0 version 2.0; National Institutes of Health, Bethesda, MD). Statistical analyses were performed on GraphPad Prism software using a one-way ANOVA coupled with a Tukey's multiple comparison test, with a probability of 0.05 defined as a significant difference.

Equipment and settings. The blots presented in Fig. 1, 4–5 and in Supplementary Fig. S4 were revealed with Amersham Hyperfilm ECL (Thermo Scientific, Illkirch, France) by using a Konica medical film processor SRX-101 (Konica Minolta, Amsterdam, Netherlands).

Data availability statement. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J. & Quintanilla-Vega, B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 124 (2015).
2. Schwarzenbach, R. P. *et al.* The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* **313**, 1072–1077 (2006).
3. United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization, World Water Assesment programme. Water for people, Water for Life-the United Nations World water Development Report. Bergham Books, Barcelona (2003).

4. Nougadère, A. *et al*. Total diet study on pesticide residues in France: levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environ. Int.* **45**, 135–150 (2012).
5. Richardson, J. R. *et al*. Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* **71**, 284–290 (2014).
6. European Decision n°2008/217/EC : Commission Decision of 10 April 2008 concerning the noninclusion of rotenone, extract from equisetum and chinin-hydrochlorid in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances. OJ L 108 (2008).
7. Judgment of the court of first instance. Directive 91/414/EEC – Plant protection products – Paraquat as an active substance – Marketing authorisation **–** Authorisation procedure **–** Protection of human and animal health. Case T-229/04. European Court Reports 2007 II-02437 (2007).
8. Tanner, C. M. *et al*. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* **119**, 866–872 (2011).
9. van der Mark, M. *et al*. Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. *Environ. Health Perspect.* **120**, 340–347 (2012).
10. Betarbet, R. *et al*. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* **3**, 1301**–**1306 (2000).
11. Gordon, I., Abdulla, E. M., Campbell, I. C. & Whatley, S. A. Phosmet induces up-regulation of surface levels of the cellular prion protein. *Neuroreport* **9**, 1391–1395 (1998).
12. Purdey, M. The UK epidemic of BSE: slow virus or chronic pesticide-initiated modification of the prion protein? Part 2: An epidemiological perspective. *Med. Hypotheses* **46**, 445**–**454 (1996).
13. Brundin, P., Melki, R. & Kopito, R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 301–307 (2010).
14. Acquatella-Tran Van, B. I., Imberdis, T. & Perrier, V. From prion diseases to prion-like propagation mechanisms of neurodegenerative diseases. *Int. J. Cell Biol.* **2013**, 975832 (2013).
15. Ayrolles-Torro, A. *et al*. Oligomeric-induced activity by thienyl pyrimidine compounds traps prion infectivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 14882–14892 (2011).
16. Imberdis, T., Ayrolles-Torro, A., Verdier, J.-M. & Perrier, V. Thienyl pyrimidine derivatives with PrP(Sc) oligomer-inducing activity are a promising tool to study prions. *Curr. Top. Med. Chem.* **13**, 2477–2483 (2013).
17. Friedman, D. C. S. & Friedman, P. A theoretical-study of 2,2″,5′,2″-Terthiophene (alpha-T) and its analogs.1. Correlation of electronic-structure and energies with herbicidal phototoxicity. *J. Mol. Struct. Theochem* **333**, 71**–**78 (1995).
18. Nivsarkar, M., Cherian, B. & Padh, H. Alpha-terthienyl: A plant-derived new generation insecticide. *Curr. Sci.* **81**, 667–72 (2001).
19. Arnason, J. T., Sims, S. & Scott, I. M. Natural products from plants as insecticides. Phytochem & Pharmacog, UNESCO ECLOSS Report (2012).
20. Marles, R. *et al*. Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of the plant-derived photoxin alpha-terthienyl. *Pharmacol. Toxicol.* **77**, 164–168 (1995).
21. Loi n°2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte, NOR:DEVX1413992L. *JORF* 14–263 (2015).
22. Silveira, J. R. *et al*. The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**, 257–261 (2005).
23. Simoneau, S. *et al*. *In vitro* and *in vivo* neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog.* **3**, e125 (2007).
24. El Moustaine, D., Perrier, V., Smeller, L., Lange, R. & Torrent, J. Full-length prion protein aggregates to amyloid fibrils and spherical particles by distinct pathways. *FEBS J.* **275**, 2021**–**2031 (2008).
25. El Moustaine, D. *et al*. Amyloid features and neuronal toxicity of mature prion fibrils are highly sensitive to high pressure. *J. Biol. Chem.* **286**, 13448**–**13459 (2011).
26. Imberdis, T. *et al*. A Fluorescent Oligothiophene-Bis-Triazine ligand interacts with PrP fibrils and detects SDS-resistant oligomers in human prion diseases. *Mol. Neurodegener.* **11**, 11 (2016).
27. Zechmeister, L. & Sease, J. W. A blue-fluorescing compound, terthienyl, isolated from marigolds. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 273–275 (1947).
28. Nasri, A. *et al*. Neurotoxicity of a Biopesticide Analog on Zebrafish Larvae at Nanomolar Concentrations. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2016).
29. Makarava, N. & Baskakov, I. V. The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *J. Biol. Chem.* **283**, 15988–15996 (2008).
30. Ostapchenko, V. G. *et al*. Two amyloid States of the prion protein display significantly different folding patterns. *J. Mol. Biol.* **400**, 908–921 (2010).
31. Kim, Y. S., Carp, R. I., Callahan, S. M. & Wisniewski, H. M. Incubation periods and survival times for mice injected stereotaxically with three scrapie strains in different brain regions. *J. Gen. Virol.* **68**(Pt 3), 695–702 (1987).
32. Gaspari, L., Paris, F. & Jeandel, C. & Sultan, C. Peripheral precocious puberty in a 4-month-old girl: role of pesticides? *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* **27**, 721–724 (2011).
33. Gaspari, L. *et al*. High prevalence of micropenis in 2710 male newborns from an intensive-use pesticide area of Northeastern Brazil. *Int. J. Androl.* **35**, 253**–**264 (2012).
34. Paris, F., Gaspari, L., Servant, N., Philibert, P. & Sultan, C. Increased serum estrogenic bioactivity in girls with premature thelarche: a marker of environmental pollutant exposure? *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* **29**, 788–792 (2013).
35. Herrmann, U. S. *et al*. Structure-based drug design identifies polythiophenes as antiprion compounds. *Sci. Transl. Med.* **7**, 299ra123 (2015).
36. Klingstedt, T. *et al*. The structural basis for optimal performance of oligothiophene-based fluorescent amyloid ligands: conformational flexibility is essential for spectral assignment of a diversity of protein aggregates. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **19**, 10179–10192 (2013).
37. Torrent, J. *et al*. Interaction of prion protein with acetylcholinesterase: potential pathobiological implications in prion diseases. *Acta Neuropathol. Commun.* **3**, 18 (2015).
38. Nishida, N. *et al*. Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J. Virol.* **74**, 320**–**325 (2000).
39. Rezaei, H. *et al*. High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2833**–**2839 (2000).
40. Breydo, L., Makarava, N. & Baskakov, I. V. Methods for conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **459**, 105**–**115 (2008).
41. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. & Takeda, T. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* **177**, 244**–**249 (1989).
42. Paxinos, G. & Francklin, K. B. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed. Elsevier: Academic Press (2012).
43. Carlson, G. A. *et al*. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell* **46**, 503–511 (1986).
44. Scott, M. *et al*. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59**, 847**–**857 (1989).
45. Andréoletti O. PrPSc Immunohistochemistry (ed. Lehmann, S., Grassi, J.). 82–96 (Tech. Prion, 2004). Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7949-1_7.
46. Toupet, K. *et al*. Effective gene therapy in a mouse model of prion diseases. *PloS One* **3**, e2773 (2008).

Acknowledgements

This study was supported by grants from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), from Alliance Biosecure (AAP 2010, AAP 2012) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) under the program 'Investissements d'Avenir' with reference ANR-11-LABX-0021-LipSTIC. WY is the recipient of a fellowship from the China Scholarship Council under the PHC CAI YUANPEI 2014–16 project n° 32106RD. We are very grateful to Pr. Jean-Michel Verdier for supporting this project. We thank Drs. Baskakov and Makarava for the gift of the Hamster R- and S-PrP fibrils and their help for fluorescence studies. We thank J-D Arnaud (CECEMA of Montpellier) for his support in animal care.

Author Contributions

P.A.L., T.I. and V.P. conceived the study, participated in its design and interpretation and wrote the manuscript. P.A.L., T.I., Y.W., J.T., E.H. and V.P. performed the experiments and analysed data. M.R. performed the chemical synthesis of MR100. MTAM helped for the *in vivo* experiments performed in the A3 facility. N.C., L.G., C.D. and J.L. provided constructive criticisms for manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

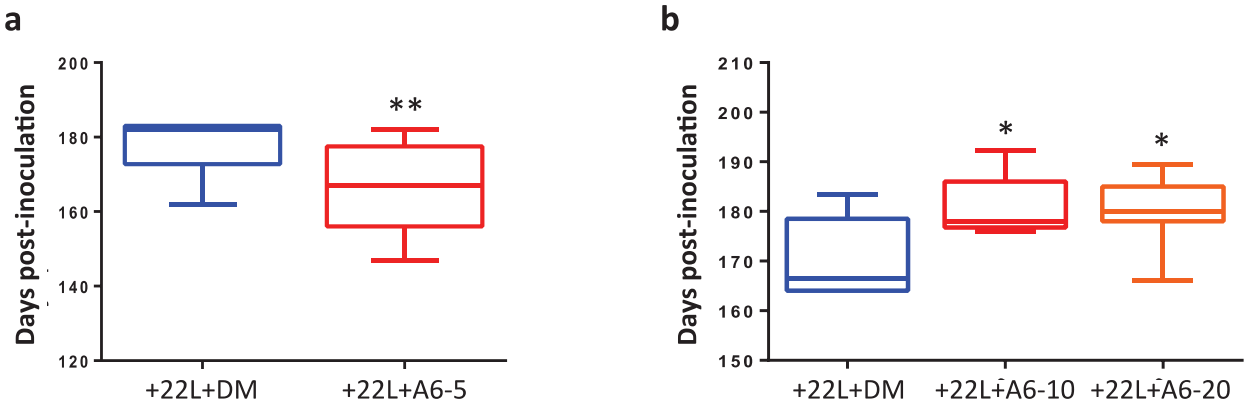
Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-018-25966-9.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

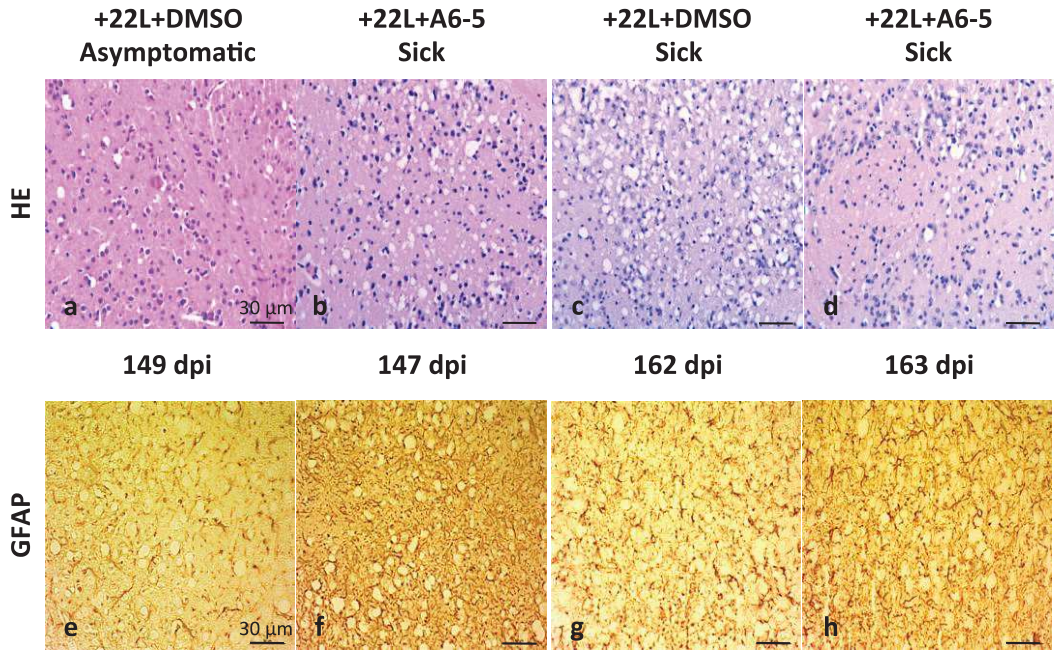
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2018

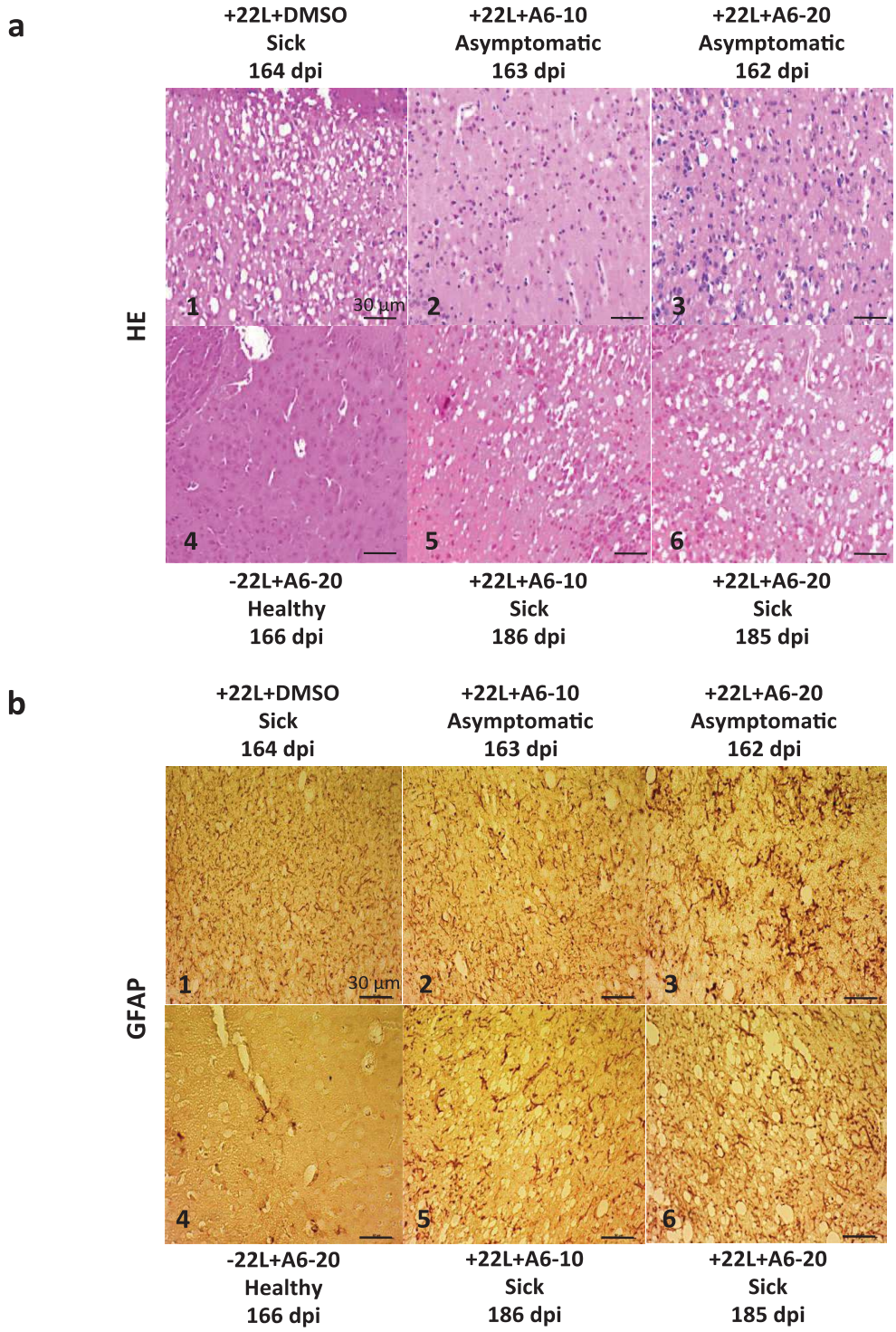


Groups	+22L+DM (50μL)	+22L+A6-5	+22L+DM (100μL)	+22L+A6-10	+22L+A6-20
Median survival time	182	167	166	178	180

Supplementary Fig. S1. Box-and-whiskers representation of the lifespan of animals treated with various concentrations of the bioherbicide A6. (a) Box-and-whiskers representation of the median survival time of plots presented in Figure 2b. The median survival time of +22L+DM (182 dpi) and of +22L+A6-5 mice (167 dpi) are statistically different (non–parametric Mantel-Cox log-rank test, ** *p*-value = 0.0067). **(b)** Box-and-whiskers representation of the median survival time of plots presented in Figure 3b. The median survival time of +22L+DM (166 dpi), +22L+A6-10 (178 dpi) and +22L+A6-20 (180 dpi) are statistically different (+22L+DM versus +22L+ A6-10: non–parametric Mantel-Cox log-rank test, **p*-value = 0,012 and Wilcoxon test, ** *p*-value = 0.0092. +22L+DM versus +22L+A6-20: non-parametric Mantel-Cox log-rank test, * *p*-value = 0.016 and Wilcoxon test, ** *p*-value = 0.0092).

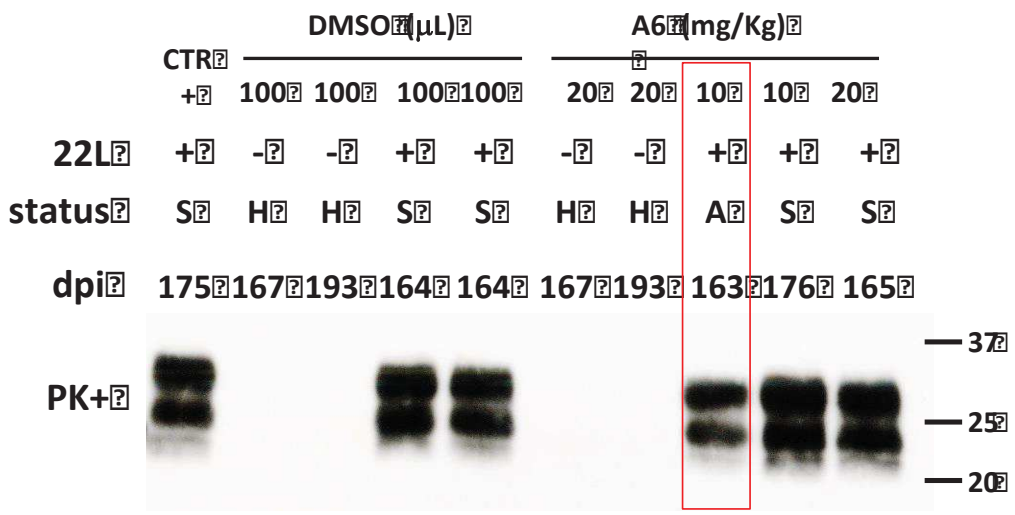


Supplementary Fig. S2. Analyses of spongiosis and astrogliosis in brain tissue sections of mice treated with 5 mg/kg. Representative images of coronal sections stained with Hematoxylin and Eosin (HE) for spongiosis analysis **(a-d)**, or labelled with anti-GFAP antibody for astrogliosis (E-H) in the paraventricular nucleus (PVN) area. Groups of animals described as followed: mouse +22L +DMSO sacrificed at 149 dpi while still asymptomatic **(a,e)** and a sick mouse +22L+A6-5 sacrificed at 147 dpi for comparison **(b,f)**. Sick mice +22L+DMSO **(c,g)** and +22L+A6-5 **(d,h)**, both animals sacrificed at the same time 162 and 163 dpi, respectively. Scale bar: 30µm.

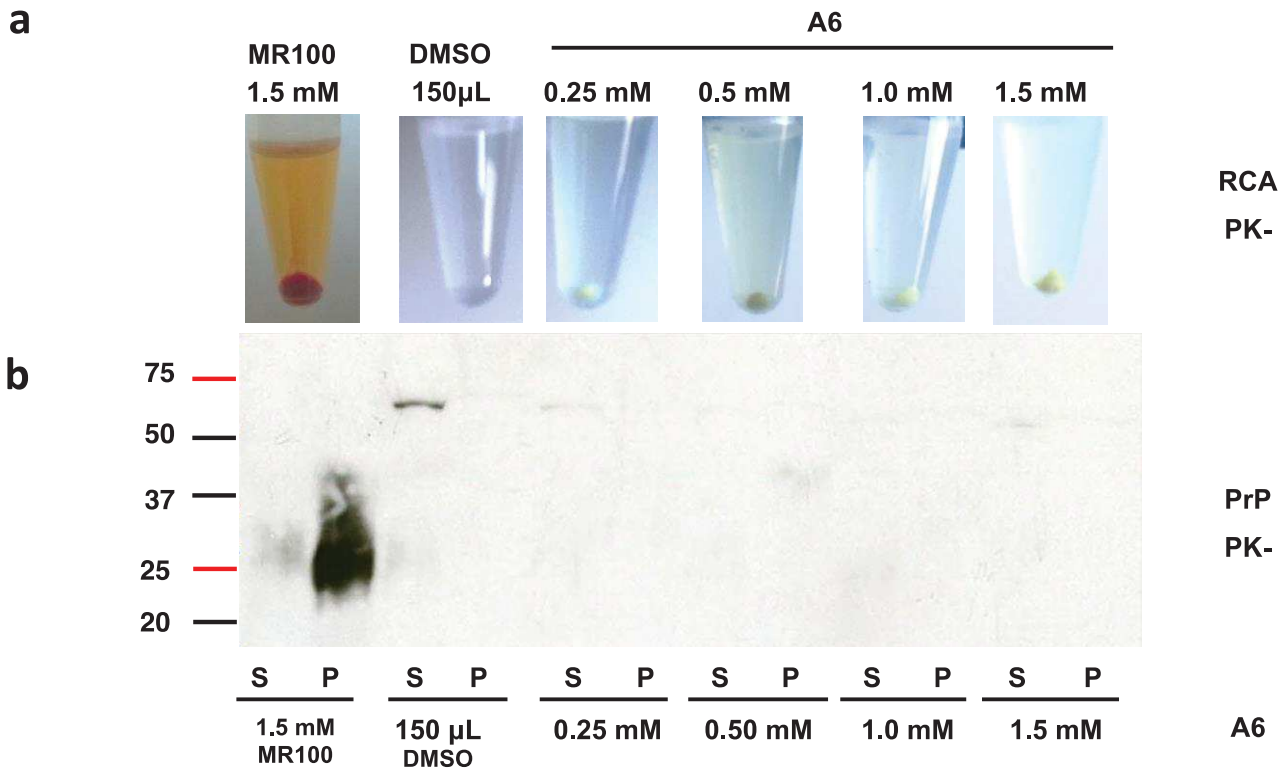


Supplementary Fig S3. Analyses of spongiosis and astrogliosis in brain tissue sections of mice treated with 10 and 20 mg/kg of A6.

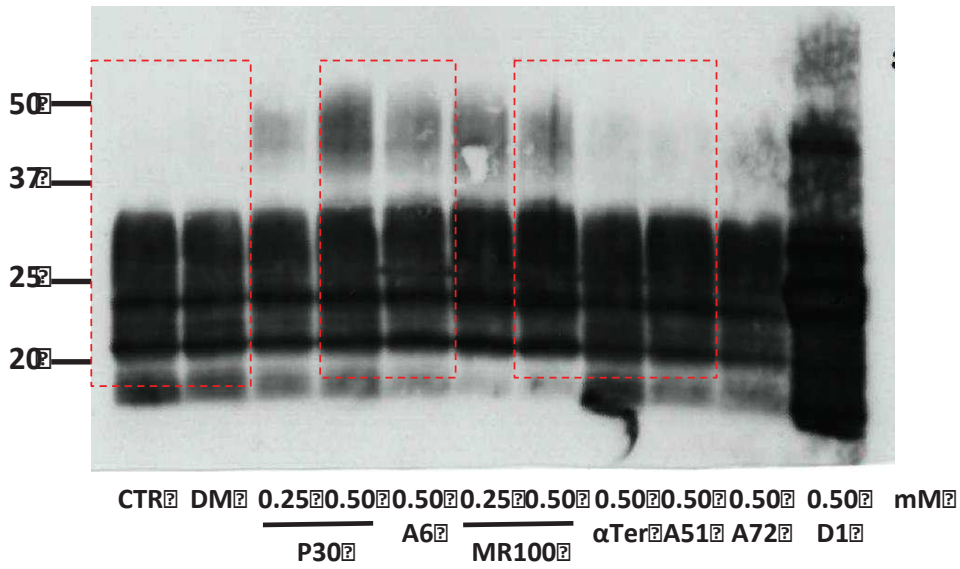
(a) Coronal tissue sections were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) to evaluate spongiosis in mice in the paraventricular nucleus (PVN) area. Animals sacrificed around the same time (162 to 166 dpi) were analysed and described as followed: sick mice +22L+DMSO as control (1), mice +22L+A6-10 (2) and +22L+A6-20 (3) both sacrificed while still asymptomatic. Healthy mice non inoculated with prions and treated with A6 at 20 mg/kg (-22L+A6-20) were used as control (4). Two mice were also sacrificed while they were sick at 185-186 dpi: +22L+A6-10 (5) and +22L+A6-20 (6). Scale bar: 30 µm. **(b)** Tissue sections were labelled with anti-GFAP antibody to evaluate the astrogliosis in the PVN area. Numbers (1-6) correspond to the same group of mice described previously in A. Scale bar: 30µm.



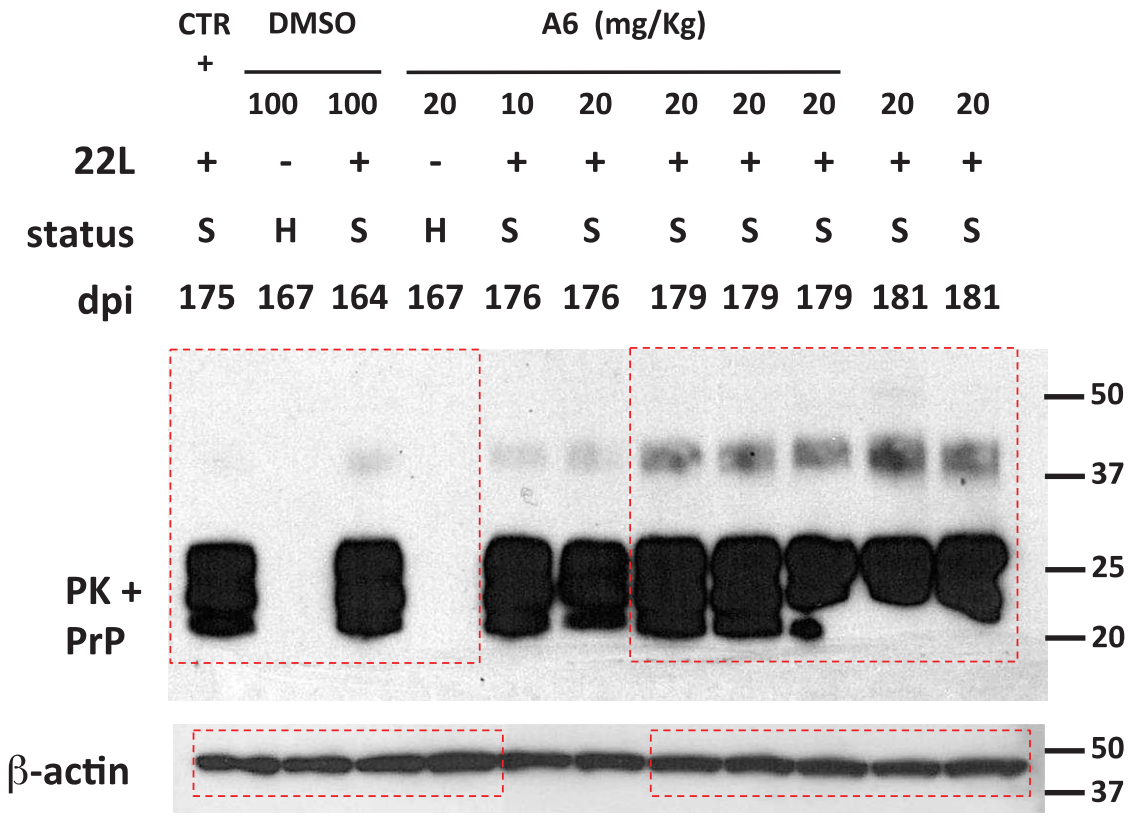
Supplementary Figure S4. Less exposed blot presented in Figure 4b



Supplementary Fig. S5. A6 cannot precipitate PrP^C in non-infected brain homogenate.
(a) Representative images of tubes after Rapid Centrifugation Assay (RCA) (Imberdis et al., 2016). Non-infected brain samples (50 µL) were incubated with 1.5 mM of MR100 compound (positive control), or with an equivalent volume of DMSO (150 µL, negative control), or with a range of concentrations of A6 compound (from 0.25 mM to 1.5 mM) according to RCA protocol described previously and performed without PK digestion (PK-). After a centrifugation step, a small precipitate appeared for MR100 (orange colour) and A6 (yellow colour) but not for DMSO sample. The size of the pellets is rather the same for each tube and is not proportional to the concentration of A6. **(b)** Western blot analysis of the supernatants and pellets after samples were processed by RCA. Immunoblot was probed with SAF mix antibodies to detect the presence of PrP^C. Molecular weight markers are indicated on the left side of the panel.



Supplementary Figure S6. Full-length blots showed in Figure 1a.



Supplementary Figure S7. Full-length blots presented in Figure 5.

II. Des résidus de fongicides exacerbent les dépôts amyloïdes chez les souris J20 en jouant sur la production et la clairance des peptides Aβ

➔ ***Contexte de l'étude***

Une recherche dans des bases de données de pesticides, d'analogues structurels au composé A6 a permis l'identification d'une famille d'antifongiques commercialisés : les anilinopyrimidines. Cette famille de pesticides comporte trois molécules actives : le cyprodinil (cypro), le mépanipyrim (mépa) et le pyriméthanil (pyri) (**Figure 83**). Ces composés sont commercialisés depuis une vingtaine d'années et sont couramment utilisés pour lutter contre l'apparition de champignons cryptogamiques tels que *Botrytis Cinerea*, responsable de la pourriture grise des fruits et des produits maraîchers. Ils ont une action systémique à large spectre et leurs modes d'action ne sont pas encore clairement identifiés (source ANSES). Le seul mécanisme d'action connu pour le cyprodinil et le pyriméthanil implique une inhibition de la biosynthèse des acides aminés, en particulier celle de la méthionine (ANSES, dossiers n°2008-1756 et n°2009-0748).

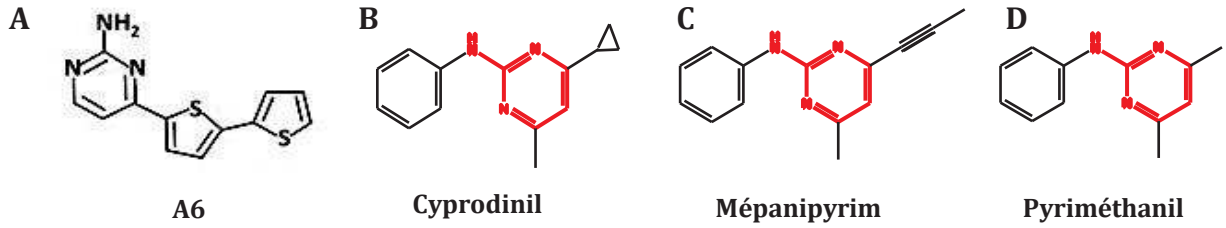


Figure 83. Structures chimiques du composé A6 (A), du cyprodinil (B), du mépanipyrim (C) et du pyriméthanil (D).

Ces trois produits phytosanitaires sont employés pour traiter les cultures au moment de la croissance des plantes et de la floraison. Ils sont aussi utilisés après récolte des fruits, des légumes et des céréales pour améliorer leur conservation. Les limites maximales de résidus

(LMR) autorisées par la législation européenne pour ces composés ont été fixées entre 0,02-40 mg/kg pour le cyprodinil ; 0,01-4 mg/kg pour le mépanipyrim et 0,01-20 mg/kg pour le pyriméthanil selon les aliments. Ces traitements conduisent à la présence de résidus de cyprodinil, de mépanipyrim et de pyriméthanil sur nos denrées alimentaires.

L'analyse de l'étude TDS2, publiée par l'ANSES, mesurant les résidus de pesticides présents dans l'alimentation française, révèle que le cyprodinil et le pyriméthanil font partie des 5 pesticides les plus fréquemment retrouvés (ANSES, 2011). Des résidus de mépanipyrim ont aussi été détectés mais à des fréquences plus faibles (**Tableau 8**).

Molécule active	Aliments	Nombre d'analyses	Fréquence de détection (%)
Cyprodinil	Fruits	75	**37,3**
	Légumes	267	**18,7**
	Sandwichs	30	13,3
Mépanipyrim	Fruits	75	5,7
Pyriméthanil	Fruits	75	**17,3**
	Légumes	267	12,7
	Fruits cuits	8	**25**
	Alcools	8	**25**

Tableau 8. Exemples d'aliments sur lesquels des résidus de cyprodinil, mépanipyrim et de pyriméthanil ont été retrouvés (adapté de l'étude TDS-2, ANSES, 2011).

De même, le dernier rapport de l'EFSA publié en 2018, étudiant les résidus de pesticides dans l'alimentation des 28 pays membres de l'Union européenne en 2016, démontre la présence de résidus d'anilinopyrimidines dans plusieurs catégories d'aliments (EFSA, 2018). C'est le cas par exemple des fraises pour lesquelles le cyprodinil est le résidu de pesticide le plus fréquemment détecté avec un pourcentage de quantification de 35%. Le mépanipyrim et le pyriméthanil sont aussi quantifiés mais dans des proportions moins importantes (≈ 7,5%) (**Figure 84**). Dans cette analyse de 2018 on remarque qu'aucun des 3 fongicides n'a été quantifié aux dessus des LMR, pour les fraises.

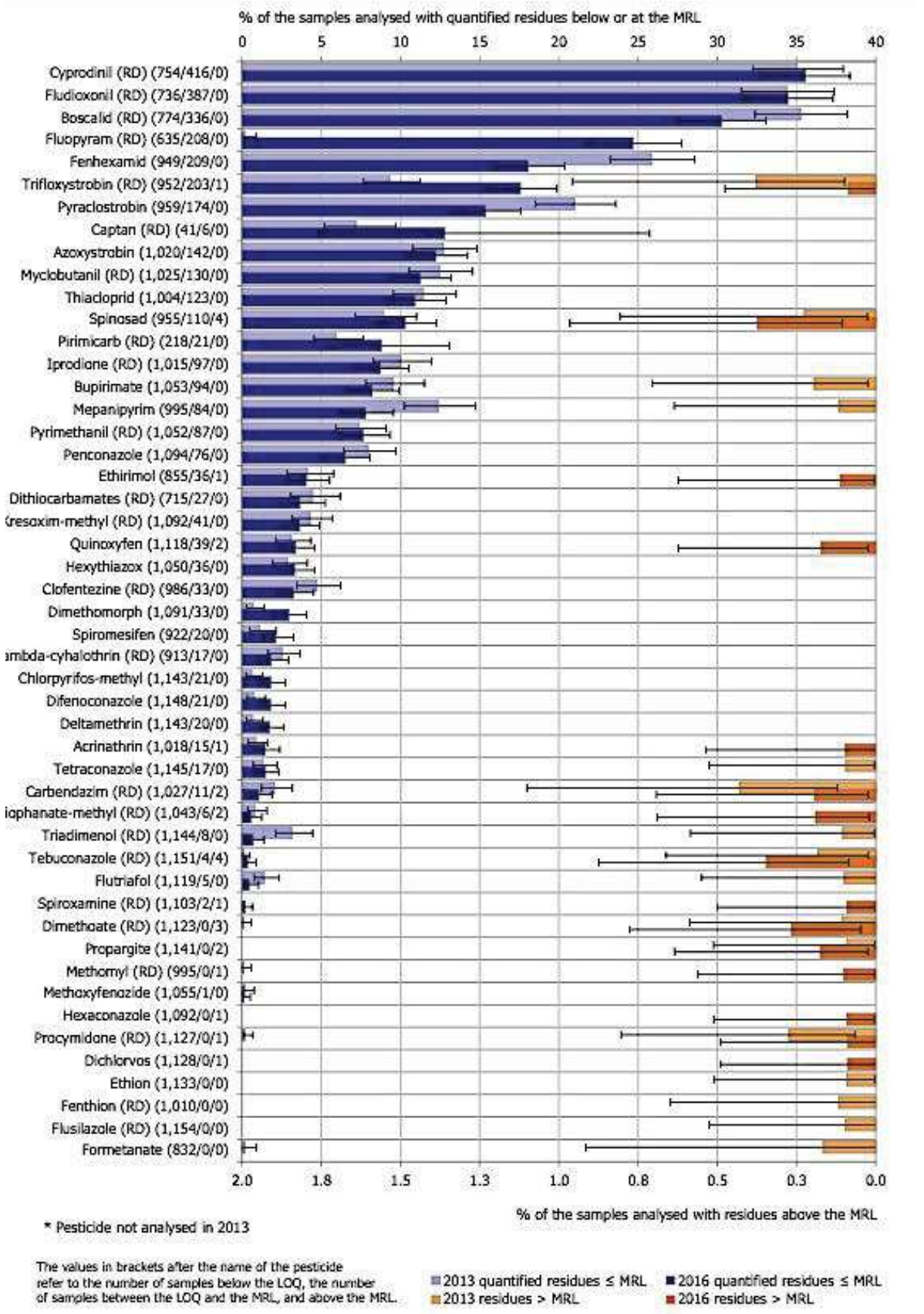


Figure 84. Analyse des résidus de pesticides contenus dans des échantillons de fraises. En bleu sont représentés les résidus de pesticides inférieurs ou égaux aux LMR et en orange les molécules dépassant les LMR (selon EFSA, 2018).

De même, l'utilisation des anilinopyrimidines dans les régions maraichères et fruitières a conduit à leur détection dans tous les milieux de notre environnement (eaux, air, sols). Le **Tableau 9** répertorie les fréquences de détection et les concentrations maximales de résidus de cyprodinil, de mépanipyrim et de pyriméthanil pour différentes études.

Eléments analysés	Cyprodinil	Mepanipyrim	Pyrimethanil	Références
Fruits	37.3% (n=75) Cmax: 90 µg/kg	6.7% (n=75) Cmax: 40 µg/kg	17.3% (n=75) Cmax: 320 µg/kg	(ANSES, 2011)
Légumes	18.7% (n=267) Cmax: 480 µg/kg	/	12.7 % (n=267) Cmax: 180 µg/kg	(ANSES, 2011)
Fraises	29.5% (n=61) Cmax: 1.6 mg/kg	1.6% (n=61) Cmax: < LOQ	0% (n=61)	(Générations Futures, 2013)
Céréales (petit déjeuner)	73.33% (n=15) Cmax: 36 µg/kg	/	100% (n=15) Cmax: 140 µg/kg	(Générations Futures, 2016a)
Alimentation européenne	5.27% (n=70 559)	0.28% (n=66 824)	4.12% (n=70 834)	(EFSA, 2018)
Eau (France)	≈ 0% (n=30 360) Cmax: 0.15 µg/L	0% (n=702)	≈ 0% (n=22809) Cmax: 0.07 µg/L	(ANSES, 2013)
Eau (La Rioja, Spain)	Cmax: 0.981 µg/L	/	Cmax: 0.59 µg/L	(Herrero-Hernández et al., 2016)
Vin autrichien	71.4%(n=7) Cmax: 15 µg/kg	/	85.7% (n=7) Cmax: 48 µg/kg	(PAN Europe, 2008)
Vin français	50% (n=10) Cmax: 6.8 µg/L	/	90% (n=10) Cmax: 233.8 µg/L	(PAN Europe, 2008)
Vin allemand	18.2% (n=11) Cmax: 10 µg/kg	/	63.6% (n=11) Cmax: 190 µg/kg	(PAN Europe, 2008)
Poussière	86.4% (n=22) Cmax: 372.3 ng/g	9.1% (n=22) Cmax: < LOQ	68.2% (n=22) Cmax: 21.4 ng/g	(Générations Futures, 2016b)
Cheveux	14.3% (n=7) Cmax: < LOQ	/	57.1% (n=7) Cmax: < LOQ	(Générations Futures, 2017)
Air	25% (n=1515) Cmax: 35.9 ng/m^3	/	No data	(ANSES, 2010b)

Tableau 9. Fréquences de détection des résidus de cyprodinil, de mépanipyrim et de pyriméthanil, et concentrations maximales mesurées (Cmax) dans l'alimentation et l'environnement européen.

L'ensemble de ces études montre que nous sommes chroniquement exposés à des résidus d'anilinopyrimidines via l'ensemble des compartiments de l'environnement ainsi que par notre alimentation. Cependant, les effets sur la santé humaine d'une longue exposition à de multiples résidus de pesticides ne sont pas clairement identifiés et font l'objet de nombreux débats. Les règlementations toxicologiques se basent majoritairement sur l'étude de produits phytosanitaires à de fortes doses et minimisent les conséquences des faibles doses. De plus, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) indique dans son dernier rapport que les résidus de pesticides présents dans les aliments ont une probabilité faible d'avoir des effets délétères pour la santé à court ou à long terme (EFSA, 2018). Cependant, des études récentes montrent que la présence de pesticides à de faibles doses peut présenter un risque pour la santé. Ainsi, Lukowicz et ses collaborateurs ont démontré qu'une exposition chronique au travers de l'alimentation, à un cocktail de 6 pesticides couramment utilisés en France, à la dose admissible journalière, conduit à un effet obésogène et diabétogène sur des souris WT, traitées pendant 52 semaines (Lukowicz et al., 2018).

Concernant les maladies neurodégénératives, il est difficile d'établir un lien entre l'exposition chronique à des résidus de pesticides et la maladie d'Alzheimer. En effet, les études épidémiologiques peuvent difficilement retracer le début de l'exposition aux résidus de pesticides, sa durée ainsi que le nombre et l'origine des molécules actives. Une étude clinique américaine a montré la présence de DDE, un métabolite de l'insecticide DDT, à des concentrations 4 fois plus élevées dans le sérum et le cerveau de patients atteints de la MA par rapport à des sujets sains (Richardson et al., 2014). Il est à noter que le DDT est un pesticide interdit depuis les années 70 et qu'il semblerait qu'il puisse s'accumuler dans les tissus et fluides biologiques sur de très longues périodes. D'autres études démontrent un impact des pesticides sur la MA lors d'expériences d'injections aiguës de chlorpyrifos (50 mg/kg) ou de paraquat (10 mg/kg 2 fois par semaine pendant 3 semaines) à des souris Tg2576 provoquant une augmentation de la production des peptides Aβ (Chen et al., 2012; Salazar et al., 2011).

Cependant, les doses utilisées ainsi que les voies d'administration ne sont pas représentatives de l'exposition chronique des consommateurs aux pesticides.

➔ ***Résultats***

Mon projet de thèse a consisté à évaluer l'effet des anilinopyrimidines sur des souris transgéniques J20, un modèle murin d'agrégation de la maladie d'Alzheimer. Dans un premier temps, des expériences d'incubation *ex vivo* du cyprodinil, du mépanipyrim, du pyriméthanil, seuls ou en cocktail, sur des coupes de cerveaux de souris J20 âgées de 10 mois ont été faites. Les coupes ont été incubées avec l'anticorps 6E10 couplé à l'Alexa488 (6E10-Alexa488) pour visualiser les plaques amyloïdes et avec des anticorps anti-cypro (Esteve-Turrillas et al., 2012), anti-mépa (Esteve-Turrillas et al., 2013) et anti-pyri (Mercader et al., 2012) pour détecter la présence des pesticides (**Figure 85**). Les résultats montrent que les 3 molécules seules ou en cocktail sont capables d'interagir avec les plaques amyloïdes comme le montre la co-localisation du marquage des pesticides avec le 6E10-Alexa488. Ce marquage est absent lorsque les coupes sont incubées avec un volume équivalent en DMSO.

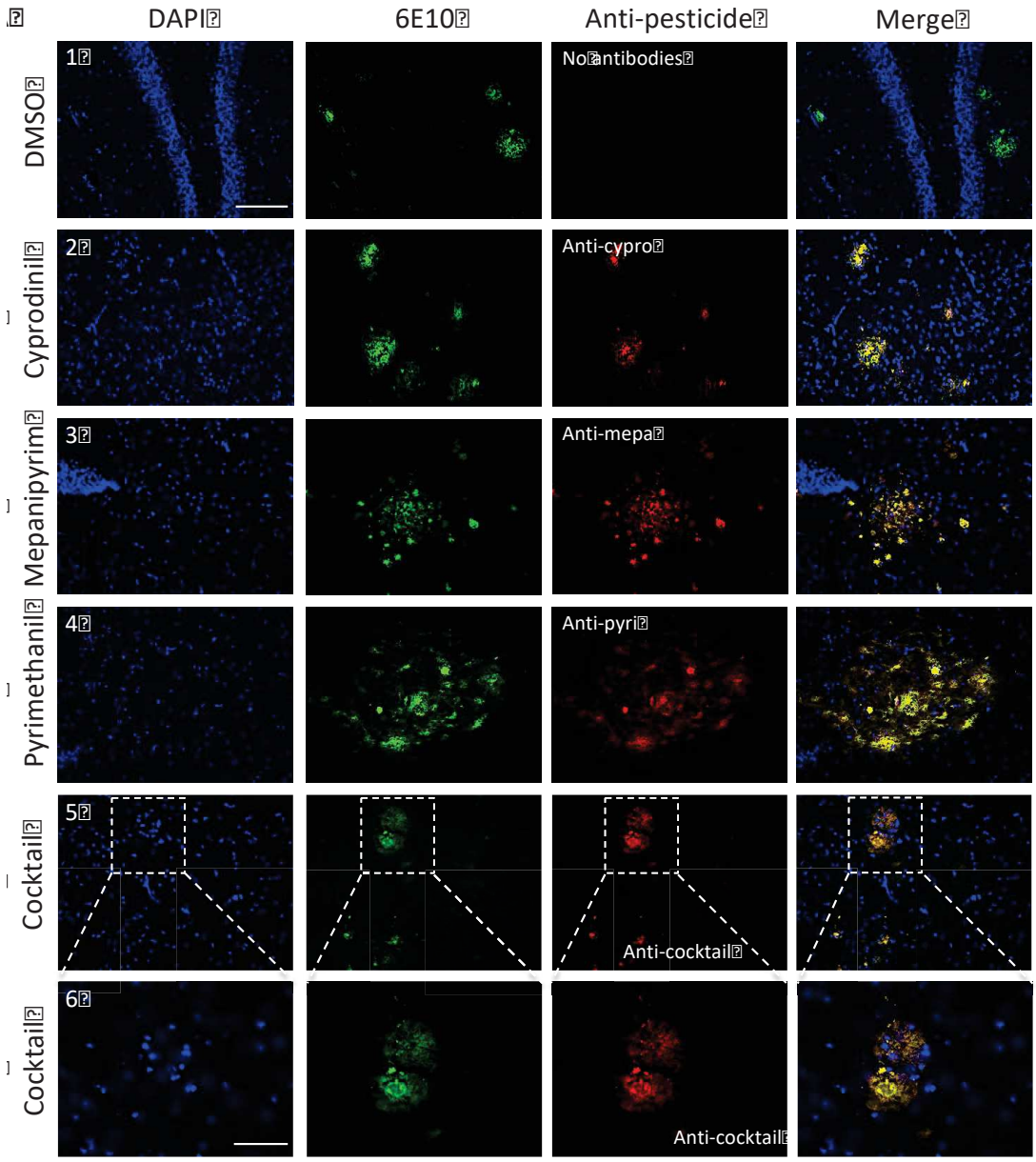


Figure 85. Le cyprodinil, le mépanipyrim et le pyriméthanil interagissent avec les plaques amyloïdes *ex vivo*. Des coupes de cerveaux de souris J20 ont été incubées avec 2mM de cypro (**2**) de mépa (**3**) de pyri (**4**) ou avec un cocktail des 3 composés (**5-6**) puis révélées avec des anticorps anti-pesticides (rouge). Des coupes contrôles ont été incubées avec un volume équivalent de DMSO (**1**). Toutes les coupes ont été marquées avec du 6E10-Alexa488 pour détecter les plaques amyloïdes (vert).

Comme les anilinopyrimidines ont la capacité d'interagir avec les plaques amyloïdes présentes chez les souris J20, nous avons évalué l'impact de ces composés sur la cinétique d'agrégation des peptides Aβ. Pour cela, des peptides synthétiques d'$A\beta_{1\text{-}42}$ humains ont été purifiés par chromatographie d'exclusion de taille afin de ne recueillir que les monomères. Trente micromolaires de peptides monomériques ont été incubés avec 750 µM d'un cocktail

des 3 fongicides (**Figure 86**). Les résultats montrent qu'en présence des pesticides, la courbe de cinétique de formation de fibrilles d'Aβ est modifiée avec un fort raccourcissement de la phase de latence (**courbe rouge**) par rapport à la condition contrôle, incubée avec un volume équivalent de DMSO (**courbe bleue**). Ces résultats montrent : (i) une interaction directe entre les peptides d'$A\beta_{1-42}$ et les pesticides et (ii) une accélération de la cinétique de formation des fibrilles d'$A\beta_{1-42}$ par les pesticides.

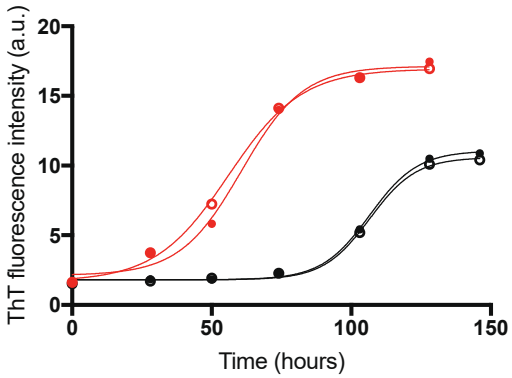


Figure 86. Accélération de la cinétique d'agrégation des peptides $A\beta_{1-42}$ en présence d'un cocktail de cyprodinil, mépanipyrim et pyriméthanil (courbe rouge). La courbe contrôle a été réalisée avec un volume équivalent de DMSO (courbe bleue).

Comme ces composés interagissent et modifient la cinétique d'agrégation des peptides Aβ nous avons voulu déterminer leurs effets sur l'agrégation des peptides Aβ *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé le modèle J20 (détaillé dans le chapitre II) que nous avons traité chroniquement avec un cocktail des trois anilinopyrimidines (cypro, mépa et pyri) via l'eau de boisson, pendant 9 mois. Les souris ont été traitées avec 0,1 µg/L (0,44 nM) de chaque composé, menant à une concentration finale de 0.3 µg/L. Selon les règlementations européennes, la concentration de 0,1 µg/L correspond à la concentration maximale autorisée pour une molécule active dans l'eau de boisson et ne peut excéder la concentration de 0,5 µg/L lorsque plusieurs molécules sont présentes.

Après 9 mois de traitement, l'analyse des agrégats par la thioflavine T (ThT) a montré une augmentation du nombre (26%) et de la surface des agrégats (53%) au niveau de l'hippocampe des souris J20 traitées par rapport aux animaux non traités (**Figure 87 A-C**).

Cet effet est aussi observé au niveau du cortex avec une augmentation de 42% du nombre et de 80% de la surface des agrégats (**Figure 87D-E**). Comme attendu, aucune plaque n'a été détectée au niveau de ces deux régions chez nos souris WT traitées ou non par le cocktail de fongicides (**Figure 87A-E**). La régionalisation du nombre et de la surface des plaques amyloïdes au niveau de l'hippocampe des souris J20 pour les régions du gyrus denté (GD), du CA1, du CA2 et du CA3, montre que cette augmentation est localisée principalement dans l'aire CA1 (**Figure 87F-G**). De plus, des analyses par ELISA des homogénats de cerveau des souris J20 traitées montrent un taux 3 fois plus élevé de formes solubles du peptide $A\beta_{1-42}$ par rapport aux souris non traitées (**Figure 87H**).

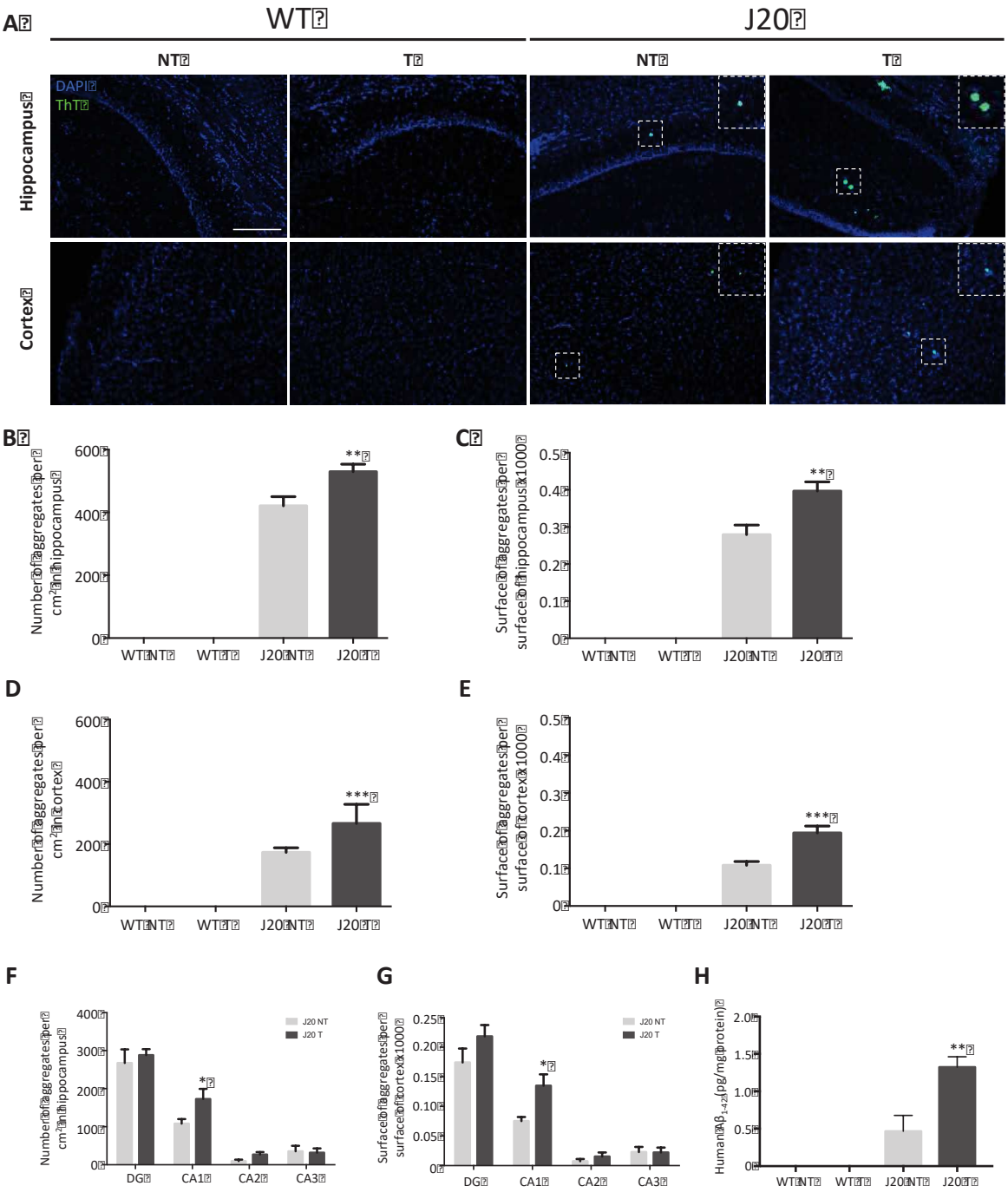


Figure 87. Le traitement avec un cocktail de fongicides augmente les dépôts amyloïdes chez les souris J20. **A.** Images de coupes de cerveaux de souris WT et J20, traitées (T) ou non (NT) avec le cocktail de pesticides, et marquées à la ThT. **B-E.** Quantifications du nombre (**B, D**) et de la surface (**C, E**) des agrégats pour les souris WT et J20 (NT et T) au niveau de l'hippocampe et du cortex. F-G. Régionalisation du nombre (**F**) et de la surface (**G**) des plaques dans les différentes régions hippocampiques (GD, CA1, CA2 et CA3). H. Dosage des formes solubles d'A$\beta_{1\text{-}42}$ chez les souris WT et J20 par ELISA.

L'analyse de différents marqueurs de l'inflammation au niveau de l'hippocampe tels que l'astrogliose et la microgliose révèle une augmentation de ces processus chez les souris

J20 traitées par rapport aux souris non traitées. Cette activation de l'inflammation est associée à une augmentation de la sécrétion d'interleukine 1β et d'interleukine 6 dans le cerveau des animaux qui pourrait provenir de la microglie activée. Chez les souris WT, les pesticides n'induisent pas la production de cytokines et d'interleukines dans le cerveau car aucun processus inflammatoire n'est observé au niveau de l'hippocampe.

L'étude de la densitométrie neuronale montre que le traitement chronique avec du cyprodinil, du mépanipyrim et du pyriméthanil provoque une mort neuronale au niveau de l'aire CA3 de l'hippocampe des souris J20. Curieusement, le traitement a un tout autre effet sur les souris WT. En effet, nous avons constaté une augmentation du nombre de neurones dans les aires CA1, CA2 et CA3 des souris WT T par rapport aux animaux NT.

Le traitement chronique avec un cocktail des 3 anilinopyrimidines à de très faibles doses exacerbe les dépôts amyloïdes au niveau de l'hippocampe et du cortex des souris J20. Cependant, nous ne disposons pas d'informations concernant le moment où cet effet pro-agrégeant se met en place. Pour cela, nous avons réalisé une étude longitudinale d'apparition des agrégats au niveau du cortex superficiel de souris J20 NT et T ; à 3, 6 et 9 mois par microscopie bi-photonique. En effet, en plus d'être un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, les souris J20 sont aussi un modèle d'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), avec présence de dépôts amyloïdes au niveau des parois des vaisseaux (Kimbrough et al., 2015). Quarante-huit heures avant chaque session d'imagerie, les souris ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec du méthoxy-XO4 (dérivé du rouge congo) pour marquer les dépôts amyloïdes. Le jour même, du dextran-FITC a été injecté en rétro-orbital pour marquer les vaisseaux sanguins. L'analyse des résultats, aux différents temps, montre que le traitement augmente la formation des agrégats entre 6 et 9 mois et provoque une augmentation des plaques amyloïdes vasculaires (**Figure 88B, E**) par rapport aux souris non traitées (**Figure 88A, E**).

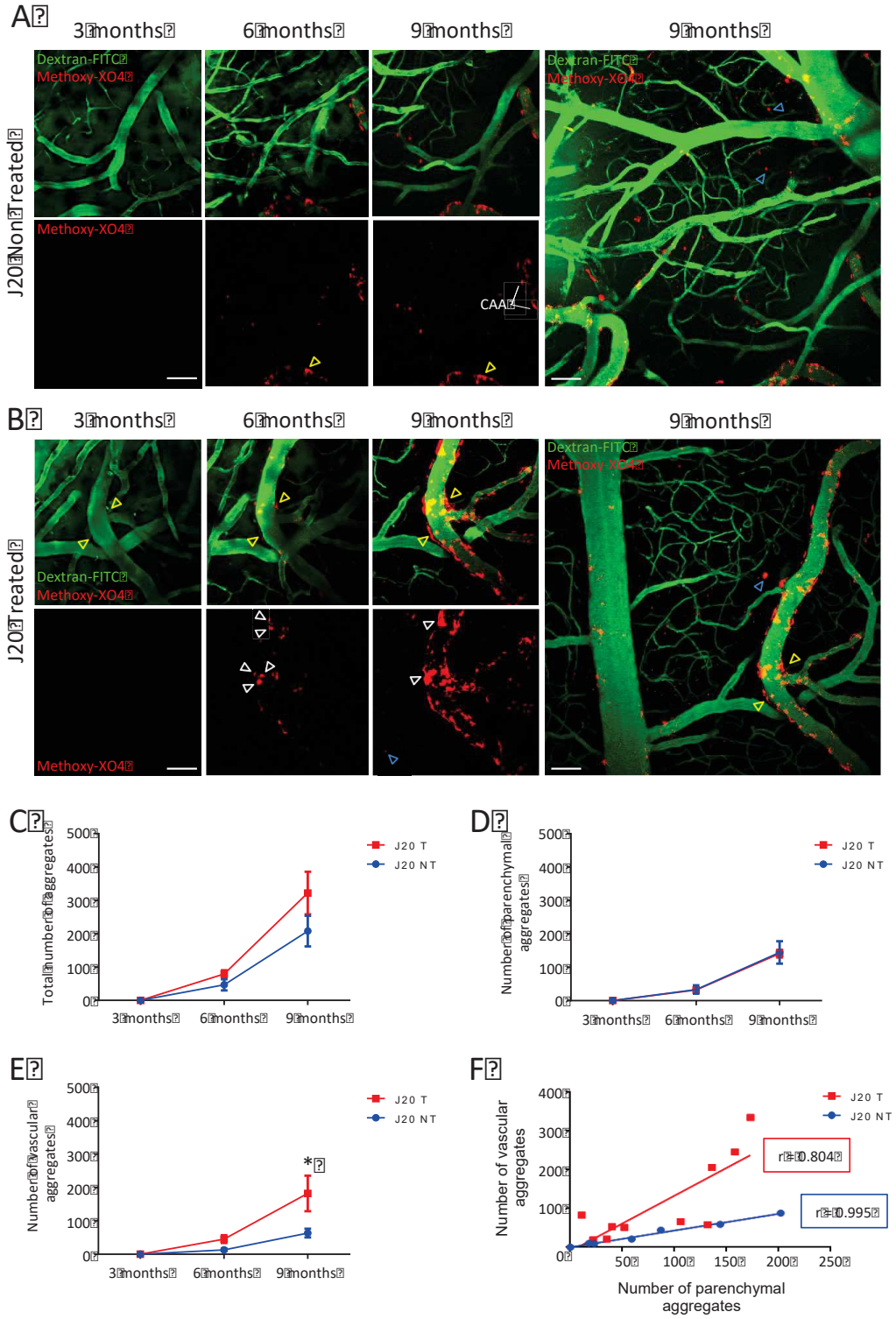


Figure 88. Augmentation de l'angiopathie amyloïde cérébrale chez les souris J20 traitées aux pesticides. **A-B.** Images du cortex superficiel de souris J20 NT (**A**) et T (**B**) à 3, 6 et 9 mois. Les agrégats sont marqués au méthoxy-XO4 (rouge) et les vaisseaux sanguins en vert. **C-E.** Quantifications du nombre total d'agrégats (**C**), ainsi que les agrégats parenchymaux (**D**) et vasculaires (**E**). **F.** Corrélation entre le nombre d'agrégats vasculaires et parenchymaux chez les souris J20 NT (en bleu) et T (en rouge).

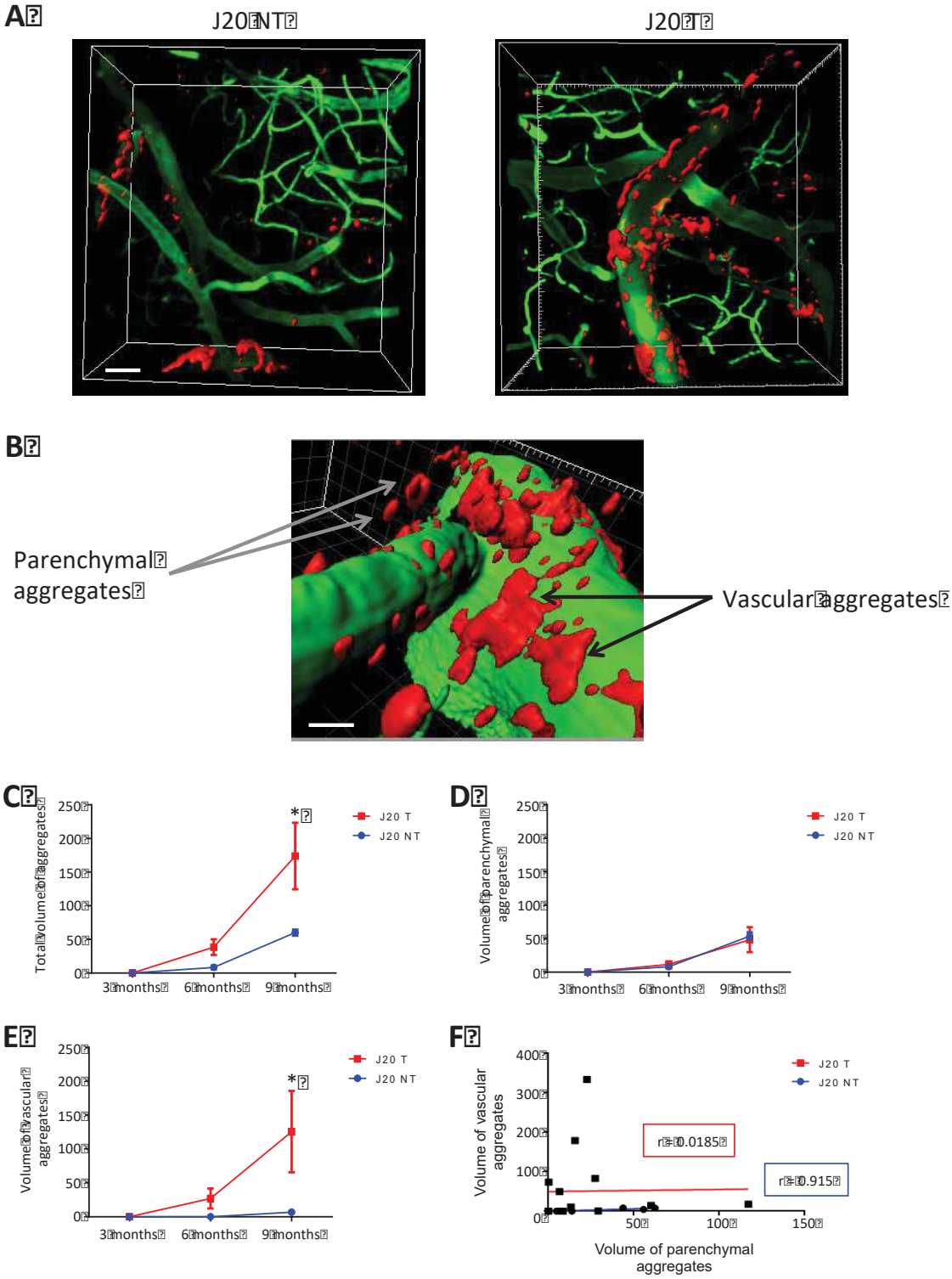


Figure 89. Augmentation du volume des plaques amyloïdes chez les souris J20 traitées. A. Reconstruction 3D du cortex superficiel chez les souris J20 NT et T à 9 mois. **B.** Exemple d'un vaisseau leptoméningé (vert) en présence d'agrégats parenchymaux et vasculaires (rouge). **C-E.** Quantifications du volume total d'agrégats (**C**), ainsi que lesagrégats parenchymaux (**D**) et vasculaires (**E**). **F.** Corrélation entre le volume des plaques vasculaires et parenchymales de souris J20 NT (en bleu) et T (en rouge).

L'analyse du volume des agrégats (**Figure 89A-B**) montre une augmentation d'un facteur 3 du volume total des plaques (**Figure 89C**) et d'un facteur 18 pour le volume des agrégats vasculaires (**Figure 89E**) chez les animaux exposés aux pesticides. Comme pour le nombre, aucun effet n'est observé sur le volume des dépôts parenchymaux (**Figure 89D**).

L'analyse des différentes protéines de la cascade amyloïde telles que l'APP et BACE1 ainsi que les différents récepteurs/enzymes impliqués dans la clairance des peptides Aβ (IDE, NEP, LRP1) a révélé que l'expression de BACE1 est augmentée de 25% chez les souris J20 traitées (**Figure 90A**) et l'expression de la néprilysine (NEP) est diminuée d'environ 48% (**Figure 90B**).

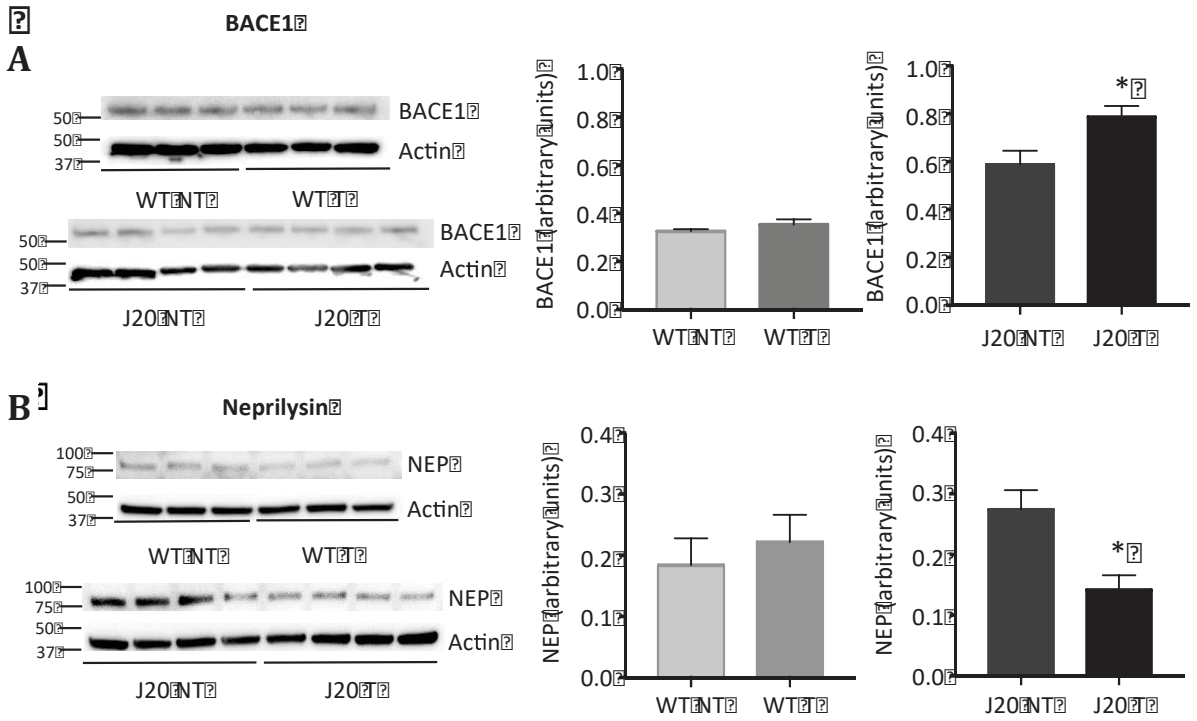


Figure 90. Le traitement aux fongicides augmente l'expression de BACE1 et diminue celle de la néprilysine des souris J20. Western blots de la protéine BACE1 (**A**) et de la néprilysine (**B**) et leurs β-actine respectives. Les western blots sont présentés à gauche et leurs quantifications à droite, pour les souris WT et J20 ayant reçu ou non le traitement au cocktail de pesticides.

En conclusion, nos résultats montrent pour la première fois que l'exposition chronique à de faibles doses de fongicides aggrave les marqueurs de la maladie d'Alzheimer, chez un modèle murin transgénique exprimant des mutations retrouvées dans les formes familiales de la pathologie. Dans ce contexte, les anilinopyrimidines exacerbent la formation de plaques amyloïdes au niveau de l'hippocampe et du cortex mais surtout au niveau du cortex superficiel en boostant l'angiopathie amyloïde cérébrale. Les processus inflammatoires sont aussi augmentés après traitement. Ces molécules peuvent donc être considérées comme des composés « Alzheimerogènes » et leur possible implication dans la genèse ou l'aggravation des formes sporadiques de la maladie est plus qu'envisagée.

Article 2

« Fungicide residues exacerbate vascular β-amyloid deposits in J20 mice »

Lafon Pierre-André, Wang Yunyun, Arango-Lievano Margarita, Torrent Joan, Salvador-Prince Lucie, Mansuy Marine, Mestre-Francès Nadine, Liu Jianfeng, Mercader Josep-Vicent, Jeanneteau Freddy, Desrumaux Catherine and Perrier Véronique.

Fungicide residues exacerbate vascular β-amyloid deposits in J20 mice

Pierre-André Lafon[1*], Yunyun Wang[1,2*], Margarita Arango-Lievano[3], Joan Torrent[1], Lucie Savador-Prince[1], Marine Mansuy[1], Nadine Mestre-Francès[1], Jianfeng Liu[2], Josep Vicent Mercader[5], Freddy Jeanneteau[3], Catherine Desrumaux[1] & Véronique Perrier[1‡].

[1]Université Montpellier, Montpellier, F-34095 France; Inserm, U1198, MMDN, EiAlz team, Montpellier, F-34095 France; EPHE, Paris, F-75007, France.

[2]Cellular Signaling Laboratory, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China.

[3]CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34000 Montpellier, France; Inserm, U1191, F-34000 Montpellier, France; Université de Montpellier, UMR-5203, F-34000 Montpellier, France.

[*] the authors have contributed equally to this work

[‡] **Corresponding author:**

Dr. Véronique Perrier

INSERM U1198- Université de Montpellier

Place Eugène Bataillon, CC105

34095 Montpellier Cedex 05

FRANCE

Tel : +33 4 67 14 33 87

Email: veronique.perrier@umontpellier.fr

Keywords: pesticides, cyprodinil, mepanipyrim, pyrimethanil, anilinopyrimidines, Alzheimer's disease, J20 mouse model, aggregation, CAA, environmental risk factors.

ABSTRACT

The massive use of pesticide since the mid-20th century has contaminated our environment leading to multiple residues in our diet. Although these compounds are present at very low concentrations, the long-term effect of pesticide residues on human health is subject to concerns. The link between pesticide residues and Alzheimer's disease is not clear and difficult to establish for human populations. However, some recent *in vitro* studies suggest the potential Azheimerogen effects of herbicides. To date, no *in vivo* experiments has yet modeled the impact of this chronic contamination.

We have investigated the impact of fungicide residues on the J20 mouse model of Alzheimer's disease ($hAPP_{Swe/Ind}$). J20 transgenic mice were chronically exposed to a cocktail of anilinopyrimidines for 9 months through tap water. Our results showed that subnanomolar doses of anilinopyrimidine residues exacerbate all of the AD's pathological markers. A substantial increase of soluble Aβ, amyloid plaques, astrogliosis, activated microglia and neuronal loss was observed upon treatment. Using 2-photon microscopy, we demonstrated that fungicides trigger an augmentation of vascular amyloid aggregates in the superficial cortex, reminiscent to cerebral amyloid angiopathy (CAA). The mechanism of action involved an over-expression of β-secretase cleaving enzyme combined with impairment of the clearance pathway through NEP under-expressed.

Cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil can be considered as Alzheimerogen pollutants on long-term exposure even at subnanomolar regulatory levels. The question is raised regarding the harmlessness of pesticide residues in our diet. It is urgent to set-up prevention strategies in order to slow-down the worldwide AD epidemic, an alternative to overcome the lack of treatment.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in elderly people and is affecting 35 millions people worldwide. The etiology of AD is not yet clarified, which may explain the lack of effective treatments. However, identifying the risk factors involved in the pathology represents an alternative strategy to reduce the number of cases. Indeed, projection studies of the incidence of Alzheimer's disease between 2010 and 2050 have indicated that delaying the onset of AD by 1, 2 or 5 years, could reduce its prevalence of about 10, 20 and 50% respectively (Mura et al., 2010).

AD is characterized by the accumulation and aggregation of amyloid-β peptides (Aβ) into amyloid plaques causing progressive memory loss. Aβ peptides result from the sequential enzymatic processing of the amyloid precursor protein (APP) by the β-(BACE1) and γ-secretases. Impairments of enzymes/receptors involved in the clearance pathways (IDE, NEP, LRP1…) are major events reinforcing the disease. The causes leading to these deregulations are not clearly identified, but environmental factors may have an important impact. The hypothesis regarding the role of pollutants present in our environment as elements corrupting the APP metabolism has gained importance.

Human epidemiological studies showed that contamination to heavy metals increases the risk of developing AD (Fathabadi et al., 2018; Xu et al., 2018). Cell culture and animal studies demonstrated that mercury, lead and aluminum induce a deregulation of the APP metabolism (APP, BACE1) (Huang et al., 2011). Heavy metals were also involved in the deregulation of the clearance of Aβ peptides (LRP1, NEP) (Chin-Chan et al., 2015; Kim et al., 2014). In addition, occupational exposure to pesticides such as organophosphates was associated with an increased risk to develop AD in men (Hayden et al., 2010). Moreover, the presence of dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), a metabolite of the organochlorine insecticide dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), has been found in the serum of AD patients with a 3.8 times higher rate than in healthy subjects (Richardson et al., 2014). In APOE ε4

carriers the presence of DDE worsens MMS (mini-mental state) scores.

If occupational studies highlighted the role of herbicides and insecticides in Alzheimer's disease, data on the implication of fungicides in neurological disorders are barely reported. Fungicides are widely used for the cultivation and preservation of fresh fruits and vegetables. Because prevention campaigns encourage people to consume veggies and fruits everyday, we wonder what is the impact of a long-term exposure to fungicide residues on human population, especially on neurological disorders. Recently, we focused our attention on anilinopyrimidine compounds which are widespread fungicides with three main active molecules: cyprodinil (cypro), mepanipyrim (mepa) and pyrimethanil (pyri). Many reports and publications have underlined the presence of anilinopyrimidines residues in all environmental medias: in the air (ANSES, 2010; Désert et al., 2018), in soils (Bermúdez-Couso et al., 2007; Rial-Otero et al., 2004) and in water (ANSES, 2013; Herrero-Hernández et al., 2016) (**Table 1**). Several French (ANSES, 2011) and European (EFSA, 2018) reports showed that cypro, mepa and pyri residues were detected in many foodstuffs, confirmed by studies from independent non-governmental organizations (Générations Futures, 2013, 2016; PAN Europe, 2008) (**Table 1**). From an epidemiological standpoint, it is difficult to assess the impact of a long-term contamination to pesticide residues on human health and especially on neurodegenerative diseases. Indeed, as the majority of AD cases are diagnosed in elderly populations, yet the exposure to risk factors occurred years or decades before the first symptoms appeared. However, one can hypothesize that chronic exposure to pesticide residues via our diet or drinking water may have a role in the etiology or aggravation of neurological diseases.

To test this hypothesis, we have investigated the impact of anilinopyrimidine residues on the J20 mouse model of Alzheimer's disease ($hAPP_{Swe/Ind}$). J20 transgenic mice were chronically exposed to a cocktail of anilinopyrimidines for 9 months through tap water, at the regulatory limit dose of 0.1 µg/L for each compound. Our results showed that very low doses of anilinopyrimidine residues exacerbate AD's pathological

markers as soluble Aβ fractions, amyloid plaques, astrogliosis, activated microglia and neuronal loss. Using 2-photon microscopy, we showed in J20 treated mice: (*i*) a substantial augmentation of vascular amyloid aggregates in the superficial cortex, reminiscent to cerebral amyloid angiopathy (CAA); and (*ii*) that pesticides increase amyloid plaque formation between 6-9 months. The analyses of the protagonists involved either in the amyloidogenic or in the clearance pathways, demonstrated an increased expression of BACE1 and a concomitant decreased of neprilysin (NEP).

Altogether, our results showed that sub-nanomolar regulatory levels of cypro, mepa and pyri residues aggravate AD and CAA markers. Emphasizing on prevention strategies in order to slow-down the worldwide AD epidemic could be a suitable alternative to overcome the lack of treatment.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement and animals

This project follows the specific French national guidelines on animal experimentation and well-being, and was approved by the French National Ethic Committee for Animal Experimentation (APAFIS #7357-20161025-18055782). Transgenic hAPP(Swe/Ind) (J20) (Mucke et al., 2000) mice and their wild-type (WT) littermates were used in this project. Animals had free access to water and food, and were fed under a standard chow diet (A03, SAFE Diets, France). Genotyping of mice was performed as described in (Mucke et al., 2000).

Treatment of animals with pesticides

Cyprodinil (cypro), mepanipyrim (mepa) and pyrimethanil (pyri) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Stock solutions were prepared at 1 mg/mL in pure DMSO according to the suppliers' recommendations. Stock solutions were diluted 1,000 times in distilled water to a final concentration of 1 mg/L, filtered (0.5 µm) and stored at 4°C until use. For animal treatment, stock solutions at 1 mg/L were diluted 10,000 times in tap water to reach a final concentration of 0.1 µg/L. Animals were treated with a cocktail of the three pesticides at 0.1 µg/L for each compound (cypro 444 pM, mepa 448 pM, and pyri 502 pM). Water was changed once a week and fresh solutions were prepared each week. Groups of J20 (n=24) and WT (n=28) mice have been treated for 9 months after weaning, with the cocktail of the three pesticides via the drinking water (referred as "T" groups). Groups without pesticide treatment, referred as "NT" (J20 n=25 and WT n=27) were used as controls.

Tissue collection and preparation

At the end of the experiment, mice were anesthetized (16% ketamine, 4% xylazine in NaCl 9‰) and sacrificed by a cardiac perfusion of PBS, to remove blood from tissues.

Brains were removed and cut along the sagittal axis: the left hemisphere was directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (for biochemical analyses) and the right hemisphere was fixed in a commercial paraformaldehyde solution, (AntigenFix (Diapath, Martinengo, Italy) for 48h at 4°C (for immunohistochemistry). Right hemispheres were rinsed with PBS and incubated in a 30% sucrose solution for 4 days at 4°C. Brains were then included in OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Villeneuve-d'Ascq, France), quickly frozen in acetone chilled on dry ice and conserved at -80°C until use.

Interaction of fungicides with amyloid plaques on J20 tissue sections

Frozen blocks were mounted on a cryostat (Leica, Nanterre, France) and 25 µm coronal sections were performed and conserved at -20°C in an anti-freeze solution (25% glycerol and 25% ethylene glycol in 0.1 M phosphate buffer) until use. Three to six sections of WT and J20 mice without any treatment were rinsed, mounted on Superfrost Plus glass slides (Microm France, Mancheville, France) and dried overnight at room temperature (RT). Prior to amyloid labeling, sections were incubated 10 min with a 70% formic acid solution for antigen-retrieval. Tissue sections were washed in PBS and incubated 1.5 h at RT with a solution containing 2 mM of cypro, mepa, pyri or a cocktail of the three pesticides. An equivalent volume of DMSO was used as a control. Sections were incubated 1 h at RT with a blocking solution (3% goat serum, 0.3% Triton X100 in PBS), and then incubated 2 h at RT with a mouse anti-β-amyloid 1-16 conjugated to AlexaFluor 488 (1:1000, clone 6E10, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) and with primary antibodies recognizing cypro (Esteve-Turrillas et al., 2012), mepa (Esteve-Turrillas et al., 2013) or pyri (Mercader et al., 2012). Then, a goat anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) was incubated for 2 h at RT and sections were counterstained with DAPI (1:50,000 in PBS) (Molecular Probes, Thermofisher Scientific, Saint Herblain, France). Control slides were incubated 2 h with the secondary antibody (Cy3) alone to check the specificity of the staining.

***In vitro* interaction of cypro, mepa and pyri with synthetic human $A\beta_{1-42}$**

Synthetic $A\beta_{1-42}$ peptides were purchased from the ERI Amyloid Laboratory LLC (Oxford, CT, USA). Peptides were maintained in a monomeric state using the protocol described in Serra-Batiste et al., 2016. Briefly, Aβ peptides were dissolved in a 6.8 M guanidine thiocyanate solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at a concentration of 8.5 mg/mL. The solution was then sonicated for 5 min at 52°C, and diluted with ultrapure water to reach a final concentration of 5 mg/mL of Aβ peptides and 4M of guanidine thiocyanate. Solution was centrifuged at 10,000 g for 6 min at 4°C. The supernatant collected is filtered (PVDF, 0.45 µm) and was injected into a Superdex 75 increase 10/300 GL (GE Heathcare Life Science, Dutscher, Brumath, France) previously equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 at with a 0.5 mL/min flow to collect the peak attributed to monomeric Aβ. The Aβ peptide concentration was determined using NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The Aβ stock solution was diluted to 30 µM in a 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 and left to aggregate in duplicate in low binding eppendorf tubes with a final volume of 600 µL. Tubes arranged vertically were incubated at 25°C under quiescent conditions. Fibril formation was monitored using a ThT binding assay. For this assay, 20 µL aliquots were withdrawn at specific times and mixed with 14 µL of 142 mM GlyOH buffer, pH 8.3 and 6 µL of 100 µM of ThT in a 96-well half-area plate of black polystyrene with a clear bottom and PEG coating (Thermofisher Scientific, Saint Herblain, France). ThT fluorescence of each sample was measured (λ_{ex} = 445 nm and λ_{em} = 485 nm) using a Fluoroskan Ascent microplate fluorimeter (Thermofisher Scientific). Experiments in the presence of a cocktail of the three pesticides were conducted under the same conditions except that pesticides were added from a filtered (PVDF, 0.22 µm) stock solution to get a 1:15 molar ratio (Aβ:individual pesticide), and a final concentration of DMSO of 1% (v/v). To keep the conditions identical, an equal volume of DMSO was added to the control tube. Aggregation profiles were processed using GraphPad Prism software. Curves were fit using the built-in sigmoidal fit. Each kinetic trace was fit independently to extract the t50 (time required to reach 50% of the maximum fluorescence intensity).

Aggregate staining and quantification

Floating brain tissue sections were stained using the amyloid stain / Congo red kit (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) according to supplier's protocol, to detect amyloid aggregates. Sections were mounted on Superfrost Plus glass slides, dried overnight at RT and counterstained with a 0.4% cresyl violet solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). In parallel, thioflavin T (ThT), a fluorescent dye, was used as a second independent staining of amyloid plaques. Floating sections were first mounted on Superfrost Plus glass slides and dried overnight at RT. They were then incubated with a ThT solution at 0.01% (31 μM) for 10 min (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), rinsed with an 80% ethanol solution and counterstained with DAPI (1:50,000) (Molecular Probes, Thermofisher Scientific, Saint Herblain, France). All sections were visualized using a Leica DM2500 microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) and images were analyzed with the LAS core image analysis software (Leica Microsystems, Nanterre, France) for congo red stained sections or with the Fiji software (version 2.0, National Institute of Health, Bethesda, MD) for ThT stained sections. For each tissue section, the number and the surface of amyloid aggregates were quantified in the hippocampus and in the cortex. To evaluate the number and the surface of amyloid plaques per hemi-brain, all the values obtained for one animal were pooled. These data were then normalized by the total surface of hippocampus or cortex analyzed per animal. Amyloid plaques were also quantified in different regions of the hippocampus corresponding to dentate gyrus (DG), CA1, CA2 and CA3. Two independent quantifications of amyloid aggregates were done blindly and no differences were observed between the two analyses performed.

$A\beta_{1-42}$ assay

Brain homogenates were performed as described previously (Lafon et al., 2018). Briefly, frozen left hemispheres were homogenized in 20% weight/volume (w/v) in a homogenization buffer (140 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.7 mM KH_2PO_4 and 1 mM

EDTA) containing proteases (Complete Ultra, Roche, Basel, Switzerland) and phosphatases inhibitors (PhosStop, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Homogenization was performed using microbead-containing tubes and a ribolysor apparatus (Biorad, Marnes la Coquette, France). Samples were aliquoted and immediately frozen at -80°C until use. For the $A\beta_{1-42}$ assay, 2% SDS has been added to brain homogenates before being ultra-centrifuged at 196,000 g (Beckman Optima TL100 Centrifuge) for 30 min at 4°C. The supernatant was kept at -80°C until use. The soluble fractions of human $A\beta_{1-42}$ peptides were quantified using an ELISA kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Saint Herblain, France). Results were normalized according to their protein concentration determined by the BCA (bicinchoninic acid method) protein assay (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, Saint Herblain, France). Data are expressed as mean ± SEM ng/mg (nanograms of soluble human $A\beta_{1-42}$ per milligram of brain tissue).

Immunohistochemistry and quantifications

Inflammation was analyzed using a mouse monoclonal anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (1:1000, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for astrogliosis, or with a rabbit polyclonal anti-IBA1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) (1:750, Wako Chemicals, Osaka, Japan) for microgliosis. Briefly, sections were blocked 1 h at RT and incubated with one or the other primary antibodies overnight at 4°C. Then, sections were washed and incubated with secondary antibodies, a goat anti-mouse Cy3 (1:1000) or a goat anti-rabbit Alexa488 (1:1000) for 2 h at RT. Nuclei were stained with DAPI (1:50,000). Images were taken using a Leica DM2500 microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) and quantifications were performed using Fiji software (version 2.0, National Institutes of Health, Bethesda, MD) in the DG, CA1, CA2 and CA3. Astrogliosis, revealed by GFAP labeling, was evaluated by quantifying the number of astrocytes (proliferation), the intensity of the labeling (expression of GFAP) and the surface of the labeling (hypertrophy). The total number of microglial cells and the activated ones were

quantified based on their morphology (ramified versus amoeboid) as explained in Watson et al., 2012.

Interleukin and cytokine measures by TR-FRET (HTRF).

Brain homogenates prepared as described above, and to which 2% SDS has been added extemporaneously, were centrifuged at 14,000 rpm, for 20 min at 4°C. The supernatant was kept at -80°C until use. Interleukin and cytokine levels were determined using mouse IL1β, IL6 or TNFα TR-FRET (Time resolved – Fluorescence Resonance Energy Transfer) or HTRF assay kits (Cisbio, Codolet, France). According to the manufacturer's personalized advices and protocol, 16 µL of supernatants, were associated to 2 µL of anti-IL1β, IL6 or TNFα donor antibody coupled to Eu^{3+}-cryptate and 2 µL of anti-IL1β, IL6 or TNFα acceptor antibody coupled to d2 and incubated 1 h (IL6 and TNFα) or overnight (IL1β) at 25°C. Standart curves of each kit were diluted in the same sample buffer, including SDS. FRET signal was measured using the d2 acceptor emission (665 nm) and the Eu^{3+}-cryptate donor emission (620 nm) with a 100 µs lag time and a 400 µs integration time after excitation at 337 nm on a Spark 20M (Tecan). HTRF ratio (signal 665 nm/ 620 nm x10^4) was calculated to normalize the different wells. Results were then normalized according to their protein concentration determined by BCA. Data are expressed as mean ± SEM pg/mg (picograms of IL1β, IL6 or TNFα per milligram of brain tissue).

Neuron quantification in the hippocampus

Brain tissue sections of WT and J20 mice, treated or not with pesticides, were mounted on Superfrost Plus glass slides and stained with a 0.4% cresyl violet solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The undamaged neurons were quantified on four different images in the different areas of the hippocampus: DG, CA1, CA2 and CA3. Images were acquired on a Leica DM2500 microscope (40X) and quantifications were performed using Fiji software.

2-photon longitudinal study

The 2-photon experiments were performed on a second independent study using J20 mice, treated or not with pesticides (n=9), as described in Arango-Lievano et al., 2016 and Giannoni et al., 2016. Briefly, mice were injected with 10 mg/kg of Methoxy-XO4 (Tocris Bioscience, Lille, France) by intraperitoneal route, 48 h before imaging, to stain amyloid aggregates. Animals were anesthetized and injected in the retro-orbital sinus with 100 mg/kg of dextran-FITC (70 kDa) the day of imaging, to stain blood vessels. The longitudinal study was performed at 3, 6 and 9 months of treatment. Images acquisition was performed through a thinned skull window on a head restrained mouse using a Zeiss LSM7 2-photon microscope with a 20X objective. A first stack of images was taken with a 0.7X numerical zoom (size of image 500 µm X 500 µm) in order to be able to locate the same brain area at each time point. Then, this region selected has been divided in 4 areas of identical surface and stack of images were taken with a 2X numerical zoom (200 µm X 200 µm) with a 1 µm step. The number of aggregates was quantified using Fiji software, in the 4 areas at 3, 6 and 9 months, on a same number of images. Imaris 8.0 (Bitplane, Zürich, Switzerland) software was used for a 3D reconstruction of the stacks and the volume of aggregates was quantified and normalized by the total volume of the stack.

Immunoblotting

Immunoblotting was performed as described previously (Lafon et al 2018). Briefly, brain homogenates, to which 2% SDS has been added, were centrifuged at 14,000 rpm, 20 min at 4°C, to remove membrane debris. Protein concentration was measured on supernatants using the BCA protein assay and samples were all normalized to the same concentration and volume. Samples were diluted (1:1) in 2X loading buffer (0.1 M DTT, 3% SDS, 20% glycerol, 0.4 M Tris-HCl pH 7.4, bromophenol blue), boiled 10 min at 90°C and loaded on a 4-15% SDS-PAGE gradient precast gel (Biorad, France). After protein transfer, PVDF membranes were blocked in 5% non-fat milk solution and were

incubated with primary antibody (either anti-β-amyloid 1-16 monoclonal antibody (6E10 clone, 1:1000, Biollegend, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France), or anti-APP A4 polyclonal antibody (22C11 clone, 1:1000, Merck-Millipore, Guyancourt, France), or anti-BACE1 polyclonal antibody (1:500, Cell signaling technology, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux), or anti-IDE polyclonal antibody (1:1000, Abcam, Paris, France), or anti-LRP1 polyclonal antibody (1:30 000, Abcam), with an anti-NEP polyclonal antibody (1:2000, Merck-Millipore) or anti-ADAM10 polyclonal antibody (1:2000, Merck-Millipore)) overnight at 4°C. Then, membranes were incubated with the corresponding secondary antibodies: peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:10,000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) or anti-rabbit (1:5000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) for 2 h at RT. Protein loading controls were performed using a mouse anti-β-actin antibody (1:1000, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Membranes were revealed with a ChemiDoc MP Imager (Biorad, Marne la Coquette, France) using the signal accumulation mode and signals were quantified on the Image Lab software (version 6.0.1; Biorad).

mRNA extraction and quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Total mRNA was extracted from brain homogenates using the Nucleospin RNA extraction kit (Macherey Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNA quality and concentrations were measured using a NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). mRNA was reverse-transcripted with the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Saint Herblain, France) and amplified by real-time PCR using a Light Cycler detection system (Roche, Basel, Switzerland) according to the instructions provided by the manufacturer. qRT-PCR were performed in collaboration with the qPHD platform (University of Montpellier, France) following the “MIQE” guidelines (Bustin et al., 2009) and the β-actin was used as a reference gene. The ΔC_t value of the reference and target genes was quantified as explained previously (Nasri et al., 2016). For each target

gene tested, experiments were performed three times independently in triplicates. Primers used for qRT-PCR amplification are described in **Table 2**.

Table 2. Primers used for qRT-PCR.

Gene name		Primer sequence	Gene bank ID
mApp	For	5'-ATC GTG ATT CCT TAC CGT TGC-3'	NM_007471.2
	Rev	5'-CTC TTC TCG CTG CAT GTC TC-3'	
hApp	For	5'-GCC CTG CGG AAT TGA CAA G-3'	NM_000484.3
	Rev	5'-CCA TCT GCA TAG TCT GTC TCT G-3'	
Nep	For	5'-GAG CCC CTT ACT AGG CCT GTG T-3'	NM_007859.1
	Rev	5'-CTC GAT TCA GAC ATA GGC TTT CTA AA-3'	
Ide	For	5'-ACG GTA TTC CCG TTT GTC TTC-3'	NM_031156.3
	Rev	5'-CCG GCC ATC CAG AGA ATA GAA-3'	
Bace1	For	5'-TGC GGC GTT TTC ATG GT-3'	NM_011792.6
	Rev	5'-TCC GGC TCA GAA CTA CAG TGT AAT-3'	
Lrp1	For	5'-GGA CCA CCA TCG TGG AAA-3'	NM_008512.2
	Rev	5'-TCC CAG CCA CGG TGA TAG-3'	
β-actin	For	5'-GCA AGC AGGAGT ACG ATG AG-3'	NM_007393.5
	Rev	5'-AGG GTG TAA AAC GCA GCT C-3'	

Statistical analyses.

All data were analyzed on GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), first using Shapiro's normality test before further statistical analyses. Statistical analyses were performed using a multiple T-test, linear correlations, one-way or two-way ANOVAs followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis, a more stringent test. A probability of 0.05 has been defined as a significant difference.

RESULTS

Cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil bind to amyloid plaques of J20 mice *ex vivo.* To evaluate a possible impact of anilinopyrimines on aggregates, we first checked if cypro, mepa and pyri could bind to amyloid plaques *ex vivo*. To this aim, we incubated brain tissue sections from 10 months old J20 mice with 2 mM of fungicides, either alone or in cocktail, for 1.5 h at RT. To detect these molecules we used some anti-pesticide antibodies against cypro (Esteve-Turrillas et al., 2012), mepa (Esteve-Turrillas et al., 2013) and pyri (Mercader et al., 2012) (**Figure 1A, red channel**). Amyloid aggregates were revealed using a 6E10 antibody conjugated to Alexa 488 (**Figure 1A, green channel**). Remarkably, the merge column showed that fungicides, either incubated alone or in cocktail, bind to the amyloid plaques present in the sections (**Figure 1A 2-6**). Controls, using an equivalent volume of DMSO (≈1%) did not show non-specific fluorescence in the red (**Figure 1 A1**). Further controls to check the specificity of the anti-pesticide antibodies were done and demonstrated the absence of non-specific background (**Supplementary Figure 1 A-H**).

Cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil increase the kinetic of formation of $A\beta_{1-42}$ fibrils *in vitro*. Since pesticides bind to amyloid plaques *ex vivo*, we wondered what could be the effect of cypro, mepa and pyri mixed in a cocktail on the kinetic of formation of $A\beta_{1-42}$ fibrils. Aβ peptides monomers were obtained using a size exclusion chromatography to exclude oligomeric species as described by Serra-Batiste et al 2016. For the kinetics of amyloid fibrils formation, we mixed monomers of $A\beta_{1-42}$ peptide with the three anilinopyrimidines at a molar ratio of 1:15 (Aβ:individual pesticide). The control condition was performed with an equivalent volume of DMSO. The tubes were incubated at 25°C for several days. The kinetic of fibril formation was controlled by pipetting aliquots of the mix, once a day, and monitored by Thioflavin T fluorescence. Results showed that the presence of pesticides dramatically modified the kinetic profile, by

accelerating the formation of $A\beta_{1-42}$ fibrils via a substantial reduction of the lag phase and by increasing the level of ThT fluorescence at the beginning of the elongation phase (**Figure 1B**). The higher level of ThT fluorescence is kept during all the elongation phase. The striking modification of the kinetic of fibril formation combined with *ex vivo* studies on brain tissue sections strongly suggest that we have an interaction between the fungicides and the $A\beta_{1-42}$ peptides.

Treatment of J20 mice with 0.1 µg/L of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil increases both amyloid deposits and soluble $A\beta_{1-42}$ fractions. As the three fungicides increase the kinetic of aggregation of the $A\beta_{1-42}$ peptides *in vitro* and interact with amyloid aggregates *ex vivo*, our aim was to determine their impact on the amyloid burden *in vivo*. To this aim we used the transgenic J20 mouse model of AD overexpressing human $A\beta_{1-42}$ due to the familial Swedish and Indiana mutations on the *APP* gene ($hAPP_{Swe/Ind}$) (Mucke et al., 2000). A characteristic of this mouse model is the formation of aggregates in the hippocampus and cortex, which is age-dependent (Wright et al., 2013). At 9 months of age, J20 mice exhibit an inter-individual homogeneity of the number of aggregates allowing the quantification of aggregates upon treatments. Because residues of anilinopyrimidines have contaminated all the environmental media and since the ultimate receptacle of this contamination is the fresh waters, we have selected this mode of contamination for our study. In addition, we focused on very low doses supposed to be without any effect on humans' health (EFSA, 2018). Thus, for each compound, we used the regulatory maximal limit dose allowed in drinking water: 0.1 µg/L. According to the E.U. regulations, cocktail of pesticide residues in drinking water cannot exceed 0.5 µg/L. Wild type (WT, n=28) and transgenic (J20, n=24) mice were treated with 0.1 µg/L of cypro, mepa and pyri mixed in a cocktail and administered through drinking water. Control groups of WT (n=27) and J20 (n=25) mice did not receive any treatment. The treatment started after weaning of mice and lasted 9 months, so mice were sacrificed at 10 months of age for analyses. To determine the impact of

the treatment on amyloid aggregates, we performed histological analyses using a thioflavin T (ThT) staining (**Figure 2**). We quantified the number and the size of aggregates in the hippocampus and the cortex of the different groups. As expected, WT mice non-treated (NT) or treated (T) with the cocktail of pesticides did not exhibit ThT-positive aggregates neither in the hippocampus nor in the cortex (**Figure 2A-left panel; 2B-E**). These results are consistent with the literature as mouse Aβ peptides starts aggregating at 15 months (Ahlemeyer et al., 2018). In transgenic J20 mice, the analysis of the number of aggregates per cm^2 revealed a significant difference between the groups (in hippocampus: $F(3,19) = 106$ *p*-value < 0.001; in cortex: $F(3,19) = 51.16$ *p*-value < 0.001, one way ANOVA) (**Figure 2B, D**). Using the stringent Holm-Sidak (HS) *post-hoc* analysis, our data showed a significant increase in the number of aggregates in J20 mice treated with pesticides compared to J20 control mice in both areas analyzed (in hippocampus: 421 ± 29.4 aggregates/cm^2 for J20 NT vs 530 ± 23.7 for J20 T, *p*-value = 0.006 and in cortex: 173.9 ± 14.6 for J20 NT vs 266.5 ± 23.1 for J20 T, *p*-value < 0.001). The treatment with fungicides also modified the surface of ThT-positive plaques in both areas (one-way ANOVA, in hippocampus: $F(3,19) = 63.91$ *p*-value < 0.001; in cortex: $F(3,19) = 45.64$ *p*-value < 0.001) (**Figure 2C, 2E**). Holm-Sidak *post-hoc* analysis revealed a significant increase of the surface of aggregates between J20 NT and J20 T mice in the hippocampus (**Figure 2C**, 0.279 ± 0.026 A.U. for J20 NT vs 0.397 ± 0.025 for J20 T, *p*-value = 0.018) as well as in the cortex (**Figure 2E**, 0.108 ± 0.01 for J20 NT vs 0.194 ± 0.018 for J20 T, *p*-value < 0.001). These results were confirmed using a second independent staining based on congo red dye (**Supplementary Figure 1**). Distribution of aggregates in the different areas of the hippocampus (dentate gyrus (DG), CA1, CA2 and CA3) revealed that the increased number of plaques in J20 T mice is essentially located in the CA1 region (**Figure 2F**) (multiple t-tests with HS correction; 108.1 ± 12.1 aggregates/cm^2 for J20 NT vs 172.7 ± 26.8 for J20 T, *p*-value = 0.04). The same observation was noticed for the surface of ThT- positive aggregates (**Figure 2G**) (0.075 ± 0.007 A.U. for J20 NT vs

0.135 ± 0.019 for J20 T, *p*-value = 0.03). Supernatants collected after ultracentrifugation of brain homogenates, were used to quantify soluble human $A\beta_{1-42}$ levels. Results showed that J20 treated mice exhibits almost 3 times more soluble $A\beta_{1-42}$ compared to their non-treated littermates (one-way ANOVA: $F(3,12) = 24.11$ *p*-value < 0.001; HS *post-hoc* analysis: 0.465 ± 0.212 pg/mg of proteins for J20 NT vs 1.323 ± 0.140 pg/mg for J20 T, *p*-value = 0.0018) (**Figure 2H**). Altogether these results demonstrate that the cocktail of cypro, mepa and pyri increases both soluble and insoluble forms of Aβ peptides, *in vivo*.

Treatment with the cocktail of fungicides substantially increases astrogliosis in the dentate gyrus and CA1 areas of J20 mice.

Inflammation processes are one the hallmarks of Alzheimer's disease and is associated by the presence of both activated astrocytes and microglia. The glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is up regulated under pathological conditions, is a typical feature of the activation of astrocytes and their morphological changes (Eng et al., 1992). To determine the impact of the chronic pesticide exposure on astrocyte's activation, we performed an immunohistochemistry on brain tissue sections using a GFAP antibody, analyzing the different areas of the hippocampus (DG, CA1, CA2 and CA3) (**Figure 3A**). Three parameters related to the GFAP labeling were quantified: the intensity of the labeling reflecting GFAP expression in astrocytes underlining a possible astrogliosis (**Figure 3B-E, left panels**); the surface of the labeling to quantify the hypertrophy of astrocytes (**Figure 3B-E, right panels**); and the number of GFAP-positive cells, reflecting their capacity to proliferate (**Supplementary Figure 2**). Regarding transgenic J20 mice, no differences were observed in the proliferation of astrocytes in the four different regions analyzed (**Supplementary Figure 2A-D**). However, treatment significantly up-regulates GFAP expression in the CA1 area of J20 mice reflecting an astrogliosis (**Figure 3C, left panel**) (one-way ANOVA: $F(3,9) = 6.89$ *p*-value = 0.01 for intensity; HS *post-hoc* analysis: 1749 ± 285.8 A.U. for J20 NT vs 3456 ± 478.1 for J20 T;

p-value = 0.030). We noticed a tendency of up-regulation of GFAP in the dentate gyrus (DG) although it is not statistically significant (one-way ANOVA: $F(3,9) = 2.38$ *p*-value = 0.14; HS *post-hoc* analysis: *p*-value = 0.348) (**Figure 3B, left panel**). However, both DG and CA1 (**Figure 3B-C, right panel**) exhibit an hypertrophy of astrocytes upon treatment (in DG one-way ANOVA: $F(3,9) = 5.12$ *p*-value = 0.024; HS *post-hoc* analysis: 47.3 ± 8.6 μm^2/cell for J20 NT vs 96.4 ± 13.1 for J20 T mice, *p*-value = 0.047; in CA1 one way ANOVA $F(3,9) = 6.44$ *p*-value = 0,012; HS *post-hoc* analysis: 39.4 ± 5.9 μm^2/cell for J20 NT vs 82.9 ± 11.6 for J20 T, *p*-value = 0.028). Regarding WT mice, a significant increased proliferation of astrocytes has been found only in the CA2 region (one-way ANOVA: $F(3,9) = 10,46$ p-value = 0.0027; HS *post-hoc* analysis: 375.7 ± 99.9 for WT NT vs 651.1 ± 34.1 astrocytes/mm^2, *p*-value = 0.027) (**Supplementary Figure 2C**). However, this proliferation in CA2 is not yet associated with astrogliosis through an up regulation of GFAP or an hypertrophy of astrocytes at 10 months (**Figure 3C,** $F(3,9) = 0.32$ *p*-value = 0.81 and $F(3,9) = 0.27$ *p*-value = 0.84 respectively).These results show that the treatment triggers an astrogliosis, mainly in the transgenic mice model.

Microglial-mediated inflammation is increased in the hippocampus of J20 mice upon treatment. Microglial-mediated inflammation implicates morphological changes in microglial cells from a ramified state (quiescent) to an activated state (amoeboid) and cell proliferation (Ito et al., 1998). To study microglial cells we performed histological analyses using the constitutive marker, IBA1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1). Labeling in the hippocampus was quantified as the total number of IBA1-positive cells and the amoeboid ones. In WT mice, the analysis of microglial cells in the DG, CA1, CA2 and CA3 did not exhibit any difference upon treatment with the cocktail of pesticides (**Figure 4A-E**). By contrast, for J20 treated mice, proliferation of microglial cells is increased in all regions analyzed of the hippocampus compared to their non-treated littermates (**Figure 4B-E, left panels**) (one-way ANOVAs: *p*-values < 0.05; HS *post-hoc* analysis: DG: 266.7 ± 9.9 total number of microglial cells/mm^2 for J20 NT vs

518.1 ± 47.2 for J20 T, *p*-value < 0.001; CA1: 148.4 ± 11.8 for J20 NT vs 217.9 ± 7.5 for J20 T, *p*-value = 0.0036; CA2: 150.7 ± 8.2 for J20 NT vs 268.3 ± 25.8, *p*-value = 0.0029 and CA3: 193.5 ± 5.3 for J20 NT vs 272.6 ± 23.9 for J20 T, *p*-value = 0.014). The treatment also induced an increased number of activated forms of microglia in the DG, CA2 and CA3 areas in J20 mice at 10 months (one-way ANOVAs: *p*-values <0.05; HS *post-hoc* analysis: DG: 95.17 ± 11.01 activated microglia/mm^2 for J20 NT vs 178.9 ± 21.07 for J20 T, *p*-value < 0.006; CA2: 43.97 ± 3.3 for J20 NT vs 75.36 ± 8.09, *p*-value = 0.019 and CA3: 44.77 ± 4.34 for J20 NT vs 76.34 ± 6.87 for J20 T, *p*-value = 0.006). In the CA1 region there is a clear tendency of increased amoeboid forms in J20 treated mice (HS *post-hoc* analysis: 45.09 ± 5.9 for J20 NT vs 65.37 ± 6.18 for J20 T, *p*-value = 0.077). These results show that chronic treatment with low doses of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil exacerbates the microglial-mediated inflammation in the hippocampus of J20 mice.

Chronic treatment with the cocktail of fungicides increases IL1β and IL6 secretion. Because brain inflammatory processes mediated by astrocytes and microglial cells are associated with the secretion of pro-inflammatory interleukins and cytokines, we performed assays to measure their brain levels. Using kits based on HTRF-FRET, interleukin 1β (IL1β), interleukin 6 (IL6) and tumor necrosis factor α (TNFα) were measured on brain homogenate supernatants, previously centrifuged to clear membrane debris (**Figure 5**). Results showed that J20 treated mice exhibits about 1.5 times more IL1β levels compared to their non treated littermates (one-way ANOVA: F(3,9) = 7.23 *p*-value < 0.009; HS *post-hoc* analysis: 10.74 ± 1.18 pg/mg of proteins for J20 NT vs 17.72 ± 1.15 pg/mg for J20 T, *p*-value = 0.0093) (**Figure 5A**). In addition, IL6 levels were also significantly higher (≈ 3 times) in the brains of J20 treated mice (one-way ANOVA: F(3,9) = 5.17 *p*-value = 0.0238; HS *post-hoc* analysis: 0.39 ± 0.05 pg/mg of proteins for J20 NT vs 1.09 ± 0.15 pg/mg for J20 T, *p*-value = 0.0429) (**Figure 5B**). However, TNFα levels were not modified by the chronic treatment of pesticides (one-way ANOVA:

F(3,9) = 0.642 *p*-value = 0.6072) (**Figure 5C**). Regarding WT mice, no modification of IL1β or TNFα levels were observed (IL1β: HS *post-hoc* analysis: 14.95 ± 1.26 pg/mg of proteins for WT NT vs 12.8 ± 0.91 pg/mg for WT T, *p*-value = 0.3926; TNFα: HS *post-hoc* analysis: 1.32 ± 0.17 pg/mg of proteins for WT NT vs 1.13 ± 0.09 pg/mg for WT T, *p*-value = 0.9029) (**Figure 5A-B**). A tendency to increase IL6 levels in WT T mice is visible but is not statistically significant (HS *post-hoc* analysis: 0.44 ± 0.09 pg/mg of proteins for WT NT vs 0.95 ± 0.26 pg/mg for WT T, *p*-value = 0.1978) (**Figure 5C**). These data confirm the presence of a general inflammation state in J20 treated mice, which is however not observed in WT mice treated with the cocktail of fungicides.

Adverse effects of pesticide treatment on hippocampal neuronal loss.

In the J20 mouse model, a correlation is established between the neuronal cell loss in the CA1 region of the hippocampus and the amounts of Aβ deposits at 12 weeks of age (Wright et al., 2013). As we observed higher amounts of Aβ deposits in the hippocampus of J20 treated mice, associated with inflammation, we wondered if these factors could enhance neuronal loss. For this purpose, we stained brain tissue sections with cresyl violet to study undamaged neurons in the four different regions of the hippocampus (DG, CA1, CA2 and CA3) (**Figure 6**). Remarkably in WT animals, analyses revealed that treatment with pesticides increased the number of undamaged neurons in all the regions of the hippocampus, especially the CA3, where the thickness of pyramidal cell layer is clearly visible (**Figure 6**) (Means ± SEM and statistical analysis for WT mice are presented in **Supplementary Figure 4**). Treatment had no effect on neurogenesis in the dentate gyrus of WT mice (**Figure 5B**). As described by Wright et al., 2013, we observed a clear tendency of neuronal loss in the CA1 region of the hippocampus between WT and J20 non-treated animals (**Figure 5C**) (one-way ANOVA: F(3,15) = 13.33 *p*-value < 0.001; HS *post-hoc* analysis: 61.25 ± 3.36 neurons/mm^2 for WT NT vs 50.57 ± 2.86 for J20 NT p-value = 0.052). Interestingly, analysis of neurons in the CA3 area demonstrated a significant decrease of undamaged neurons in J20 T compared to

J20 NT mice (one-way ANOVA: $F(3,15) = 15.64$ p-value < 0.001; HS *post-hoc* analysis: 112.3 ± 4.34 neurons/mm^2 for J20 NT vs 97.95 ± 2.87 for J20 T p-value = 0.0408). Altogether, these results show an augmentation of pyramidal cell layer in the CA1-CA3 areas only for WT treated animals, however in the J20 mice, the treatment has a clear impact on neuronal loss in the CA3.

Amyloid cerebral angiopathy is exacerbated after 6 months of chronic treatment with pesticides. Chronic treatment of J20 mice with a cocktail of anilinopyrimidines demonstrated both an increase in the number and surface of aggregates in the cortex and the hippocampus of J20 mice at 10 months of age (**Figure 1**). Because this transgenic mouse model is also known for its cerebral amyloid angiopathy (CAA) phenotype (Kimbrough et al., 2015), we wondered if treatment with fungicides could also aggravate vascular aggregates. Thus, we performed a second independent chronic treatment to perform a longitudinal study of the aggregation process using 2-photon microscopy in the superficial cortex. This technique allowed us to monitor the same brain area over time. In this experiment, J20 mice treated (n=5) or not (n=3) with pesticides underwent three imaging sessions at 3, 6 and 9 months of treatment (**Figure 7 and 8**). Mice were injected at each time point with methoxy-XO4, an amyloid aggregates dye (artificially colored in red) and with dextran-FITC to stain blood vessels (in green). As expected, no methoxy-XO4-positive aggregates were detected at 3 months on the superficial cortex in both groups, since at this age the first aggregates are only visible in the hippocampus (**Figure 7A-B**). In J20 NT mice we observed an accumulation of Aβ peptides both around blood vessels (yellow arrows) and in the parenchyma (red arrows) at 6 and 9 months (**Figure 7A**). Strikingly, J20 mice treated with the cocktail exhibit an enhanced perivascular aggregation at 9 months compared to their non-treated littermates (**Figure 7B**). We quantified the total number of aggregates, as well as their distribution in the parenchyma and around blood vessels. A two-way ANOVA followed by a Holm-Sidak *post-hoc* analysis revealed that the number of vascular aggregates at 9

months are about 3 times higher in J20 treated mice compared to non-treated animals (**Figure 7E**, 63.67 ± 12.91 for J20 NT vs 183.4 ± 52.66 for J20 T, *p*-value = 0.031), whereas parenchymal aggregates are not impacted by the cocktail of fungicides (**Figure 7D**). We determined a linear correlation between the number of vascular and parenchymal aggregates in J20 NT mice (**Figure 7F, blue line**, y = 0.43x + 0.15, Pearson's correlation coefficient (r) = 0.995, *p*-value < 0.001). However, when treatment is applied on J20 mice, the linear correlation is modified to the benefit of vascular aggregates but is still statistically significant (**Figure 7F, red line**, y = 1.44x + 0.15, r = 0.804, *p*-value = 0.005). When counting the number of aggregates we noticed the fusion of some plaques between 6 and 9 months in J20 treated mice, as represented with the white arrows in **Figure 7B**, leading to an under-quantification of aggregates number. To overcome this bias, we performed a 3D reconstruction with Imaris software on the stacks of images acquired at 3, 6 and 9 months of treatment to quantify the volume of aggregates (**Figure 8A**). In these 3D images, we found the main characteristic of CAA, which is the presence of vascular aggregates on leptomeningeal and penetrating vessels surrounded by some parenchymal aggregates (**Figure 8B**). A deeper analysis of the aggregates reminiscent to CAA revealed that vascular plaques are always deposited on the vessel walls, and we never observed aggregates crossing the blood vessels. This last point suggests that these vascular plaques are rather produced in the brain than coming from the periphery through the bloodstream. We performed a quantification of the total volume of aggregates, as well as the distribution between the parenchymal and vascular ones, normalized by the total volume of the stacks. A two-way ANOVA followed by a HS *post-hoc* analysis demonstrated a 3-fold significant increase of the total volume of aggregates at 9 months of treatment (**Figure 8C**, 60.1 ± 4.68 for J20 NT vs 173.9 ± 49.51 for J20 T, *p*-value = 0.028). This raised to an 18-fold increase if we consider only the volume of vascular aggregates (**Figure 8E**, 6.86 ± 1.15 for J20 NT vs 125.6 ± 60.06 for J20 T, *p*-value = 0.023). The linear correlation between the volumes of vascular versus parenchymal aggregates showed

that the correlation is still significant for the J20 non-treated mice (**Figure 8F, blue line**, y = 0.127x - 0.314, r = 0.915, *p*-value < 0.001), but disappeared for the J20 treated animals (**Figure 8F, red line**, y = 0.054x + 49.74, r = 0.019, *p*-value = 0.948). Altogether, our results confirm the increase of amyloid deposits upon pesticide treatment observed by ThT staining (**Cf. Figure 2**). Between 6 and 9 months of chronic exposure to the cocktail of anilinopyrimidines, we remarkably trigger the formation of vascular amyloid deposits on the superficial cortex that are reminiscent to CAA.

Fungicide treatment modulates BACE1 and NEP expression in brain tissue.

Total mRNA was extracted from brain homogenates of 10 months old J20 mice treated (T, n=4) or not (NT, n=4) with a cocktail of cypro, mepa and pyri. Same procedure was performed for their WT littermates (NT n=3; T n=3). As amyloid plaques and soluble forms of $A\beta_{1-42}$ are increased upon fungicide treatment, we address whether cypro, mepa and pyri could modulate homeostasis of Aβ, either production or clearance. We first analyzed mRNA expression of endogenous *App* (**Figure 9A1**), human *App* (**Figure 9B1**), *Bace1* (**Figure 9C1**), *Ide* (**Figure 9D1**), *Nep* (**Figure 9E1**) and *Lrp1* (**Figure 9F1**) by qRT-PCR. No modifications of mRNA expression were observed for all the genes tested between treated and non-treated mice (one-way ANOVAs, $p > 0.05$). In parallel, we analyzed the expression of proteins cited above by immunoblotting. Analysis revealed a substantial increase of BACE1 expression in J20 treated mice compared to non-treated control mice (**Figure 9C2**, 0.587 ± 0.058 for J20 NT vs 0.787 ± 0.046 for J20 T, T-test, *p*-value = 0.036). In addition, NEP, one of the main clearance enzymes has a 50% decrease of its expression after 9 months of treatment in J20 mice (**Figure 9E2**, 0.274 ± 0.032 for J20 NT vs 0.141 ± 0.024 for J20 T, T-test: *p*-value = 0.017). Altogether, these results show that the increase of both soluble and aggregated Aβ species upon treatment, derives from a disturbance of both production and clearance pathways.

DISCUSSION

Pesticides are widely used compounds to preserve fields and harvests from pests. Their massive use since the 20th century has led to the contamination of all environmental media (water, soil, air) leading to residues in our diet. Although these compounds are present at very low concentrations (from pg/L to µg/L), the long-term effect of multiple pesticide residues on human health is subject to intense debate and concerns. Toxicological regulations are mainly based on high dose effects studies and minimize the consequences of these traces. In addition, according to European food safety authority (EFSA), pesticide residues can be consumed over a lifetime without presenting a risk for human health (EFSA, 2018). However, some studies have now demonstrated the impact of these chemical traces on human health. A recent study conducted by Gamet-Payrastre and colleagues showed that chronic dietary exposure to a cocktail of 6 commonly used pesticides in France, at the acceptable daily intake concentrations, has an obesogenic and diabetogenic effect on WT mice, treated for 52 weeks (Lukowicz et al., 2018). Regarding neurodegenerative diseases, especially AD, the link with pesticide residues is not clearly established, since epidemiological studies can hardly associate a multiple chronic exposure to low doses of pollutants occurring throughout life and the pathology. However, a study conducted by Richardson et al. showed that DDE can accumulate in the brain of AD patients, although this herbicide was prohibited since the 70's (Richardson et al 2014). Besides, acute injections of chlorpyrifos (50 mg/kg) or paraquat (10 mg/kg twice a week for 3 weeks) to Tg2576 ($hAPP_{Swe}$) mice induce an increased production of Aβ peptides in the brain (Chen et al., 2012; Salazar et al., 2011). However, the doses and the route of treatment are not relevant to consumers' exposure to pesticides. To address the effect of pesticide residues in AD, we used the J20 mouse model that has been chronically exposed to a cocktail of three anilinopyrimidine fungicides (cypro, mepa and pyri) through drinking water. Those residues are frequently detected in the European diet (**Table 1)**. Mice were treated with 0.1 µg/L of each

pesticide, leading to a final concentration of 0.3 µg/L in water. According to the E.U. regulations, 0.1 µg/L corresponds to the maximal dose allowed for one pesticide in tap water and cannot exceed 0.5 µg/L for the presence of multiple residues.

Fungicide cocktail enhances plaque formation in the hippocampus and the cortex of J20 mice. Our results show that a 9 months exposure to residues of cypro, mepa and pyri (0.1 µg/L of each compound) induces a substantial increase in the number of amyloid plaques of about 26% and 53% in the hippocampus and the cortex of J20 mice, respectively (**Figure 2 B, D**). Similarly, the treatment boosts the surface of amyloid aggregates as well (hippocampus ≈ 42%; cortex ≈ 80%) (**Figure 2 C, E**). These results suggest that the three pesticides are able to interfere directly in the aggregation process, as shown by our *in vitro* studies (**Figure 1**). Remarkably, we showed that incubation of pesticides alone or in cocktail on J20 brain tissue sections co-localizes with amyloid plaques reflecting an affinity of these pesticides towards amyloid fibrils (**Figure 1A**). Besides, kinetics of amyloid fibrils formation in presence of anilinopyrimidine compounds drastically reduces the lag phase and increases by more than 50% the ThT fluorescence intensity at the plateau (**Figure 1B**). After 100 h of incubation of $A\beta_{1-42}$ peptides with 750 µM of pesticides, the kinetic reaches the plateau phase, while the control curve only begins its elongation phase, suggesting that these compounds promote a much faster nucleation than for control. Our *in vitro* studies demonstrate a pro-aggregating effect of the mixture of the three pesticides. Remarkably, this process also occurs in J20 mice treated with concentrations as low as 444-502 pM (0.1 µg/L) while a dilution factor of about $1.5x10^6$ is applied between the 2 experiments (**Figure 1-2**). Brain homogenates analyses also show that J20 treated mice present almost 3 times more soluble $A\beta_{1-42}$ levels than the control group (**Figure 2H**). Because the kinetics of fibril formation starts immediately in the presence of pesticides (**Figure 1B**), we hypothesize that the increased soluble $A\beta_{1-42}$ fractions (ELISA assay) are mainly composed of soluble oligomeric species, rather than monomers. The substantial increase of Aβ species upon

treatment derives in part from an increased β-cleavage of APP and a decreased clearance of amyloid peptides (**Figure 9E**). Recently, effects on β- and γ-secretases associated to an overproduction of $A\beta_{1-42}$ peptides have been described for 6 triazines herbicides on iPSCs derived from FAD patients (Portelius et al., 2016).

Cerebral amyloid angiopathy is increased upon fungicide cocktail treatment. Long-term exposure to cypro, mepa and pyri for 9 months increases amyloid deposits in the hippocampus and the cortex of J20 mice. However, we do not know when the pro-aggregative effect starts in J20 treated mice, compared to control animals. For this purpose we carried-out a longitudinal study, using a 2-photon microscope, on the superficial cortex of J20 mice at 3, 6 and 9 months of treatment (**Figure 7-8**). Analysis of the different time-points revealed that treatment of J20 mice: (*i*) increases amyloid plaque formation between 6-9 months; (*ii*) causes a substantial augmentation of vascular amyloid plaques both in number (x3 fold, **Figure 7C-E**) and volume (x18, **Figure 8C-E**), reminiscent to cerebral amyloid angiopathy (CAA); and (*iii*) has no incidence on parenchymal aggregates of the superficial cortex. Analysis of the 3D reconstructed images also showed that vascular aggregates are placed only on the blood vessel walls and do not cross them. These results suggest that the enhanced CAA observed in J20 treated mice could also be related to defects in the interstitial fluid drainage to eliminate the surplus of aggregates (Yoon and Jo, 2012). This striking effect on the CAA is likely linked to the absence of blood brain barrier (BBB) of leptomeningeal vessels, combined with a disruption of the BBB in J20 mice, facilitating the entrance of cypro, mepa and pyri into the central nervous system (CNS). Toxicological reports on the metabolism, distribution and elimination of those molecules showed that they are found in many tissues (liver, kidney, fat) and body fluids (urine, bile, milk and blood) (FAO reports). For instance, oral treatment of a cow with pyrimethanil (0.4 mg/kg of body weight/day for 7 days) results to the detection of 34 µg of metabolites in the blood. Results were similar for the biodistribution of pyri metabolites when treatment was applied to rats (FAO

reports). Altogether, these toxicological data demonstrate that anilinopyrimidines and their metabolites circulate in the blood and thus can reach the brain through leptomeningeal vessels. In addition, studies on J20 mice have showed that CAA deposits disrupt the normal contact of astrocytic end-feet with vessels, thus damaging the BBB (Kimbrough et al., 2015). This disruption is an open window for pesticides to reach CNS and strengthen CAA. Our results are in accordance with the permeability of the BBB of the J20 model. Previous studies have shown that β-amyloid deposits form a physical cast making blood vessels more rigid and unable to constrict and dilate as vessels free of amyloid, leading to vascular pathologies (Kimbrough et al., 2015). In this context, one can hypothesize that the chronic exposure to anilinopyrimidine residues of patients already having a permeability of the BBB and an altered gliovascular unit, could result in an aggravation of vascular deposits, leading ultimately to CAA - associated intracerebral hemorrhages (ICH). ICH is a known co-morbidity of AD and often leads to cognitive impairments (Shi et al., 2000).

Inflammation and neuronal loss aggravated upon fungicide treatment in J20 treated mice. Previous studies showed that J20 mice exhibit a peak of astrogliosis in the hippocampus at 6 months of age while activated microglial cells increase over time (Wright et al., 2013). Our results show that J20 T mice exhibit higher astrogliosis (DG, CA1, **Figure 3**), as well as activated microglial cells in the hippocampus at 10 months of age (**Figures 4**). In addition, activated microglial cells were associated with the neuronal cell loss in the CA1 area observed in the J20 mouse model (Wright et al., 2013). J20 T mice exhibit such neuronal loss (**Figure 6A, C**) but also in the CA3 area (**Figure 6A, E**) associated to an increased activation of microglial cells of about 40% (**Figure 4A, E**). This suggests that the CA3 neuronal loss is also associated to this massive increase of reactive microglia. Interestingly, *Post-mortem* studies performed on AD patient's brain revealed hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas compared to age-matched control subjects (Padurariu et al., 2012). The J20 model chronically exposed to

pesticides seems to be more related to human conditions. Amyloid plaques are also involved in the activation of microglial cells (Serrano-Pozo et al., 2011). Augmentation of amyloid aggregates in the hippocampus of J20 mice treated with pesticides (**Figure 2**), should likely participate in the increased number of amoeboid forms of microglia, as higher clusters around amyloid plaques are observed in the DG (**Figure 4A, lane 1**). Moreover, the inflammation processes induced by pesticides treatment lead to the secretion of the pro-inflammatory interleukins, IL1β and IL6 (**Figure 5A-B**) in the brain. These pro-inflammatory interleukins contribute to neuronal death in the hippocampus by activating toxic signaling pathways (Serrano-Pozo et al., 2011). In addition, IL1β, IL6 and TNFα receptors have been described to activate NFκB and AP-1 transcription factors. Interestingly, AP-1 can activate the transcription of BACE1, which could explain, in part, the increased expression of this β-secretase in the J20 treated mice (**Figure 9C**) (Chami and Checler, 2012). To summarize, the pesticides induce more inflammation and more amyloid aggregates perpetuating a vicious circle leading to higher accumulation of amyloid plaques and thus emphasizing inflammation and secretion of interleukins involving BACE1.

In conclusion, our study is the first one that demonstrated the effect of low doses of fongicides in the aggravation of Alzheimer's disease markers, in a transgenic mouse model reminiscent to familial cases. Because pesticides exacerbate amyloid fibril formation, amyloid plaques and inflammatory processes, one can suspect that they can either corrupt normal brain ageing or aggravate the markers of sporadic AD cases. Such low doses in water correspond to the limit of quantification and were considered as inoffensive, however our results demonstrated an opposite effect. Cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil can be considered as Alzheimerogen pollutants even at subnanomolar regulatory levels.

Abbreviations

Cypro: cyprodinil; Mepa: mepanipyrim; Pyri: pyrimethanil; AD: Alzheimer's disease; APP: amyloid precursor protein; Aβ: amyloid β-peptide; BACE1: beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1;CAA: cerebral amyloid angiopathy; GFAP: glial fibrillary acidic protein; IBA1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; IDE: insulin degrading enzyme; IL1β: interleukin 1-β; IL6: interleukin 6; LRP1: low density lipoprotein receptor-related protein 1; NEP: neprilysin; ThT: thioflavin T; TNFα: tumor necrosis factor α;

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

This project was supported by grants from The French National Research Agency (ANR) under the program "Investissement d'Avenir" with reference ANR-16-IDEX-0006, I-Site MUSE STEMPest and ANR-11-LABX-0021-LipSTIC. WY is the recipient of a fellowship from the China Scholarship Council under the PHC CAI YUANPEI 2014-16 project n° 32106RD. PAL is the recipent of a fellowhip from the French Ministry of Higher Education and Research, and from the Center of Excellence for Neurodegenerative diseases of Montpellier (CoEN) certified by AVIESAN as part of the PMND French plan (2014-2019).

Acknowledgments

We acknowledge the imaging facility MRI, member of the national infrastructure France-BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, «Investments for the future»). We thank Vicky Diakou and Elodie for their help in images acquisition and analysis. We also thank for their technical assistance and advices Marie-Paule Cabrera (CECEMA, Montpellier), Elisabeth Huetter. We thank CISBIO

Bioassays Research and Development team (Thomas Roux, Sarah Bdioui and Stéphanie Junique) for their technical assistance on HTRF technology.

Authors' contribution

P.A.L. and V.P. conceived the study, participated in its design and interpretation and wrote the manuscript. P.A.L., Y.W., J.T., M.A.L, L.S.P., MM, CD and V.P. performed the experiments and analysed data. J.V.M. provided antibodies against pesticides. NMF provided protocols and advice for histological studies. F.J., J.T. J.L. and C.D. provided constructive criticisms for manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

Ahlemeyer, B., Halupczok, S., Rodenberg-Frank, E., Valerius, K.-P., and Baumgart-Vogt, E. (2018). Endogenous Murine Amyloid-β Peptide Assembles into Aggregates in the Aged C57BL/6J Mouse Suggesting These Animals as a Model to Study Pathogenesis of Amyloid-β Plaque Formation. J. Alzheimers Dis. JAD *61*, 1425–1450.

ANSES (2010). Recommandations et perspectives pour une surveillance nationale de la contamination de l'air par les pesticides. Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides (ORP). Rapport scientifique.

ANSES (2011). Second French Total Diet Study (TDS2). Report 2. Pesticide residues, additives, acrylamide and polycyclic aromatic hydrocarbons.

ANSES (2013). Évaluation des risques liés aux résidus de pesticides dans l'eau de distribution. Contribution à l'exposition alimentaire totale. Rapport d'étude scientifique.

Arango-Lievano, M., Giannoni, P., Claeysen, S., Marchi, N., and Jeanneteau, F. (2016). Longitudinal In Vivo Imaging of the Cerebrovasculature: Relevance to CNS Diseases. J. Vis. Exp. JoVE.

Bermúdez-Couso, A., Arias-Estévez, M., Nóvoa-Muñoz, J.C., López-Periago, E., Soto-González, B., and Simal-Gándara, J. (2007). Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards. Water Res. *41*, 4515–4525.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. *55*, 611–622.

Chami, L., and Checler, F. (2012). BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and β-amyloid production in Alzheimer's disease. Mol. Neurodegener. *7*, 52.

Chen, L., Yoo, S.-E., Na, R., Liu, Y., and Ran, Q. (2012). Cognitive impairment and increased Aβ levels induced by paraquat exposure are attenuated by enhanced removal of mitochondrial H(2)O(2). Neurobiol. Aging *33*, 432.e15-26.

Chin-Chan, M., Segovia, J., Quintanar, L., Arcos-López, T., Hersh, L.B., Chow, K.M., Rodgers, D.W., and Quintanilla-Vega, B. (2015). Mercury Reduces the Enzymatic Activity of Neprilysin in Differentiated SH-SY5Y Cells. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. *145*, 128–137.

Désert, M., Ravier, S., Gille, G., Quinapallo, A., Armengaud, A., Pochet, G., Savelli, J.-L., Wortham, H., and Quivet, E. (2018). Spatial and temporal distribution of current-use pesticides in ambient air of Provence-Alpes-Côte-d'Azur Region and Corsica, France. Atmos. Environ. *192*, 241–256.

EFSA (2018). The 2016 European Union report on pesticide residues in food. EFSA J. *16*, 5348.

Eng, L.F., Yu, A.C., and Lee, Y.L. (1992). Astrocytic response to injury. Prog. Brain Res. *94*, 353–365.

Esteve-Turrillas, F.A., Agulló, C., Abad-Fuentes, A., Abad-Somovilla, A., and Mercader, J.V. (2012). Immunoreagent generation and competitive assay development for cyprodinil analysis. J. Agric. Food Chem. *60*, 4803–4811.

Esteve-Turrillas, F.A., Mercader, J.V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., and Abad-Fuentes, A. (2013). Mepanipyrim haptens and antibodies with nanomolar affinity. The Analyst *138*, 3360–3364.

FAO reports Pyrimethanil (226). First draft was prepared by Mr Stephen Funk, Health Effects Division, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.

Fathabadi, B., Dehghanifiroozabadi, M., Aaseth, J., Sharifzadeh, G., Nakhaee, S., Rajabpour-Sanati, A., Amirabadizadeh, A., and Mehrpour, O. (2018). Comparison of Blood Lead Levels in Patients With Alzheimer's Disease and Healthy People. Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen. 1533317518794032.

Générations Futures (2013). Enquête EXPPERT II : des pesticides interdits et des perturbateurs endocriniens (PE) dans des fraises.

Générations Futures (2016). Enquête EXPPERT 7 : des pesticides perturbateurs endocriniens dans des mueslis.

Giannoni, P., Arango-Lievano, M., Neves, I.D., Rousset, M.-C., Baranger, K., Rivera, S., Jeanneteau, F., Claeysen, S., and Marchi, N. (2016). Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. Neurobiol. Dis. *88*, 107–117.

Hayden, K.M., Norton, M.C., Darcey, D., Ostbye, T., Zandi, P.P., Breitner, J.C.S., Welsh-Bohmer, K.A., and Cache County Study Investigators (2010). Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. Neurology *74*, 1524–1530.

Herrero-Hernández, E., Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M.J., Andrades, M.S., and Rodríguez-Cruz, M.S. (2016). Intra-annual trends of fungicide residues in waters from vineyard areas in La Rioja region of northern Spain. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. *23*, 22924–22936.

Huang, H., Bihaqi, S.W., Cui, L., and Zawia, N.H. (2011). In vitro Pb exposure disturbs the balance between Aβ production and elimination: the role of AβPP and neprilysin. Neurotoxicology *32*, 300–306.

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., and Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. Brain Res. Mol. Brain Res. *57*, 1–9.

Kim, D.-K., Park, J.-D., and Choi, B.-S. (2014). Mercury-induced amyloid-beta (Aβ) accumulation in the brain is mediated by disruption of Aβ transport. J. Toxicol. Sci. *39*, 625–635.

Kimbrough, I.F., Robel, S., Roberson, E.D., and Sontheimer, H. (2015). Vascular amyloidosis impairs the gliovascular unit in a mouse model of Alzheimer's disease. Brain J. Neurol. *138*, 3716–3733.

Lafon, P.-A., Imberdis, T., Wang, Y., Torrent, J., Robitzer, M., Huetter, E., Alvarez-Martinez, M.-T., Chevallier, N., Givalois, L., Desrumaux, C., et al. (2018). Low doses of bioherbicide favour prion aggregation and propagation in vivo. Sci. Rep. *8*.

Lukowicz, C., Ellero-Simatos, S., Régnier, M., Polizzi, A., Lasserre, F., Montagner, A., Lippi, Y., Jamin, E.L., Martin, J.-F., Naylies, C., et al. (2018). Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. Environ. Health Perspect. *126*, 067007.

Mercader, J.V., Esteve-Turrillas, F.A., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., and Abad-Fuentes, A. (2012). Antibody generation and immunoassay development in diverse formats for pyrimethanil specific and sensitive analysis. The Analyst *137*, 5672–5679.

Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 4050–4058.

Mura, T., Dartigues, J.-F., and Berr, C. (2010). How many dementia cases in France and Europe? Alternative projections and scenarios 2010-2050. Eur. J. Neurol. *17*, 252–259.

Nasri, A., Valverde, A.J., Roche, D.B., Desrumaux, C., Clair, P., Beyrem, H., Chaloin, L., Ghysen, A., and Perrier, V. (2016). Neurotoxicity of a Biopesticide Analog on Zebrafish Larvae at Nanomolar Concentrations. Int. J. Mol. Sci. *17*.

Padurariu, M., Ciobica, A., Mavroudis, I., Fotiou, D., and Baloyannis, S. (2012). Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. Psychiatr. Danub. *24*, 152–158.

PAN Europe (2008). Etude vin de PAN-Europe / MDRGF. Etude sur la présence de résidus de pesticides dans le vin.

Portelius, E., Durieu, E., Bodin, M., Cam, M., Pannee, J., Leuxe, C., Mabondzo, A., Oumata, N., Galons, H., Lee, J.Y., et al. (2016). Specific Triazine Herbicides Induce Amyloid-β42 Production. J. Alzheimers Dis. JAD *54*, 1593–1605.

Rial-Otero, R., González-Rodríguez, R.M., Cancho-Grande, B., and Simal-Gándara, J. (2004). Parameters affecting extraction of selected fungicides from vineyard soils. J. Agric. Food Chem. *52*, 7227–7234.

Richardson, J.R., Roy, A., Shalat, S.L., von Stein, R.T., Hossain, M.M., Buckley, B., Gearing, M., Levey, A.I., and German, D.C. (2014). Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. JAMA Neurol. *71*, 284–290.

Salazar, J.G., Ribes, D., Cabré, M., Domingo, J.L., Sanchez-Santed, F., and Colomina, M.T. (2011). Amyloid β peptide levels increase in brain of AβPP Swedish mice after exposure to chlorpyrifos. Curr. Alzheimer Res. *8*, 732–740.

Serra-Batiste, M., Ninot-Pedrosa, M., Bayoumi, M., Gairí, M., Maglia, G., and Carulla, N. (2016). Aβ42 assembles into specific β-barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 10866–10871.

Serrano-Pozo, A., Mielke, M.L., Gómez-Isla, T., Betensky, R.A., Growdon, J.H., Frosch, M.P., and Hyman, B.T. (2011). Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. *179*, 1373–1384.

Shi, J., Perry, G., Smith, M.A., and Friedland, R.P. (2000). Vascular abnormalities: the insidious pathogenesis of Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *21*, 357–361.

Watson, M.B., Richter, F., Lee, S.K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., Effros, R.B., and Chesselet, M.-F. (2012). Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. Exp. Neurol. *237*, 318–334.

Wright, A.L., Zinn, R., Hohensinn, B., Konen, L.M., Beynon, S.B., Tan, R.P., Clark, I.A., Abdipranoto, A., and Vissel, B. (2013). Neuroinflammation and neuronal loss precede Aβ plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. PloS One *8*, e59586.

Xu, L., Zhang, W., Liu, X., Zhang, C., Wang, P., and Zhao, X. (2018). Circulatory Levels of Toxic Metals (Aluminum, Cadmium, Mercury, Lead) in Patients with Alzheimer's Disease: A Quantitative Meta-Analysis and Systematic Review. J. Alzheimers Dis. JAD *62*, 361–372.

Yoon, S.-S., and Jo, S.A. (2012). Mechanisms of Amyloid-β Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. Biomol. Ther. *20*, 245–255.

FIGURE LEGENDS

Table 1. Examples of occurrences of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil residues in the European diet and environment.

[(a)] Maximal measured concentrations (Cmax) in the samples analyzed

[(b)] Occurrences provided by the study were calculated for food samples where the pesticide concentration is above the limit of quantification (LOQ) (> 0.1 µg/kg) and "discarded" samples where the pesticides had been detected (limit of detection: 0.03 µg/kg) with a concentration below the LOQ (< 0.1 µg/kg).

[(c)] Occurrences given in this report were calculated based on the national mean of detection for the cypro (detected 7 times over 30 260 analysis), mepa (0 / 702) and pyri (1 / 22 809).

Figure 1. Co-localization of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil with Aβ aggregates on J20 brain tissue sections. A. Brain tissue sections from 10 months old J20 mice were incubated with 2 mM of either cyprodinil (**A2**), mepanipyrim (**A3**), pyrimethanil (**A4**), a cocktail of the three fungicides (**A5-6**), or with an equivalent volume of DMSO (1%) as control (**A1**), for 90min at RT. Sections were labeled with an anti-β-amyloid 1-16 conjugated to AlexaFluor 488 and antibodies anti-cyprodinil, anti-mepanipyrim or anti-pyrimethanil. Aβ aggregates are seen in the green channel and the different pesticides in the red channel. No red fluorescence was observed in the control condition. The "Merge" column shows images of co-localization of the pesticides with the amyloid aggregates, and higher enlargement are presented in panel **A6** for the cocktail. For each condition, 3 to 6 sections containing hippocampus were analyzed and independent experiments were performed at least 3-6 times.

Images selected are representative of the labeling observed in tissue sections. Scale bars: 100 µm (**A1-5**) and 50 µm (**A6**). **B.** Effect of anilinopyrimidines on the kinetics of Aβ aggregation. $A\beta_{1-42}$ monomers (30 µM) were incubated either with a cocktail of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil, (750 µM each) (red), or with an equivalent

volume of DMSO (1%) (black) with a ratio 1:15. For each condition, independent experiments were performed 3-4 times in duplicates, as illustrated in the figure. ThT fluorescence intensity was measured once a day (a.u., arbitrary units). The different values obtained were plotted following a sigmoidal fit.

Figure 2. Nine months treatment of J20 mice with 0.1 µg/L of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil enhances β-amyloid deposits in brain. A. Representative images of amyloid plaques stained with Thioflavin T (ThT, in green) in the hippocampus and in the cortex sections of J20 mice treated or not with the cocktail of pesticides (T n=7; NT n=8), as well as their wild-type littermates (NT, n=4; T n=4). Dashed white squares are enlargement of representative aggregates in the tissue sections. Scale bar: 100 µm. **B-E.** Quantifications of the number (**B, D**) and the surface (**C, E**) of aggregates in WT (NT and T) and J20 (NT and T) mice, were normalized by the total surface of hippocampus or cortex analyzed. Aggregates were quantified using Fiji software. Number of aggregates are expressed as mean ± SEM / cm^2 and their surface as mean ± SEM x1000 (without units). Statistical differences were calculated using a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis. **F-G**. The number (**F**) and surface (**G**) of aggregates in the hippocampus were quantified in its different areas: dentate gyrus (DG), CA1, CA2 and CA3 for the J20 mice. For all immunohistochemistry analyses, 8 to 10 brain tissue sections per animal were used. Values are expressed as mean ± SEM and statistical differences were calculated using a multiple T-test. **H**. Soluble forms of human $A\beta_{1-42}$ in WT and J20 mice treated or not with the fungicides were quantified by ELISA. Results were normalized by protein concentration and are expressed as mean ± SEM (pg of $A\beta_{1-42}$/mg of proteins). Statistical differences were obtained using a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis. For all statistical tests a probability of 0.05 was defined as a significant difference (* *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001).

Figure 3. Treatment with fungicides cocktail triggers astrocyte inflammation in J20 mice. **A**. Representative images of brain tissue sections labeled with anti-GFAP antibody to visualize astrocytes. Brain tissue sections from WT and J20 mice, either treated (n=7) or not with pesticides (n=7), were used to quantify the intensity (astrogliosis) and the surface of the GFAP labeling (hypertrophy). Data were normalized by the total number of cells. These parameters were quantified, on 8 to 10 hippocampus per animal for the DG (**B**), the CA1 (**C**), the CA2 (**D**) and the CA3 areas (**E**). Values are expressed as mean ± SEM and a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis were used to evaluate statistical differences (α = 0.05, * *p*-value < 0.05). Scale bar: 100 µm.

Figure 4. Nine months treatment with the cocktail of anilinopyrimidines at 0.1 µg/L exacerbate microglial inflammation in J20 mice. **A.** Representative images of tissue sections from WT and J20 mice, labeled with an anti-IBA1 antibody, in the different regions of the hippocampus (DG, CA1, CA2 and CA3). Animals were treated with a cocktail of anilinopyrimidine pesticides (T) or not (NT) as described in Figure 3. Scale bar: 100 µm. The number of total and activated microglial cells per mm^2 were quantified for the DG (**B**), CA1 (**C**), CA2 (**D**) and CA3 regions (**E**). For all immunohistochemistry analyses, 8 to 10 brain tissue sections per animal were used. Values are expressed as mean ± SEM and statistical differences were measured using a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis (α = 0.05, * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001).

Figure 5. IL1β and IL6 interleukin levels are increased consecutive to chronic exposure to fungicides. IL1β (**A**), IL6 (**B**) and TNFα (**C**) levels were measured in brain homogenates of WT and J20 mice treated or not with the cocktail of pesticides for 9 months. Their levels were assayed using HTRF kits and were normalized by their protein concentration (BCA). Three to four different brains were analyzed in triplicate for each

group. Results are presented as mean ± SEM (pg/mg of proteins) and statistical differences were calculated using a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis (α = 0.05, * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01).

Figure 6. Treatment with 0.1 µg/L of anilinopyrimidines triggers a dual effect in hippocampal neurons. A. Representative images of hippocampal neurons stained with a 0.4% cresyl violet solution. Transgenic J20 mice non-treated (NT n=4) or treated (T, n=4) with pesticides were used for the analysis. WT animals, non-treated (NT n=3) or treated (T, n=3) with pesticides were analyzed as controls. Scale bar: 100 µm. The total number of hippocampical neurons per mm^2 was quantified for the DG (**B**), CA1 (**C**), CA2 (**D**) and CA3 areas (**E**). Values are expressed as mean ± SEM and statistical differences were calculated using a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis with a probability of 0.05 defined as a significant difference (* *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001).

Figure 7. Fungicide treatment increases cerebral amyloid angiopathy on the superficial cortex of J20 mice. A. 2-Photon representative images taken at 3, 6 and 9 months, of the same brain area of a J20 non-treated mouse. Mice were injected with methoxy-XO4 (artificially colored in red) to stain amyloid aggregates, and dextran-FITC (green) to stain blood vessels (n=4). Yellow arrows show the progression of vascular aggregates and red arrows illustrate parenchymal aggregates. Scale bar: 50 µm. **B**. 2-Photon representative images taken at 3, 6 and 9 months of the same brain area of a J20 treated mouse. Animals were injected with methoxy-XO4 and dextran-FITC (n=5). Yellow arrows show vascular aggregates; white arrows show fusion of vascular aggregates overtime and red arrows present parenchymal aggregates. Scale bar: 50 µm. The total number of aggregates (**C**), as well as parenchymal (**D**) and vascular aggregates (**E**), were quatified using Fiji software. Values are presented as mean ± SEM and a two-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis was used for the

statistical analysis (α = 0.05, * *p*-value < 0.05). **F**. Correlations between the number of vascular and parenchymal aggregates over time for J20 NT (y = 0.43x + 0.15; *p*-value < 0.001) and T (y = 1.44x + 0.15; *p*-value < 0.001) mice. Statistical significance was measured using a linear regression and Pearson's correlation coefficient (r).

Figure 8. Treatment with pesticides increases the volume of cerebral vascular aggregates of J20 mice. A. Representative 3D reconstructed images of J20 NT (n=4) and T (n=5) mice at 9 months. Scale bar: 40 µm. **B**. Example of a leptomeningeal vessel (in green) with vascular and parenchymal aggregates (in red). Scale bar: 40 µm. The total volume of aggregates (**C**), as well as the parenchymal (**D**) and the vascular ones (**E**) were quantified using Imaris 5.0 software. Results were normalized by the total volume of the stack and were multiplied by 10^5 to avoid decimal numbers. Quantifications were performed at 3, 6 and 9 months of treatment and values are presented as mean ± SEM (without unit). For statistical analysis a two-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis was used (α = 0.05, * *p*-value < 0.05). **F**. Correlations between the volume of vascular and parenchymal aggregates overtime for J20 NT (y = 0.126x - 0.3143; *p*-value < 0.001) and T (y = 0.0544x + 49.74; *p*-value = 0,95) mice. Statistical significance was measured using a linear regression and Pearson's correlation coefficient (r).

Figure 9. BACE1 and NEP expression are deregulated upon pesticide treatment in J20 mice. Left panel: Relative gene expression for the endogenous mouse *App* (**A1**), human *App* (**B1**), *Bace1* (**C1**), *Ide* (**D1**), *Nep* (**E1**) and *Lrp1* (**F1**) in J20 and WT animals treated or not with the fungicide cocktail (J20: NT n=4, T n=4; WT NT n=3, T n=3). Relative transcript abundance was quantified by RT-qPCR, and expression was normalized using *β-actin* as the reference gene. Results are expressed as fold changes (log2) in mRNA abundance as compared to control values, as determined using the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method. Each experiment in triplicates was performed 3 times independently. Results are

expressed as mean ± SEM and were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc* analysis (α = 0.05). Middle and right panels: protein expression of mAPP (**A2**), hAPP (**B2**), BACE1 (**C2**), IDE (**D2**), NEP (**E2**) and LRP1 (**F2**) was measured on brain homogenates from the same mice used above by immunoblots. Protein loading controls were performed using β-actin. Membranes were revealed with a ChemiDoc MP Imager and signals were quantified on the Image Lab software. Results were normalized using β-actin signal and are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using Student T-test (α = 0.05, * *p*-value < 0.05).

Supplementary Figure 1. Co-localization of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil with Aβ aggregates on J20 brain tissue sections. Complementary images corresponding to several control conditions (**A-H**). Brain tissue sections from 10 months old J20 mice were labeled with the 6E10 antibody conjugated to Alexa 488, to detect Aβ aggregates. Control tissue sections were done without DMSO (rows A-F) or pesticide's incubation (rows A-H). Sections were exposed either to 6E10 antibody (**A**), or only with the secondary antibody Cy3 (**B**), or anti-cyprodinil (**C**), or anti-mepanipyrim (**D**), or anti-pyrimethanil (**E**), or with a cocktail of the three anti-anilinopyrimidine antibodies (**F**). Control tissue sections were incubated with 1% DMSO (**G-H**) and also with either Cy3 (**G**) or anti-anilinopyrimidines antibodies (H). All control sections did not exhibit any labeling in the red channel. Scale bar: 100 µm.

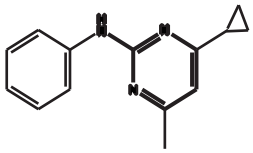
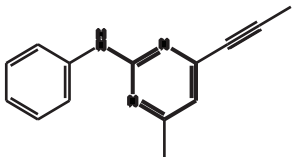
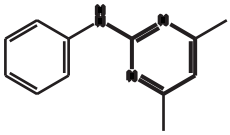
Supplementary Figure 2. Congo red analysis of the number and surface of amyloid plaques in the hippocampus and the cortex of mice after 9 months of fungicide treatment. **A.** Representative images of amyloid aggregates in the hippocampus stained with congo red and counterstained with 0.4% of a cresyl violet solution. Tissue sections of J20 mice treated or not with the cocktail of pesticides (T n=7; NT n=8), as well as their wild-type littermates (NT, n=4; T n=4) were used for analysis of amyloid aggregates. Quantification of the number (**B**) and the surface (**C**) of

hippocampal aggregates were performed and normalized by the total surface of hippocampus analyzed. Five to eight sections per animal were used. **D.** Representative images of amyloid aggregates in the cortex of the same animals described in A-C. Quantification of aggregates by number (**E**) and surface (**F**) were performed and normalized by the total surface of cortex analyzed. Five to ten sections per animal were used. All values are expressed as mean ± SEM. Statistical differences were calculated using a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc analysis* with a probability of 0.05 defined as a significant difference (* *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01). Scale bar: 500 µm.

Supplementary Figure 3. WT mice treated with cocktail of anilinopyrimidines exhibit astrocyte proliferation in the CA2 area of the hippocampus. Quantification of the number of astrocytes in the different regions of the hippocampus: DG (**A**), CA1 (**B**), CA2 (**C**) and CA3 (**D**) for WT and J20 mice treated (T) or not (NT) with 0.1 µg/L of fungicides. Three to four animals per group, as well as 8-10 sections per animal were analyzed. Results are expressed as mean ± SEM cells/mm^2 and a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's *post-hoc analysis* was used for the statistical tests (α = 0.05, * *p*-value < 0.05).

Supplementary Figure 4. Number of hippocampal neurons in WT mice treated or not with pesticides.

Table 1. Examples of occurrences of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil residues in the European diet and environment.

Elements analyzed	Cyprodinil 	Mepanipyrim 	Pyrimethanil 	References
Fruits	37.3% (n=75) [(a)] Cmax: 90 µg/kg	6.7% (n=75) Cmax: 40 µg/kg	17.3% (n=75) Cmax: 320 µg/kg	(ANSES, 2011)
Vegetables	18.7% (n=267) Cmax: 480 µg/kg	No data	12.7 % (n=267) Cmax: 180 µg/kg	(ANSES, 2011)
Strawberries	29.5% (n=61) Cmax: 1.6 mg/kg	1.6% (n=61) Cmax: < LOQ	0% (n=61)	(Générations futures, 2013)
Breakfast cereals	73.33% (n=15) Cmax: 36 µg/kg	No data	100% (n=15) Cmax: 140 µg/kg	Générations Futures, 2016a)
European food products	5.27% (n=70 559) [(b)]	0.28% (n=66 824) [(b)]	4.12% (n=70 834) [(b)]	(EFSA, 2018)
Water (France)	≈ 0% (n=30 360) [(c)] Cmax: 0.15 µg/L	0% (n=702) [(c)]	≈ 0% (n=22809) [(c)] Cmax: 0.07 µg/L	(ANSES, 2013)
Water (La Rioja, Spain)	Cmax: 0.981 µg/L	No data	Cmax: 0.59 µg/L	(Herrero-Hernàndez et al., 2016)
Austrian wine	71.4%(n=7) Cmax: 15 µg/kg	No data	85.7% (n=7) Cmax: 48 µg/kg	(PAN-Europe 2008)
French wine	50% (n=10) Cmax: 6.8 µg/L	No data	90% (n=10) Cmax: 233.8 µg/L	(PAN-Europe 2008)
German wine	18.2% (n=11) Cmax: 10 µg/kg	No data	63.6% (n=11) Cmax: 190 µg/kg	(PAN-Europe 2008)
Dust	86.4% (n=22) Cmax: 372.3 ng/g	9.1% (n=22) Cmax: < LOQ	68.2% (n=22) Cmax: 21.4 ng/g	(Générations Futures, 2016b)
Hair	14.3% (n=7) Cmax: < LOQ	No data	57.1% (n=7) Cmax: < LOQ	(Générations Futures, 2017)
Atmosphere	25% (n=1515) Cmax: 35.9 ng/m^3	No data	No data	(ANSES 2010b)

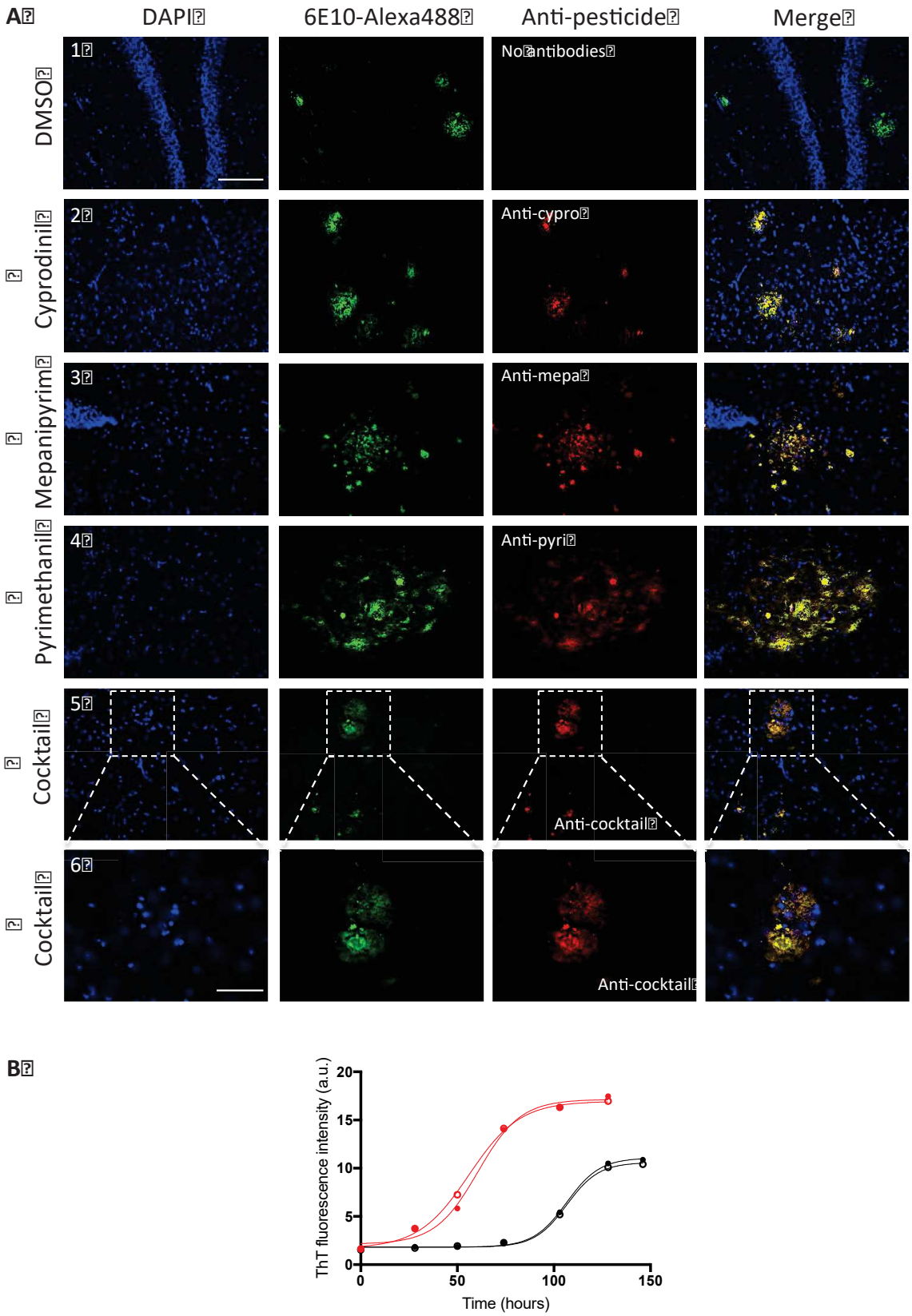


Figure 1. Co-localization of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil with Aβ aggregates on 20 brain tissue sections.

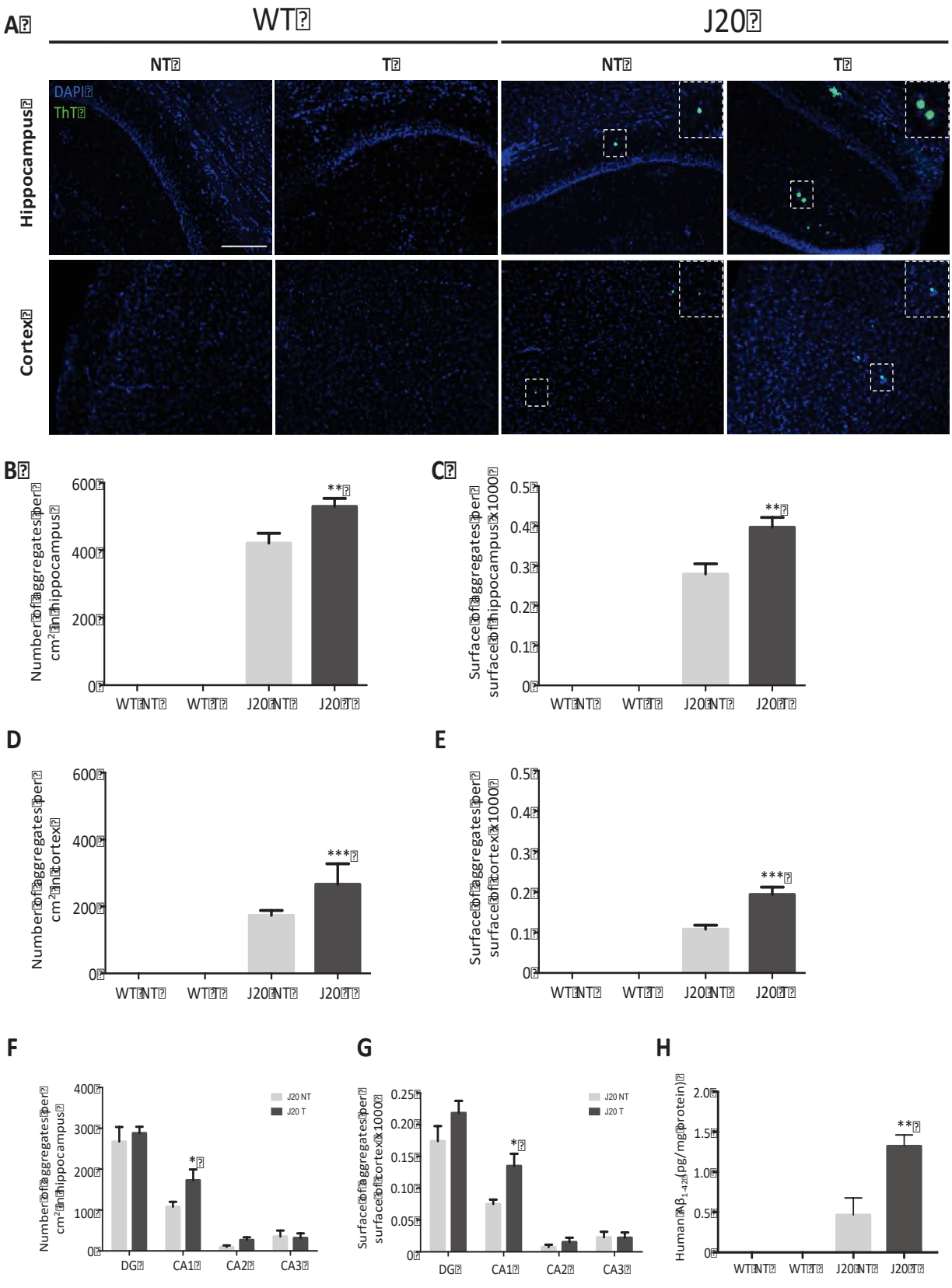


Figure 2. Nine months treatment of J20 mice with 0.1 µg/L of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil enhances amyloid deposits in brain

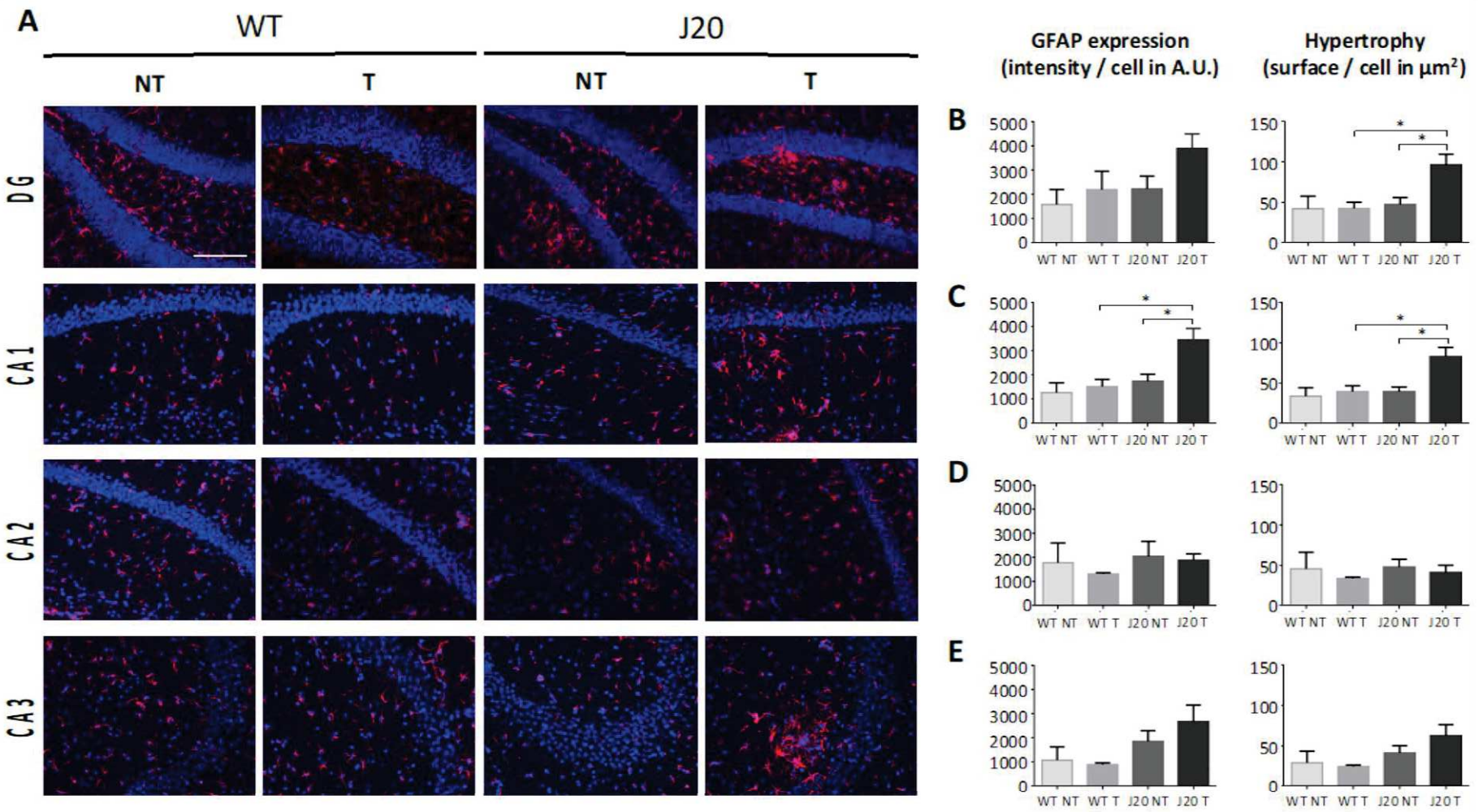


Figure 3. Treatment with fungicides cocktail triggers astrocyte inflammation in J20 mice.

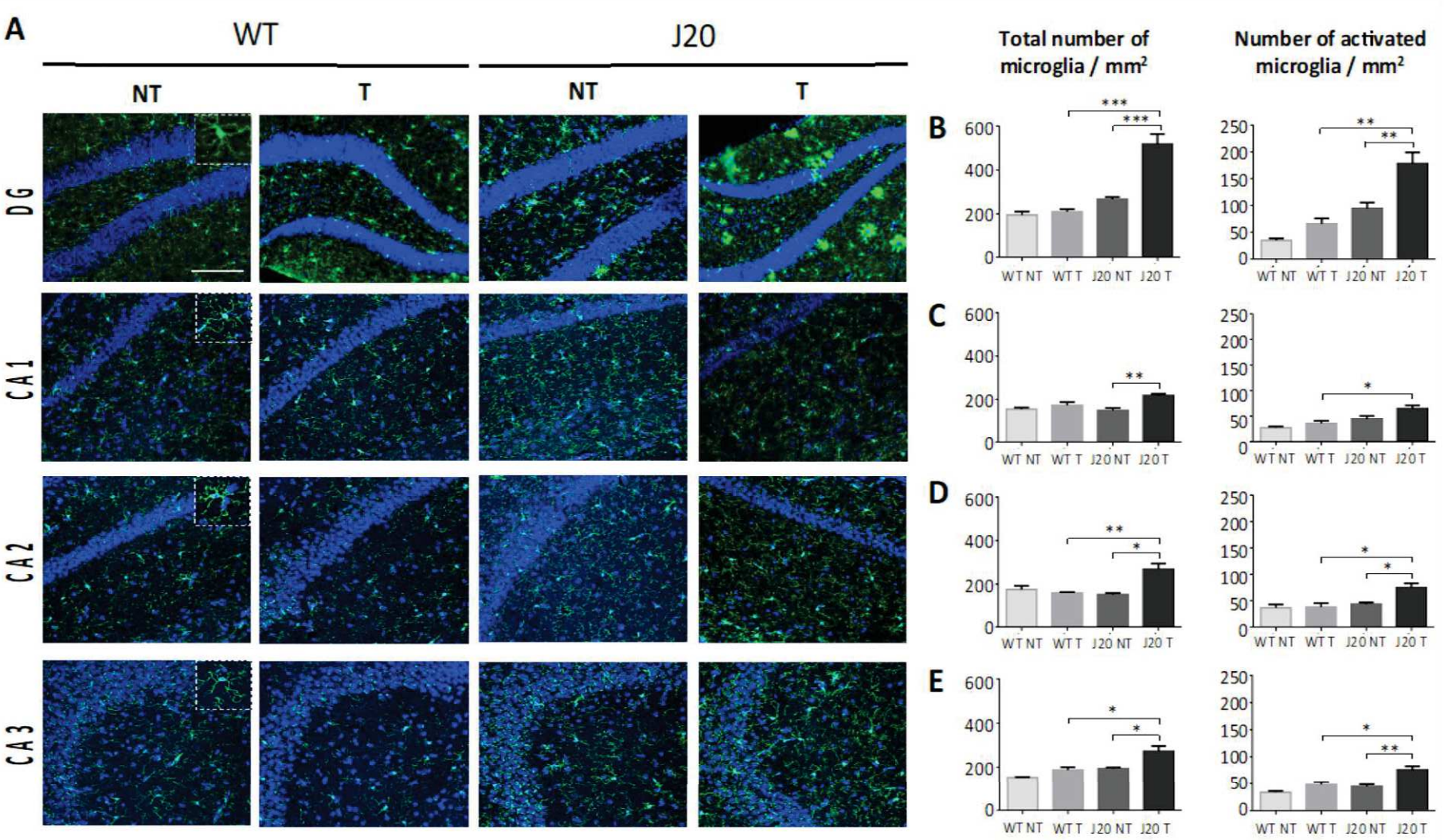


Figure 4. Nine months treatment with the cocktail of anilinopyrimidines at 0.1 µg/L exacerbate microglial inflammation in J20 mice.

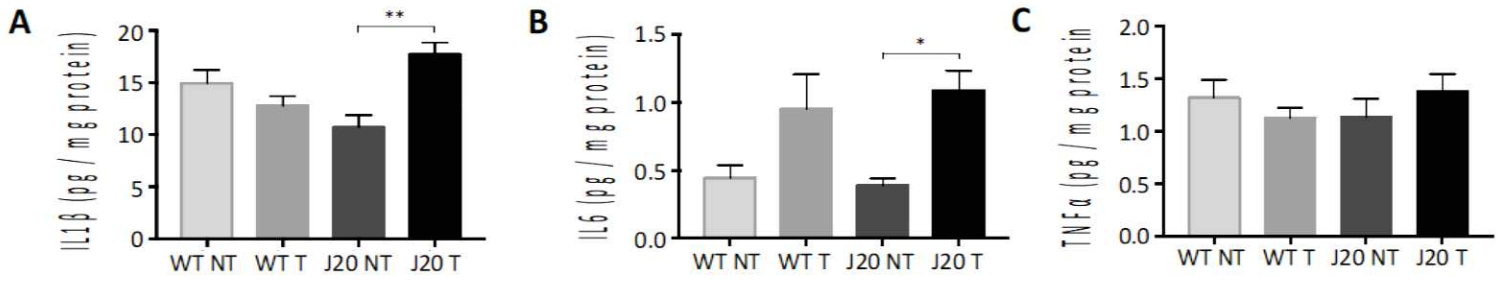


Figure 5. IL1β and IL6 interleukin levels are increased consecutive to chronic exposure to fungicides.

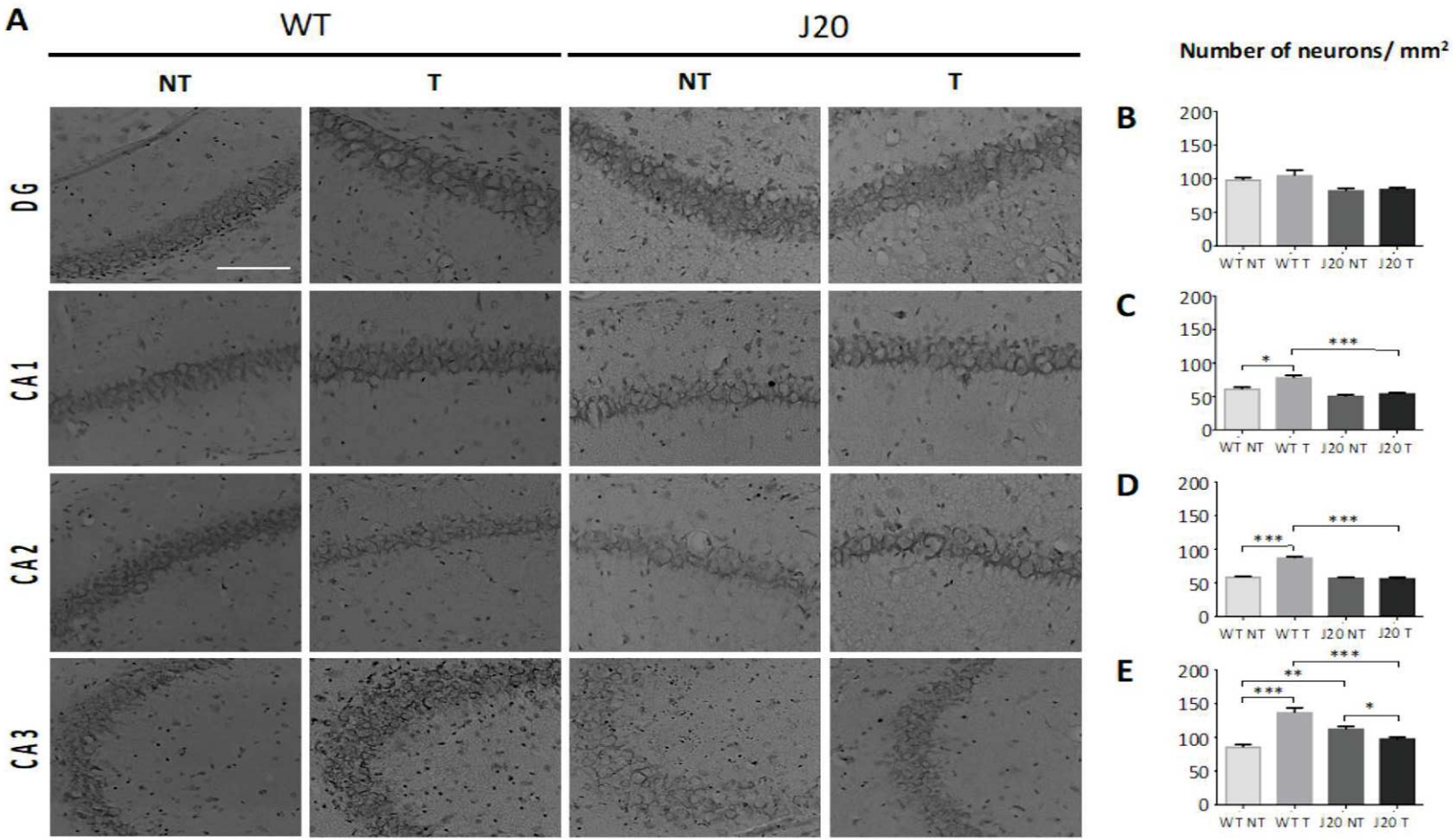


Figure 6. Treatment with 0.1 µg/L of anilinopyrimidines triggers a dual effect in hippocampal neurons.

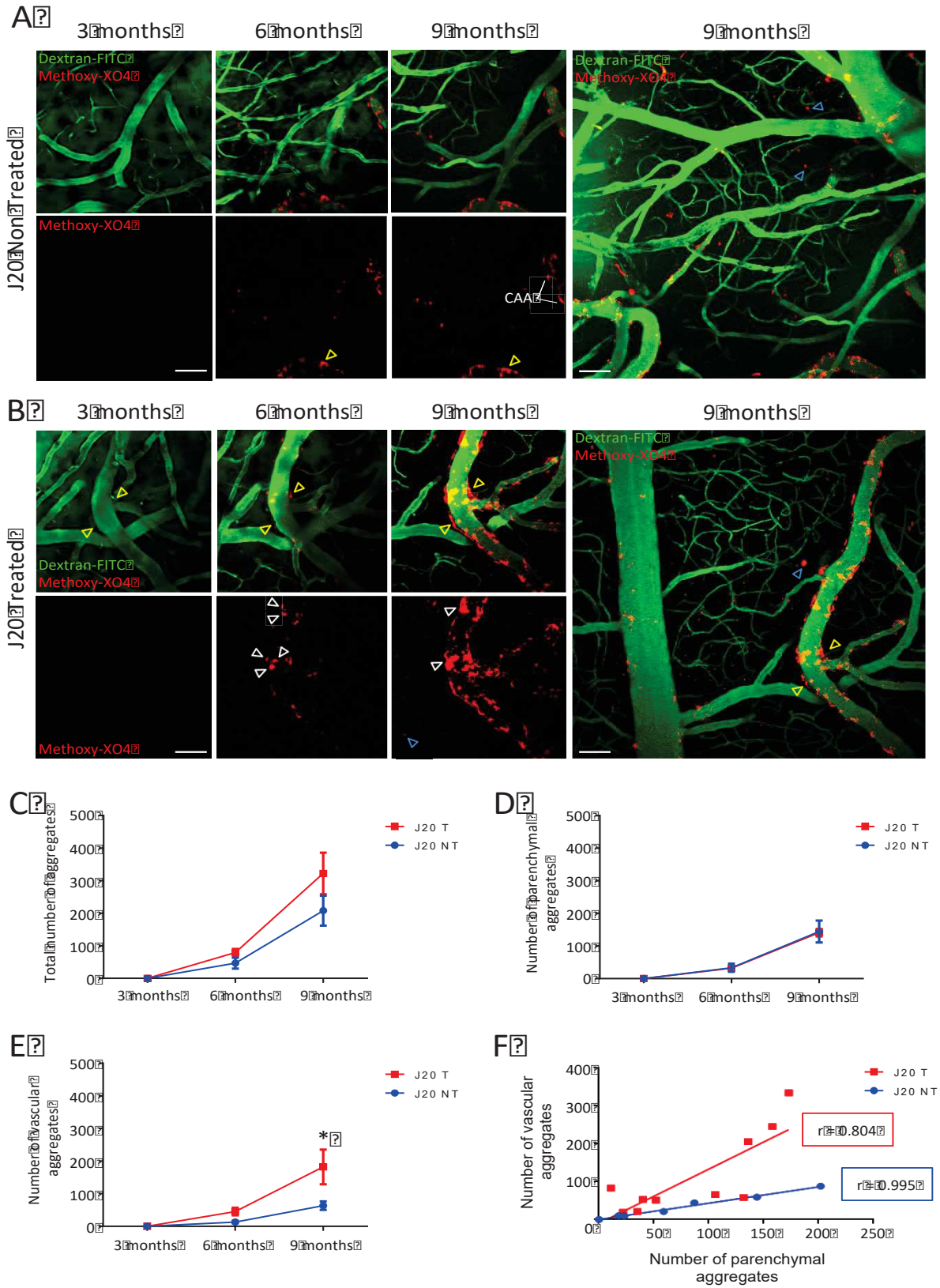


Figure 7. Fungicide treatment increases cerebral amyloid angiopathy on the superficial cortex of J20 mice.

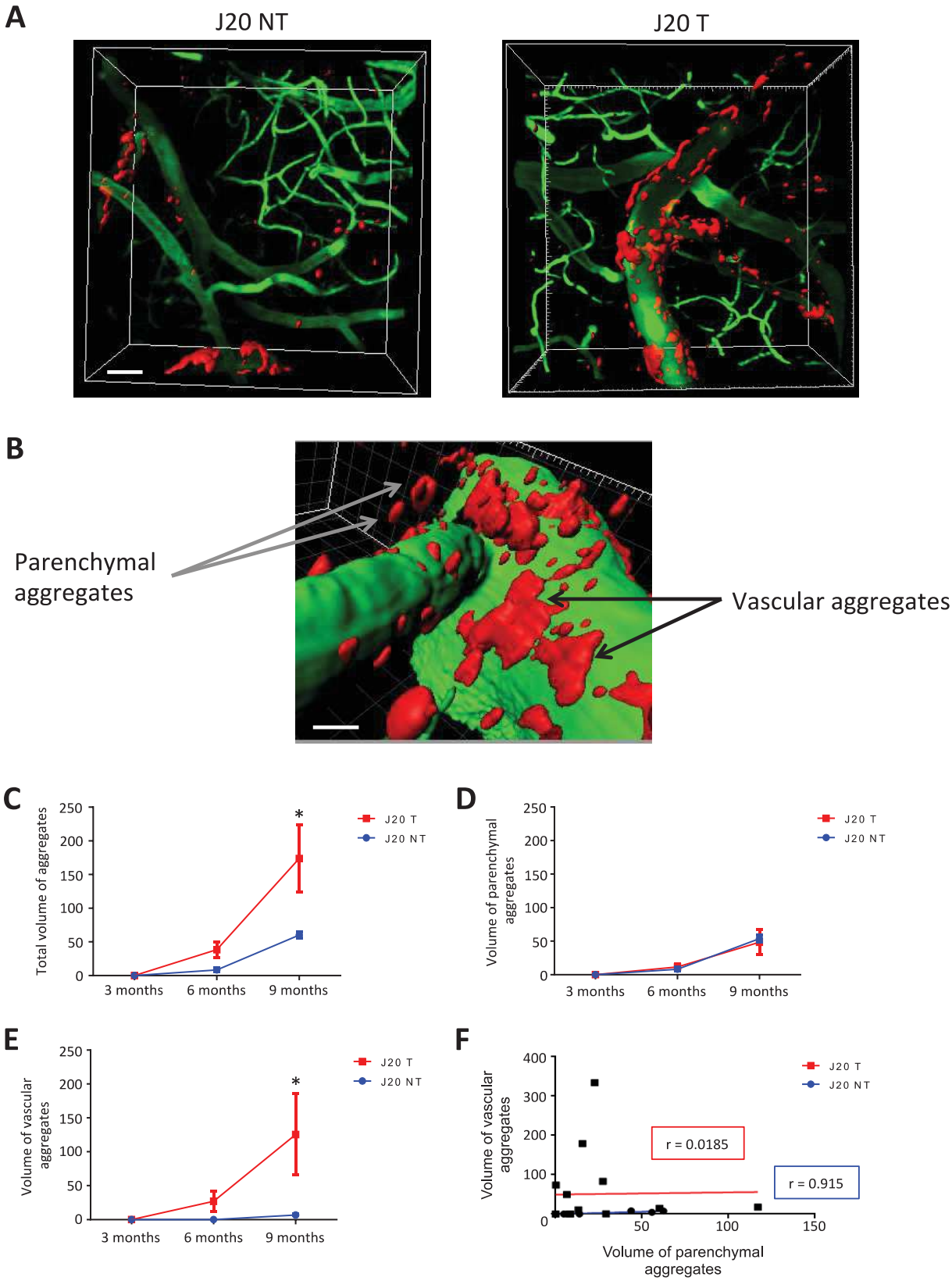


Figure 8. Treatment with pesticides increases the volume of cerebral vascular aggregates of J20 mice.

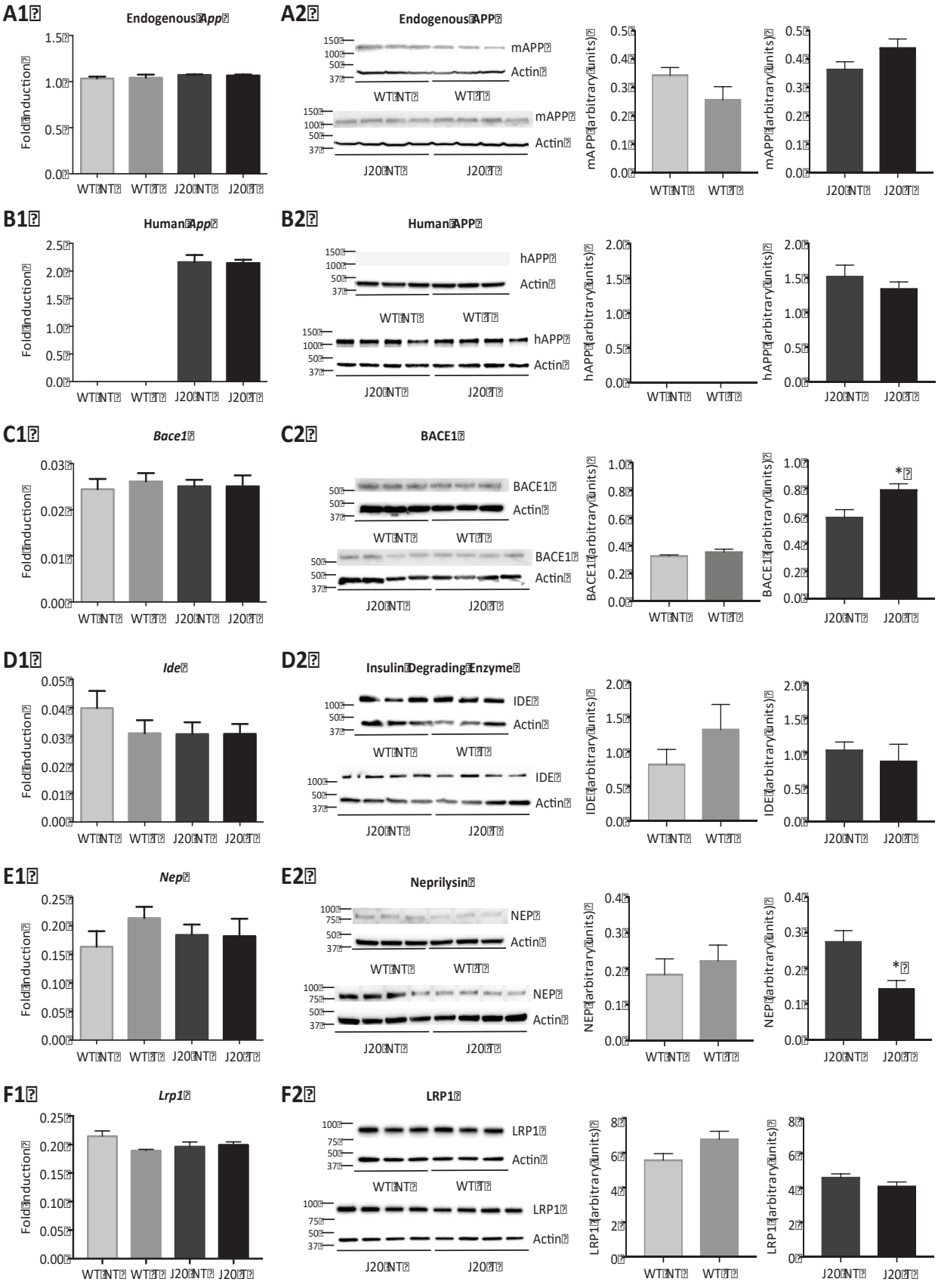
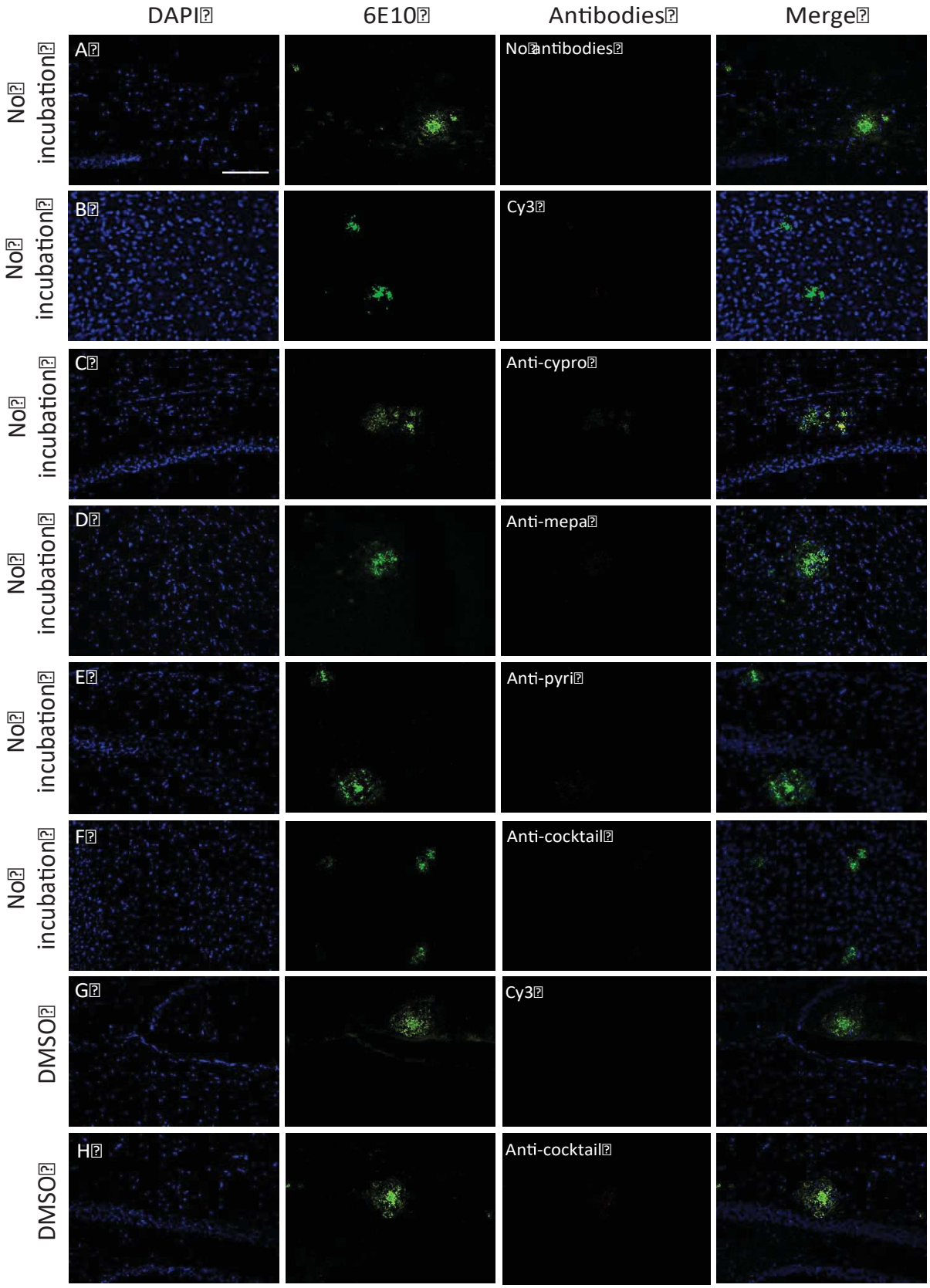
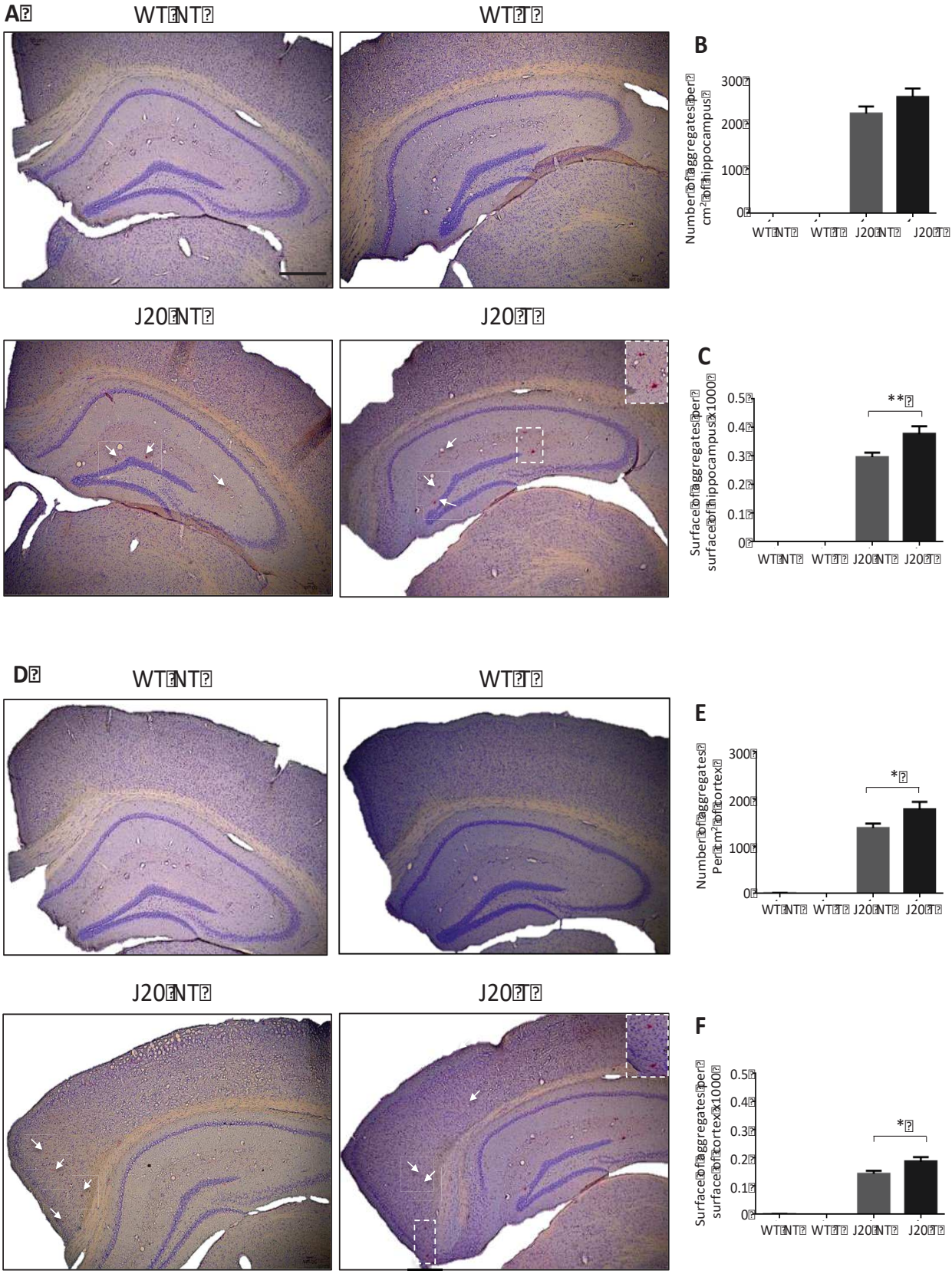


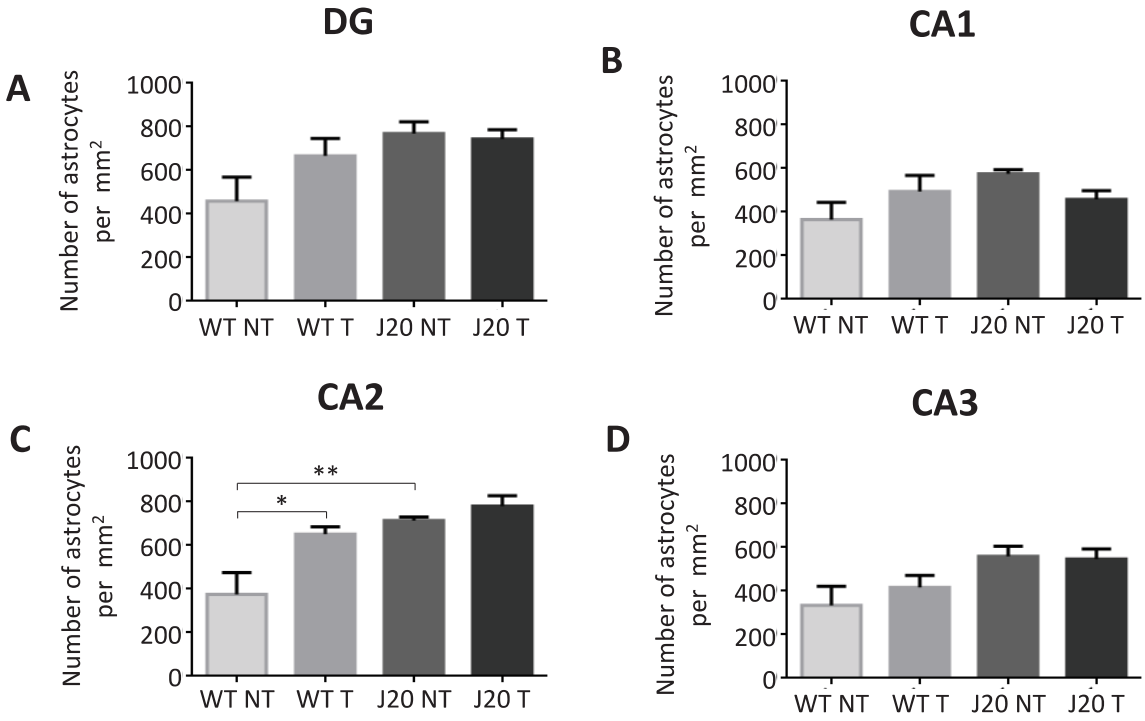
Figure 9. Treatment with a cocktail of fungicides increases BACE1 and decreases NEP expression in J20 mice.



Sup. Fig. 1. Co-localization of cyprodinil, mepanipyrim and pyrimethanil with Aβ aggregates on 120 brain tissue sections.



Sup. Fig. 2. Congo red analysis of the number and surface of amyloid plaques in the hippocampus and the cortex of mice after 9 months of fungicide treatment.



Sup. Fig. 3. WT mice treated with a cocktail of anilinopyrimidines exhibit astrocyte proliferation in the CA2 area of the hippocampus

Regions of hippocampus	Mean ± SEM (neurons / mm²)		One-way ANOVA	HS *post-hoc* analysis
	WT NT	WT T		
DG	98.33 ± 3.67	104.80 ± 8.25	$F(3,15) = 4.90$ $p = 0.014$	$p = 0.6817$
CA1	61.25 ± 3.36	78.47 ± 3.69	$F(3,15) = 13.33$ $p < 0.001$	$p = 0.0251$
CA2	58.75 ± 1.53	87.17 ± 2.46	$F(3,15) = 29.93$ $p < 0.001$	$p < 0.001$
CA3	85.83 ± 4.17	136.81 ± 7.72	$F(3,15) = 15.64$ $p < 0.001$	$p < 0.001$

Sup. Fig. 4. Number of hippocampal neurons in WT mice treated or not with pesticides.

Discussion et perspectives

Depuis la seconde guerre mondiale, l'utilisation massive des produits phytosanitaires s'est inscrite comme une pratique routinière dans le domaine de l'agriculture afin de garantir l'autosuffisance alimentaire des pays occidentaux. Alors que l'objectif fût atteint en 2 décennies, l'ancrage du modèle capitaliste a conduit à une société de consommation exerçant une pression permanente sur le secteur agricole pour garantir l'abondance des fruits et des légumes en toutes saisons. L'utilisation de molécules d'origine synthétique avec des temps de demi-vie longs a conduit à la pollution de notre environnement (eaux, air, sols) par de multiples résidus de pesticides. L'inquiétude des populations à l'égard de ces composés ne cesse de grandir depuis la publication d'études qui montrent leurs impacts sur la santé humaine (Chin-Chan et al., 2015; INSERM, 2013). Plusieurs produits avaient déjà suscité des scandales sanitaires et sociétaux. C'est le cas du DDT, massivement utilisé dans les années 60, possédant une demi-vie longue (2 à 15 ans) et retiré du marché américain en 1972, puis par la suite en Europe. Plusieurs études ont impliqué ce composé ou ses métabolites dans diverses pathologies telles que des cancers, des troubles de la reproduction ou encore la maladie d'Alzheimer (Gaspari et al., 2011; INSERM, 2013; Richardson et al., 2014).

Actuellement, le rôle des pesticides dans l'incidence des maladies neurodégénératives et/ou dans leur aggravation est de plus en plus incriminé. La maladie de Parkinson est le cas de référence de l'impact des pesticides sur ces pathologies. En effet, des études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre l'exposition au paraquat et à la roténone, avec une augmentation de l'incidence de la maladie de Parkinson, chez les populations agricoles (van der Mark et al., 2012; Tanner et al., 2011). Les patients ont été exposés à de fortes doses de ces pesticides sur des périodes plus ou moins longues. Des études expérimentales ont confirmé ce lien et l'injection de roténone à des souris WT provoque l'apparition d'un syndrome parkinsonien (Betarbet et al., 2000). De plus, cette pathologie a été reconnue en 2012 comme maladie professionnelle par la MSA (Mutualité Sociale Agricole). Cependant, le lien entre l'exposition aux pesticides et les autres maladies

neurodégénératives telles que les maladies à prions et la maladie d'Alzheimer n'est pas encore clairement établit. Comme ces pathologies partagent des mécanismes communs d'agrégation et de propagation de protéines mal repliées au niveau du système central, notre hypothèse est que les pesticides pourraient agir en modifiant les équilibres réactionnels entre les différents espèces (protéines natives, petits oligomères solubles, larges oligomères et fibrilles) vers des formes oligomériques toxiques et agrégées.

Les principaux objectifs de mes travaux de thèse étaient de :

- ***(i) Identifier les effets du bioherbicide A6 sur l'agrégation et la propagation des prions in vivo***
- ***(ii) Identifier les effets d'une exposition chronique à des résidus de fongicides sur les marqueurs de la maladie d'Alzheimer***

I. Le bioherbicide A6 modifie l'agrégation et la propagation des prions

Depuis 2015, la France s'est inscrite dans le mouvement de la « chimie verte » lorsque l'Assemblée Nationale a voté la loi « 0'Phyto » interdisant progressivement l'utilisation et la vente de produits phytosanitaires d'origine synthétique aux collectivités publiques et aux particuliers (Loi n°2015-992). Par conséquent, l'utilisation de pesticides dits « biologiques » extraits de plantes est en augmentation, et on ne dispose pas de recul suffisant, ni de données expérimentales pour évaluer leurs effets sur la santé humaine.

Dans cette première étude, nous nous sommes intéressés à un pesticide issu de la « chimie verte », nommé A6. Cette molécule a été décrite pour ses propriétés herbicides. C'est un analogue structurel d'un pesticide biologique à large spectre, l'α-terthiényl (α-Ter) (Friedman and Friedman, 1995), molécule synthétisée par des plantes telles que les œillets d'inde ou les Astéracées et traditionnellement utilisées par les jardiniers sous forme de préparations/décoctions « maison » (Nivsarkar et al., 2001). A mon arrivée au laboratoire,

des études de criblage moléculaire sur des cellules infectées par les prions (N2a58/22L) avaient montré que le composé A6 était capable d'induire des formes oligomériques SDS résistantes de l'isoforme pathologique de la protéine prion, la PrP^{Sc} (rSDS-PrP^{Sc}) (Ayrolles-Torro et al., 2011; Imberdis et al., 2013).

Mon premier projet a été d'étudier l'effet du composé A6, à différentes doses (5, 10 et 20 mg/kg) sur l'agrégation de la PrP^{Sc} et la propagation des prions dans un modèle murin WT de maladies à prions.

➔ ***Dualité d'effet du composé A6***

Mes résultats ont révélé une dualité d'effet du composé A6 : à la dose de 5 mg/kg, A6 diminue le temps de survie des animaux avec une augmentation de la charge amyloïde. Tandis qu'aux plus fortes doses, le traitement par A6 augmente la survie des souris avec une diminution des dépôts amyloïdes. L'analyse des cerveaux a montré que seules les souris traitées avec 10 et 20 mg/kg d'A6 présentent des formes dimériques de rSDS-PrP^{Sc}.

Par un test *in vitro* de centrifugation rapide (RCA) sur homogénats infectés, nous avons montré que les faibles concentrations d'A6 favorisent la formation d'oligomères solubles de PrP^{Sc} SDS résistants (rSDS-PrP^{Sc}), alors que les plus fortes concentrations induisent des formes insolubles. Les données obtenues par le test RCA, suggèrent que les faibles doses du composé A6 stabilisent des formes oligomériques solubles rSDS-PrP^{Sc}. Ces oligomères pourraient s'apparenter à des noyaux de nucléation permettant un « ensemencement » des prions et favorisant la réplication et la propagation des prions. Ces données confirment le dogme actuel selon lequel les formes oligomériques solubles seraient les plus neurotoxiques (Silveira et al., 2005; Simoneau et al., 2007). A contrario, les oligomères insolubles rSDS-PrP^{Sc}, obtenus *in vitro* et *in vivo* aux doses les plus élevées d'A6, sont des agrégats amorphes ou non toxiques piégeant une partie de l'infectiosité des prions et moins aptes à propager les prions.

Cependant, le mode d'inoculation par la voie intrapéritonéale n'est pas très représentatif des voies d'exposition de l'Homme aux pesticides. D'autres voies de contamination, via l'alimentation ou par l'eau de boisson à de plus faibles doses auraient pu être testées pour le composé A6 afin de déterminer si des effets similaires sont retrouvés, voire également si les très faibles doses de A6 sont plus toxiques.

➔ ***Effet protecteur des oligomères insolubles rSDS-PrP^{Sc}***

Des expériences *in vitro* ont été réalisées au laboratoire avec un composé appelé MR100, un ligand bivalent dont la structure chimique s'apparente à une duplication de la molécule A6 (**Figure 91**). Le composé MR100 permet de détecter des oligomères rSDS-PrP^{Sc} insolubles dans des homogénats de cerveaux de patients atteints de formes sporadiques de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (sMCJ) ou du nouveau variant (Imberdis et al., 2016). De manière inattendue, le taux d'oligomères rSDS-PrP^{Sc} insolubles corrèle avec la durée de la phase symptomatique des patients atteints de sMCJ. Plus ils sont abondants dans le cerveau, plus la phase symptomatique de la maladie est longue, suggérant un effet « protecteur », comme celui observé sur nos souris traitées aux plus fortes doses d'A6.

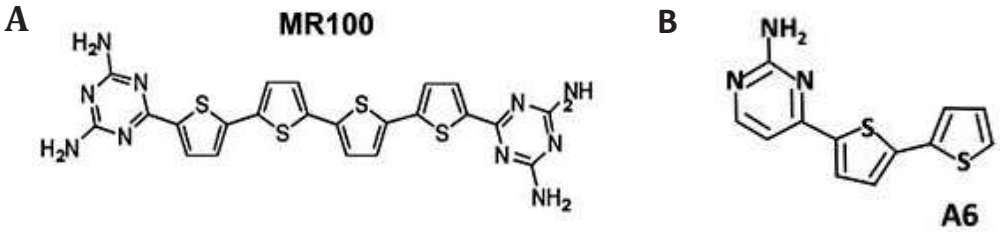


Figure 91. Schéma de la structure du composé MR100 (A) (extrait de Imberdis et al., 2016) **et du composé A6.**

De même, des composés similaires à A6 ou MR100, possédant 4 à 7 thiophènes, appelés LCO, (Luminescent Conjugated Oligothiophènes) sont capables de générer des oligomères de PrP^{Sc} stables SDS résistants dans un modèle de souris transgénique de maladies à prions. L'administration de ces composés par des mini-pompes dans le cerveau de souris

infectées par les prions induit un taux de survie de ces animaux de 80% (Herrmann et al., 2015). Ces travaux suggèrent que nos composés ont aussi un potentiel thérapeutique intéressant qu'il faudrait évaluer via des traitements en intracérébral.

Une étude récente avec un composé contenant 5 thiophènes nommé p-FTAA (**Figure 92A**) a montré que la cinétique de formation des fibrilles d'$A\beta_{1-42}$ en présence de ce composé génère des fibrilles moins toxiques pour les neuroblastomes (SH-SY5Y) (Civitelli et al., 2016).

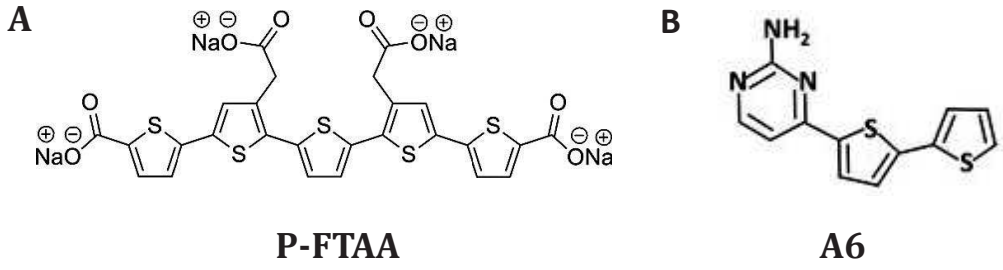


Figure 92. Schéma de la structure du p-FTAA (A) (extrait de Civitelli et al., 2016) **et du composé A6 (B).**

De plus, en présence de p-FTAA les espèces solubles d'Aβ sont converties plus rapidement en fibrilles amyloïdes insolubles non toxiques. Des études de dichroïsme circulaire associées à de la microscopie électronique à transmission (MET) ont montré que le p-FTAA favorisait la formation de fibrilles amyloïdes enrichie en feuillets β avec une résistante plus élevée à la PK. Cette étude montre que le p-FTAA modifie la structure des fibrilles amyloïdes d'Aβ en les rendant plus stables et non-toxiques (Civitelli et al., 2016).

Le composé A6 possédant 2 thiophènes (**Figure 92B**), il est possible que la résistance à la PK et aux conditions dénaturantes (SDS) des oligomères insolubles détectés à de fortes doses d'A6, puissent être liées à une agrégation rapide de la PrP^{Sc} enrichie en feuillets β. Des études complémentaires *in vitro* permettrait de répondre à cette question. Cependant, le composé A6 ayant un pic d'émission de fluorescence large, il n'est pas possible d'envisager des expériences de cinétiques d'agrégation *in vitro* avec des protéines prions recombinantes, car il perturbe la lecture de la fluorescence de la ThT.

D'autres hypothèses alternatives que nous proposons quant au mécanisme d'action sont : (i) le composé A6 stabiliserait des formes oligomériques de PrP^{Sc} déjà présentes dans le cerveau ; (ii) A6 se lierait à des oligomères de grande taille et à des fibrilles amyloïdes qui lors de la digestion à la PK en présence de SDS libèreraient les sous-unités liées par le composé.

➔ ***Interaction du composé A6 avec les formes fibrillaires***

L'interaction entre des fibrilles recombinantes de souris (MoPrP) ou de hamster (HaPrP) et le composé A6, a été montrée en utilisant la fluorescence intrinsèque de la molécule. Les spectres montrent un doublement du signal de fluorescence du composé lorsqu'il interagit avec les fibrilles de PrP (Article 1, Lafon et al., 2018). Les fibrilles de hamster, visualisées par microscopie, fluorescent en bleu car elles sont marquées par la fluorescence du composé A6 (**Figure 93**).

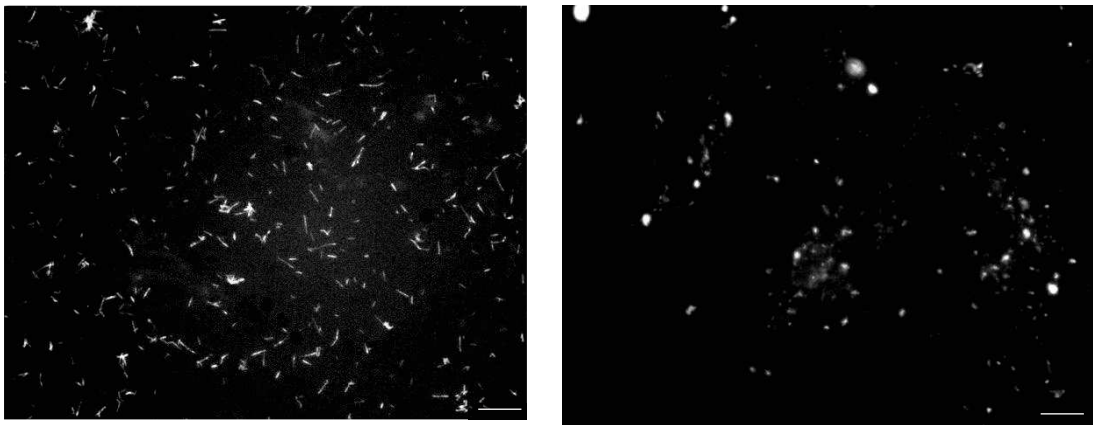


Figure 93. Marquage de fibrilles recombinantes de hamster de type S par la ThT (A) et par la composé A6 (B). Barre d'échelle : 5 µm.

Le test RCA appliqué sur un homogénat de cerveau infecté par les prions induit des oligomères de PrP^{Sc}, majoritairement insolubles, qui ne sont pas détectés avec un homogénat de cerveau sain. L'ensemble de ces données suggère que le composé A6 interagit spécifiquement avec les formes infectieuses du prion, riches en feuillets β et plutôt fibrillaires.

Le composé A6 pourrait être utilisé comme traceur de fibrilles amyloïdes, aussi bien pour les prions, que pour d'autres protéines amyloïdes (Aβ, α-synucléine,…). Cependant, le composé A6 est hydrophobe et en solution aqueuse on observe une extinction de sa fluorescence, empêchant son utilisation pour des cinétiques d'agrégation.

➔ ***Les biopesticides, un nouveau danger pour la santé ?***

La « chimie verte » ou aussi appelée « chimie écologique » se définit comme un nouveau courant inspiré par les mouvements environnementaux de préservation de la planète, visant à réduire le nombre d'étapes de synthèse chimique et supprimer la génération de déchets chimiques néfastes pour l'environnement. Selon l'organisation « American Chemical Society » ces procédés répondent à 12 principes fondateurs dont celui de la préservation de la santé humaine. En effet, un des objectifs de la chimie verte est d'identifier de nouvelles molécules qui se substitueront aux pesticides de synthèse. Dans ce but, les sociétés phytopharmaceutiques s'orientent vers la synthèse de dérivés à partir de molécules issue des plantes, avec des propriétés améliorées comme des demi-vies plus courtes, de l'ordre de quelques heures, pour éviter toute pollution environnementale. Cette nouvelle ère est désormais possible avec l'amélioration conséquente des techniques d'identification des molécules par spectrométrie de masse couplée aux méthodes d'extraction des molécules à partir des plantes.

Actuellement, l'utilisation de ces biopesticides est peu réglementée. Selon un rapport de 2014 du « Département sur la réglementation des pesticides de la Californie », les molécules d'origine naturelle suivent la même évaluation scientifique que les pesticides de synthèse. Cependant, ce même rapport souligne le fait que la plupart des biopesticides autorisés n'ont pas de doses réglementaires fixées (DJA, LMR,…) (Brooks, 2014). Ainsi, si l'EPA (Environmental Protection Agency) estime que les résidus de biopesticides présents

dans l'alimentation sont sans danger, ils peuvent être exempté de calcul de doses réglementaires.

Notre étude démontre que le composé A6, un bioherbicide, présente une toxicité à de faibles doses en augmentant la propagation et l'agrégation de la protéine prion. Nous avons choisit les doses de 5, 10 et 20 mg/kg du composé A6 qui correspondent aux valeurs supérieures de LMR appliquées pour des pesticides d'origine synthétique, en particulier les fongicides anilinopyrimidines qui ont des analogies structurales avec A6. En se référant aux résidus de pesticides détectés sur les fraises mentionnées dans le rapport de l'EFSA (**Figures 66 et 84**), le cyprodinil est le pesticide le plus fréquemment détecté (EFSA, 2018). Les intervalles de LMR de ce composé sont de 0,02 à 40 mg/kg d'aliments. Nos doses testées sont donc pertinentes par rapport à ces valeurs.

Nos études *in vivo* démontrent que les faibles doses du composé A6 (5 mg/kg) aggravent la pathologie à prions. On se demande si des doses encore plus faibles pourraient être plus néfastes. Au laboratoire, une étude réalisée sur les poissons zèbres a montré que le traitement avec le composé A6 à des doses de l'ordre du micromolaire diminue la survie des larves. Par contre, les effets sur le système nerveux central, en particulier la ligne latérale un organe mécano-sensoriel sont visibles à des doses bien plus faibles de l'ordre du nanomolaire (Nasri et al., 2016). Par microscopie confocale, le composé A6 se fixe principalement dans le système nerveux central des larves de poissons zèbre (**Figure 94**). Ces données nous indiquent que le composé A6 pourrait être impliqué, même à de très faibles doses, dans des processus de neurodégénérescence.

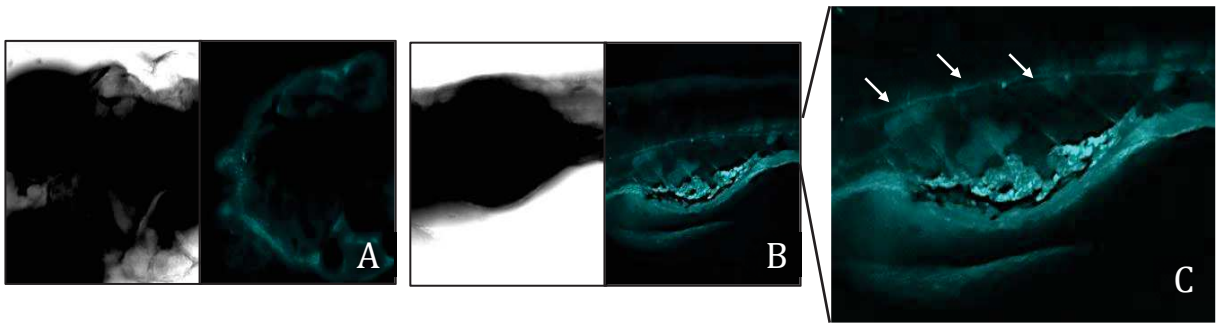


Figure 94. Distribution du composé A6 dans le système nerveux central des larves de poisson zèbre. Distribution du composé A6 (50 nM) au niveau de la tête **(A)** et du corps **(B)** de la larve. Les flèches blanches montrent la ligne latérale des larves.

En résumé, les recherches effectuées sur le composé A6 montrent qu'il a la capacité de former des oligomères rSDS-PrP^{Sc} solubles ou insolubles en fonction des doses utilisées. Selon que ces oligomères rSDS-PrP^{Sc} soient solubles ou insolubles, les effets sur la maladie seront différents. Le fait que les doses les plus faibles soient plus toxiques que les doses élevées pose un réel problème concernant les pesticides, qu'ils soient synthétiques ou biologiques. Les essais toxicologiques qui se basent uniquement sur les fortes doses, devraient prendre en considération les effets des faibles et très faibles doses pour évaluer leur impact dans des modèles animaux. Par ailleurs, l'appellation « pesticide biologique » peut avoir dans l'inconscient collectif, de considérer ces substances comme inoffensives. Ces biopesticides étant moins efficaces et demandant un nombre supérieur d'applications par rapport aux pesticides de synthèse, il est donc probable que des effets néfastes sur la santé humaine soient identifiés sur le long terme.

II. L'exposition chronique à un cocktail de résidus de fongicides exacerbe les marqueurs de la maladie d'Alzheimer

Une recherche d'analogues structurels au composé A6, dans des banques de données de pesticides, a permis l'identification d'une classe de fongicides commercialisés : les anilinopyrimidines. Cette famille se compose de trois molécules actives : le cyprodinil, le mépanipyrim et le pyriméthanil. Ces composés sont couramment utilisés pour lutter contre l'apparition de champignons cryptogamiques responsables de la pourriture grise des fruits et des produits maraîchers. De nombreux rapports indiquent la présence de résidus d'anilinopyrimidines dans l'ensemble de l'environnement (eaux, air, sols) et dans notre alimentation et pointent du doigt l'exposition chronique des populations à ces résidus.

Les études publiées précédemment sur les pesticides et la maladie d'Alzheimer se basent sur les effets d'un seul composé, à de fortes doses. Cependant, il est rare d'être exposé à de telles doses dans notre environnement, excepté le cas d'exposition aigüe dans le cadre de contamination accidentelle. La population générale, est chroniquement exposée à de multiples résidus de pesticides, c'est-à-dire à de faibles doses voire très faibles, via notre environnement et plus particulièrement par notre alimentation et l'eau de boisson. Le deuxième objectif de mes travaux de thèse a consisté à évaluer l'impact d'un traitement chronique à de faibles doses (0,1 µg/L) d'un cocktail de trois fongicides (cyprodinil, mépanipyrim et pyriméthanil), via l'eau de boisson, dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (J20).

➔ *Le cocktail d'anilinopyrimidines augmente la formation de plaques amyloïdes dans l'hippocampe et le cortex des souris J20 et exacerbe l'angiopathie amyloïde cérébrale*

L'exposition de souris J20, à un cocktail de cyprodinil, mépanipyrim et de pyriméthanil pendant 9 mois, a montré : (*i*) une forte augmentation du nombre et de la taille des plaques amyloïdes au niveau de l'hippocampe et du cortex ; (*ii*) une augmentation des formes solubles des peptides $A\beta_{1-42}$; (*iii*) une augmentation de l'expression de BACE1 ; et

(iv) une diminution de l'expression de la NEP. Nos expériences *in vitro* ont démontré que les anilinopyrimidines sont capables de modifier la cinétique de formation des fibrilles d'Aβ en diminuant fortement la phase de latence et en augmentant l'intensité de la fluorescence au terme du plateau. Une étude longitudinale *in vivo* d'apparition des agrégats sur des souris J20, à 3, 6 et 9 mois a montré que les pesticides exercent leurs effets entre 6 et 9 mois, et augmentent les agrégats vasculaires au niveau du cortex superficiel.

L'analyse plus précise, à partir de reconstructions en 3D des régions analysées, montre que ces agrégats sont posés sur les parois des vaisseaux sanguins. Aucune plaque n'a été observée traversant la paroi des vaisseaux ce qui suggère que l'augmentation de ces agrégats provient du système nerveux central et non de la périphérie. Cette forte augmentation des agrégats vasculaires peut en partie s'expliquer à la fois par l'augmentation de la production de peptides Aβ due à l'augmentation de l'expression de BACE1 mais aussi par un défaut de clairance lié à la diminution de l'expression de la NEP. Il est possible que l'augmentation des dépôts amyloïdes autour des vaisseaux sanguins soit liée à un défaut de drainage du fluide interstitiel pour évacuer le surplus de peptides Aβ (Yoon and Jo, 2012).

Les vaisseaux leptoméningés sur lesquels se forment les plaques vasculaires de l'angiopathie amyloïde cérébrale, sont dépourvus de barrière hémato-encéphalique (BHE). Cet élément, associé à la perturbation de la BHE dans le modèle J20, facilite l'entrée du cyprodinil, du mépanipyrim et du pyriméthanil dans le système nerveux central. En effet, les dépôts vasculaires présents chez les souris J20, perturbent la liaison des pieds astrocytaires avec les vaisseaux sanguins, provoquant une ouverture de la BHE (Kimbrough et al., 2015). Des études toxicologiques sur le métabolisme, la distribution et l'élimination des anilinopyrimidines ont montré leur présence dans de nombreux tissus et fluides corporels. Ainsi, le traitement oral de vaches avec du pyriméthanil (0,4 mg/kg de masse corporelle/jour pendant 7 jours) permet la détection de 34 µg de métabolites dans le sang (FAO reports). Ces résultats sont similaires à ceux observés chez le rat (FAO reports). Ces données

toxicologiques montrent que les anilinopyrimidines et leurs métabolites sont capables de traverser la barrière intestinale pour se retrouver dans le sang et ainsi atteindre le cerveau au travers des vaisseaux leptoméningés. Un cercle vicieux peut alors se perpétuer. L'entrée des anilinopyrimidines et de leurs métabolites dans le SNC par les vaisseaux leptoméningés provoquerait une production accrue de peptides Aβ et un défaut de leur clairance. Au fur et à mesure, que les dépôts vasculaires se forment, la BHE est endommagée permettant une entrée accrue de pesticides dans le SNC, stimulant encore plus l'apparition de plaques vasculaires.

➔ ***Les marqueurs de l'inflammation et de la mort neuronale sont aggravés après traitement au cocktail d'anilinopyrimidines***

Le traitement chronique de souris J20 aux résidus de fongicides augmente les processus inflammatoires cérébraux avec une astrogliose visible au niveau du gyrus denté (GD) et de l'aire CA1, associée à une augmentation de la microgliose à l'ensemble de l'hippocampe. Précédemment, des études ont montré que l'activation de la microglie était associée à une mort neuronale dans l'aire CA1 chez les souris J20 (Wright et al., 2013). Nous retrouvons ce phénotype de mort neuronale dans l'aire CA1 des souris J20 traitées, mais aussi au niveau de l'aire CA3 où une augmentation de l'activation de la microglie de 40% a été mesurée. Ces résultats suggèrent que cette mort neuronale supplémentaire est associée à l'augmentation de la microgliose, rapprochant ainsi notre modèle des conditions humaines de la pathologie où une mort neuronale est observée dans l'aire CA1 et CA3 (Padurariu et al., 2012). Les plaques amyloïdes jouent un rôle dans l'activation de la microglie (Serrano-Pozo et al., 2011). Ainsi, l'augmentation des agrégats au niveau de l'hippocampe des souris J20 traitées participerait à l'activation microgliale pour éliminer l'excès d'agrégats.

L'exacerbation des processus inflammatoires chez les souris J20 traitées avec le cocktail de pesticides est associée à une augmentation de la sécrétion d'IL1β et d'IL6. Ces deux interleukines pro-inflammatoires ont la capacité d'activer des voies de signalisation

intracellulaires toxiques conduisant à la mort des neurones (Serrano-Pozo et al., 2011). De plus, il a été décrit que l'IL1β et l'IL6, par l'intermédiaire de leurs récepteurs, sont capables d'activer les facteurs de transcriptions NFκB et AP-1. AP-1 est en capacité de réguler positivement la transcription de BACE1, ce qui pourrait expliquer en partie l'augmentation de son expression chez les souris J20 traitées (Chami and Checler, 2012). Nous sommes donc confrontés à un nouveau cercle vicieux. Le traitement des souris J20 avec les anilinopyrimidines augmente les plaques amyloïdes et les processus inflammatoires conduisant à la production d'interleukines pro-inflammatoires. Ces interleukines vont pouvoir en retour exacerber l'inflammation via l'activation de NFκB, et stimuler la production de BACE1. BACE1 augmenté conduira alors à une production accrue de peptides Aβ. Le cycle de l'inflammation et celui de l'agrégation qui s'auto-stimulent, s'emballent de manière irréversible.

➔ ***Limites du modèle J20***

Le modèle transgénique J20 est un modèle de la maladie d'Alzheimer qui se caractérise exclusivement par la production et l'agrégation des peptides Aβ. Ce modèle ne présente pas d'hyperphosphorylations, ni d'agrégation de la protéine Tau conduisant à des DNF (Mucke et al., 2000). Des études montrent que les déficits cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer corrèlent plutôt avec l'hyperphosphorylation de la protéine Tau plutôt qu'avec les agrégats d'Aβ (Schwarz et al., 2016). Il serait intéressant de tester l'effet des faibles doses de pesticides sur la maladie d'Alzheimer dans un modèle présentant à la fois des plaques amyloïdes Aβ et des hyperphosphorylations de la protéine Tau. Nous nous intéressons au modèle APP^{NL-F} (knock-in) qui exprime de l'APP contenant les mutations suédoise (K670M/N671L) et ibérique (I716F) à des taux physiologiques (Saito et al., 2014). Les souris APP^{NL-F} produisent des peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ en grandes quantités conduisant à l'apparition de plaques dès 6 mois au niveau du cortex et de l'hippocampe. La présence de

Tau hyperphosphorylée apparaît plus tardivement ainsi que les déficits cognitifs (18 mois) (Saito et al., 2014). De plus, ce modèle possède des plaques amyloïdes vasculaires réminiscentes à l'angiopathie amyloïde vasculaire dans un contexte où l'APP muté n'est pas surexprimé et il pourrait être intéressant d'établir une comparaison de l'effet du cocktail d'anilinopyrimidines avec les effets obtenus sur les souris J20.

➔ ***Les doses règlementaires dans l'eau potable sont elles adaptées ?***

Nos travaux de recherche montrent pour la première fois les effets d'un traitement chronique de trois fongicides sur les marqueurs de la MA. La dose que nous avons utilisée correspond à la concentration maximale autorisée dans l'eau de boisson (0,1 µg/L) pour les anilinopyrimidines et qui correspond à leur limite de quantification.

Certaines études de quantification des résidus de pesticides dans l'eau recherche la présence de composés anilinopyrimidines, surtout dans les régions viticoles, où les antifongiques sont très utilisés pour le traitement de la vigne. Une étude conduite en Espagne a montré la présence de cyprodinil et de pyriméthanil dans l'eau à des concentrations largement supérieures à celles autorisées par la législation européenne (0,981 et 0,59 µg/L respectivement) (Herrero-Hernández et al., 2016). De même, des études ont récemment décrits des souches de champignons devenant résistantes à ces 3 fongicides ce qui laisse présager à l'avenir une augmentation de ces résidus dans notre environnement (Saito and Xiao, 2018; Fan et al., 2016). La résistance des champignons aux fongicides que nous avons étudié a conduit la législation européenne à s'adapter et à augmenter les LMR de ces composés. En effet, selon le site de l'Union Européenne, depuis 2013 de nombreuses modifications de la règlementation ont permis de relever les maxima autorisés sur certains aliments notamment pour le cyprodinil. Des exemples de modifications de LMR sont donnés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 10**).

Cyprodinil			
Aliments	**2013**	**2016**	**2018**
Fines herbes et fleurs comestibles	15	40	**40**
Céleris	5	5	**30**
Artichauts	0,05	0,02	**4**
Pommes	1	2	2
Mépanipyrim			
Aliments	**2013**	**2016**	**2018**
Fraises	1,5	3	3
Framboises	0,01	0,01	**4**
Tomates	0,8	1,5	1,5
Concombres	0,01	0,5	0,5
Pyriméthanil			
Aliments	**2014**	**2017**	**2018**
Pommes	7	15	**15**
Mûres	10	15	**15**
Kakis	0,01	15	**15**
Poireaux	1	4	**4**

Tableau 10. Exemples d'augmentation des seuils maximum de LMR du cyprodinil, du mépanipyrim et du pyriméthanil entre 2013 et 2018, pour certains fruits et légumes (informations extraites de la base de données de pesticides de l'Union européenne).

Nous pouvons donc nous attendre à une augmentation des résidus d'anilinopyrimidines dans l'alimentation mais aussi dans l'eau de consommation ce qui constitue un problème majeur de santé publique. En effet, Lukowicz et ses collaborateurs ont démontré qu'une exposition chronique au travers de l'alimentation, à un cocktail de 6 pesticides couramment utilisés en France, à la dose journalière admissible, conduit à un effet obésogène et diabétogène sur des souris WT, traitées pendant 52 semaines (Lukowicz et al., 2018).

En conclusion, nos travaux de recherche sont les premiers à montrer l'impact de très faibles doses de fongicides dans l'aggravation des marqueurs de la maladie d'Alzheimer, dans un modèle murin de formes familiales de la pathologie. L'exposition sur le long terme à de très faibles doses de pesticides est considérée comme sans risques or notre étude suggère le contraire. Le cyprodinil, le mépanipyrim et le pyriméthanil peuvent être considérés comme

des composés « Alzheimerogènes » aux doses testées. Comme ces fongicides accélèrent la cinétique de formation des fibrilles amyloïdes d'Aβ, augmentent les plaques amyloïdes et les processus inflammatoires, nous pouvons suspecter leur rôle dans l'apparition et/ou l'aggravation des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer.

En effet, Arendt et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer pourraient être d'origine développementale (Arendt et al., 2017). Des polluants environnementaux pourraient perturber le pool de cellules souches au cours de la période fœtale et interférer dans les processus de corticogenèse. Ils pourraient modifier le stock d'ADN diploïde d'une minorité de neurones différenciés (DVC-DNA Variation Content). Mais les neurones ayant un stock d'ADN supérieur sont plus sensibles à la mort neuronale au cours du vieillissement et dans les pathologies comme Alzheimer et l'autisme. Cette hypothèse est fondée sur d'autres analyses en particulier le marqueur Tau. Les agrégats de la protéine Tau apparaissent et se disséminent dans le cerveau, en suivant le même schéma que celui qui est opéré lors du développement cérébral. Braak et Del Tredici ont analysé des cerveaux d'individus âgés de 4 à 29 ans (Braak and Del Tredici, 2011). Ils ont montré que des phosphorylations précoces de la protéine Tau (Ser 202, Thr 205) impliquées dans la MA, étaient détectées dans de fortes proportions dans le cortex entorhinal entre autre, d'individus très jeunes, dont le cas le plus jeune avait 6 ans. Ces analyses suggèrent que la conversion pathologique de la protéine Tau pourrait débuter avant même la puberté. La répartition de ces phosphorylations précoces de Tau est majoritairement localisée dans les régions d'initiation de l'agrégation de la protéine Tau selon les stades de Braak (Braak I-II).

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'exposition aux anilinopyrimidines durant l'enfance, voire pendant la période de développement *in utero* (transmission verticale) puisse perturber le développement normal du cerveau et contribuer à des dysfonctionnements qui pourraient, à l'âge adulte, déclencher des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer.

➔ ***Conclusion générale***

Ainsi, l'ensemble des données obtenues permet d'établir différents modèles de l'impact des pesticides sur les protéines amyloïdes. L'utilisation de différentes classes de pesticides (bioherbicide et fongicides) a montré que les effets étaient différents en particulier sur les étapes de l'agrégation et de la propagation des prions (**Figure 95**).

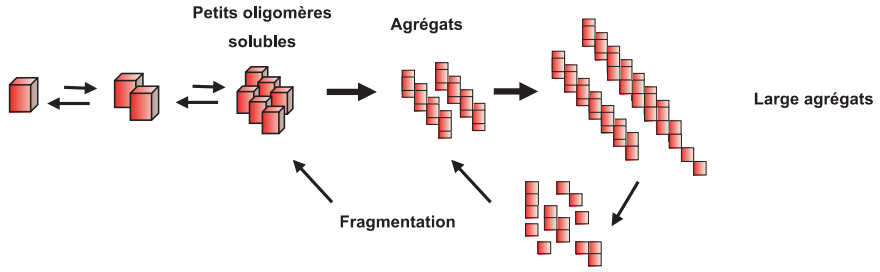
Le schéma classique de la propagation des amyloïdes implique l'association de monomères qui vont former des espèces oligomériques solubles qui s'autoassembleront pour former des agrégats, puis des fibrilles. Ces larges agrégats pourront se fragmenter pour produire de nouveaux noyaux de nucléation qui permettront la dissémination et la propagation des amyloïdes dans le système nerveux central (**Figure 95A**).

Le premier modèle illustre l'impact des fortes doses d'un bioherbicide (10 et 20 mg/kg) sur les différentes formes de PrP^{Sc} (monomères, dimères, oligomères, fibrilles). Le composé A6 aux fortes doses induit la formation de larges agrégats non toxiques amorphes (**Figure 95B**). Nous pensons que dans ce contexte, les oligomères sont piégés (mécanisme probable de cross-linking) dans ces agrégats amorphes expliquant l'augmentation de la survie des animaux inoculés par les prions.

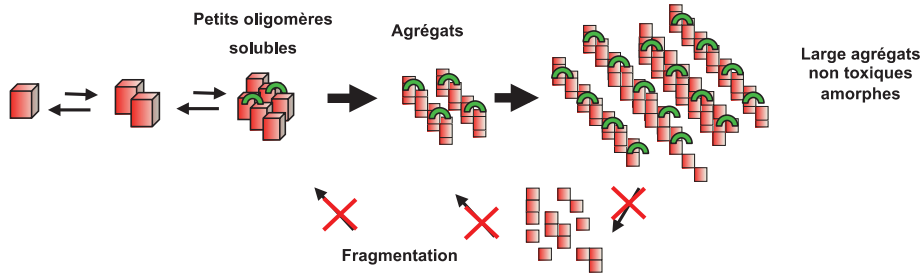
Le deuxième modèle intègre nos données obtenues à de moyennes doses du bioherbicide A6 (5 mg/kg) dans lequel, des formes oligomériques solubles de PrP^{Sc} apparaissent et propageraient plus rapidement la maladie (**Figure 95C**).

Dans le dernier modèle, l'agrégation des peptides Aβ est étudiée en présence d'un cocktail d'anilinopyrimidines à de très faibles doses (0,1 µg/L) (**Figure 95D**). Dans ce contexte, la production des peptides Aβ est renforcée par la surexpression de BACE1 et la diminution du taux de néprilysine. La résultante des deux effets conduit à l'augmentation de l'ensemble des formes solubles (monomériques, dimériques, oligomériques) puis agrégées. Ces très faibles doses semblent impacter l'ensemble des espèces, oligomères ou plaques amyloïdes, du cycle d'agrégation des peptides Aβ.

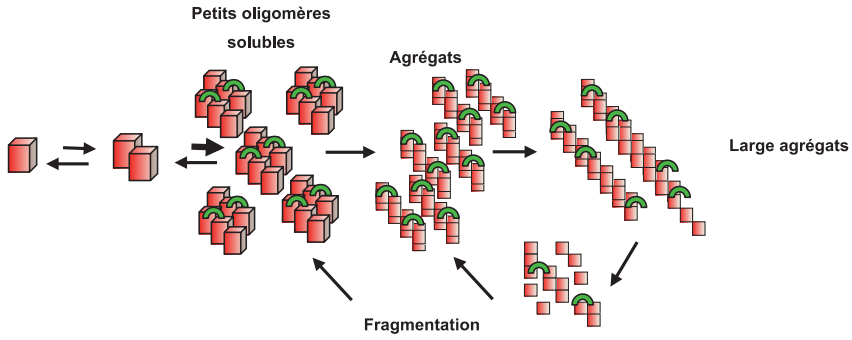
A. Schéma de l'agrégation des amyloïdes



B. Schéma de l'agrégation de la PrP^{Sc} aux plus fortes doses étudiées de bioherbicide (10/20 mg/kg)



C. Schéma de l'agrégation de la PrP^{Sc} aux plus faibles doses étudiées de bioherbicide (5 mg/kg)



D. Schéma de l'agrégation des peptides Aβ à de très faibles doses d'antifongiques (0,1 µg/L)

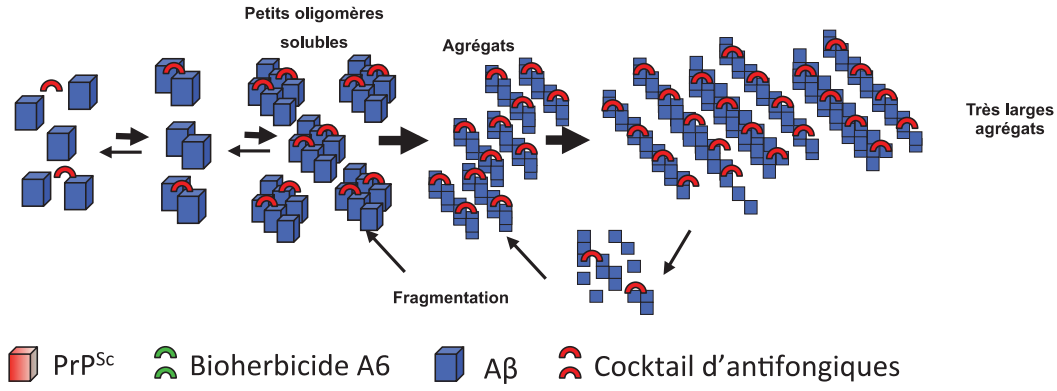


Figure 95. Schéma récapitulatif global des effets obtenus par les composés anti-fongiques ou le bioherbicide A6 dans les différents modèles, prions et Alzheimer.

Annexes

I. Impact du cholestérol plasmatique dans la propagation des prions

➔ ***Contexte de l'étude***

Le cerveau est constitué de lipides, acides gras, phospholipides et cholestérol, qui constituent 60% de sa matière sèche (Crawford, 1990). Le métabolisme lipidique fait actuellement l'objet de nombreuses études pour mieux comprendre son rôle dans les pathologies neurodégénératives telles que les maladies à prions, la maladie d'Alzheimer ou encore la maladie de Parkinson. Les enzymes du métabolisme lipidique pourraient constituer de nouveaux bio-marqueurs et des cibles intéressantes pour développer des stratégies thérapeutiques différentes.

Des études ont indiqué que les processus de transconformation de la PrP^{C} en PrP^{Sc} se produisent à la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques, riches en phospholipides et en cholestérol (Pinheiro, 2006; Vey et al., 1996). Plusieurs travaux ont démontré que les phospholipides sont des cofacteurs essentiels dans ce processus de conversion *in vitro* à partir de protéines recombinantes. Par exemple, Zhang et ses collaborateurs ont montré que la PrP^{Sc} recombinante de souris, pouvait être produite *de novo* avec des protéines recombinantes de PrP en présence de phospholipides et d'ARN, après plusieurs cycles de PMCA (Zhang et al., 2013). La phosphatidyléthanolamine (PE) peut être utilisée comme un cofacteur unique, en PMCA, pour générer de la PrP^{Sc} de souris recombinante, après ensemencement avec des souches de prion murines (Deleault et al., 2012). Chez l'Homme, Safar et ses collaborateurs ont montré que la PrP^{Sc} provenant d'homogénats de cerveaux de patients atteints de la MCJ, est associée aux LDL (low-density lipoprotein) et VLDL (very low-density lipoprotein) mais pas aux HDL (high-density lipoprotein) (Safar et al., 2006). Ces cargos lipidiques permettent le transport du cholestérol

dans le sang. L'association PrP^{Sc}-LDL/VLDL résulte d'une interaction spécifique entre la PrP et l'ApoB (apolipoprotéine B), le principal composant protéique de ces cargos lipidiques. Ces résultats *in vitro* suggèrent que les lipoprotéines agissent comme des transporteurs de la protéine prion dans la circulation périphérique (Safar et al., 2006). Cependant, ces données n'ont jamais été établies *in vivo*.

➔ ***Résultats***

Au laboratoire, nous avons recherché si la variation du taux de cholestérol plasmatique pourrait moduler l'infectiosité des prions. Pour cela, nous avons utilisé un modèle murin de dyslipidémie dû à une déficience en protéine de transfert des phospholipides ($PLTP^{-/-}$) (Perrier et al., 2017). La PLTP est une protéine de transport lipidique extracellulaire impliquée dans le métabolisme des lipides (Albers et al., 2012; Jiang et al., 2012; Tzotzas et al., 2009). Elle joue un rôle majeur dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines dans le foie et les intestins (Jiang et al., 2005; Liu et al., 2007). Les souris $PLTP^{-/-}$ présentent une diminution marquée du taux de cholestérol plasmatique et réagissent fortement aux régimes hypercholestérolémiants, sans pour autant altérer les processus d'absorption des lipides au niveau tissulaire. En effet, un tel régime provoque une forte augmentation du taux de cholestérol plasmatique dû à un défaut de régulation du métabolisme lipidique.

Les taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides ont été dosés chez les souris WT et $PLTP^{-/-}$ avant toute expérience d'inoculation. Les résultats ont confirmé une diminution de la cholestérolémie et une augmentation du taux de triglycérides chez les souris $PLTP^{-/-}$ par rapport aux souris contrôles, bénéficiant d'un régime alimentaire standard (**Figure 96**). Cependant, les souris $PLTP^{-/-}$ ne présentent pas de différences des taux de cholestérol au niveau du tissu cérébral.

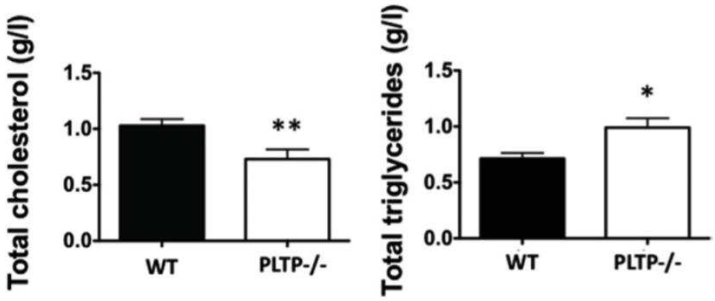


Figure 96. Taux plasmatiques en cholestérol et triglycérides des souris WT et PLTP$^{-/-}$ sous un régime standard. Les souris PLTP$^{-/-}$ présentent une diminution du taux de cholestérol plasmatique et une augmentation du taux de triglycérides par rapport aux souris contrôles (extrait de Perrier et al., 2017).

Afin d'évaluer le rôle de la protéine PLTP sur la propagation des prions, une première série d'expériences a été réalisée en testant deux voies d'inoculations différentes : intracérébrale et intrapéritonéale. Ainsi des souris WT et PLTP$^{-/-}$ ont été inoculées en intracérébral ou en intrapéritonéal avec un homogénat de cerveau infecté par la souche de prions 22L. En parallèle, des souris contrôles ont été inoculées avec du PBS. Les résultats ne révèlent pas de différences statistiquement significatives au niveau des temps de survie entre les souris WT et PLTP$^{-/-}$ injectées par la voie intracérébrale avec la souche 22L (158 jours post-inoculation (j.p.i.) pour les WT et 162 j.p.i. pour les souris PLTP$^{-/-}$) (**Figure 97A**). Néanmoins, les souris PLTP$^{-/-}$ inoculées par voie intrapéritonéale présentent un temps de survie augmenté, statistiquement significatif, par comparaison avec les souris WT (218 j.p.i. pour les souris WT versus 231 j.p.i. pour les PLTP$^{-/-}$) (**Figure 97B**).

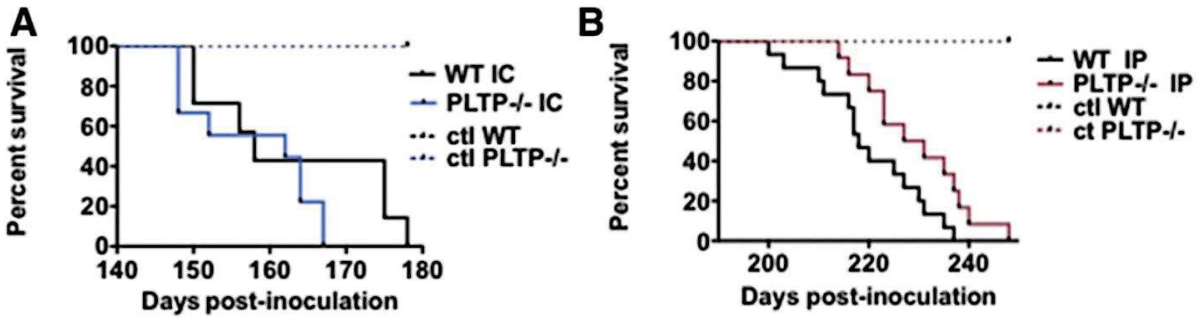


Figure 97. Courbes de survie des souris WT et PLTP$^{-/-}$ après inoculation de la souche prion 22L par voie intracérébrale (A) ou intrapéritonéale (B). Les souris PLTP$^{-/-}$ présentent un temps de survie allongé par rapport aux souris WT après inoculation de la souche de prions en intrapéritonéal (extrait de Perrier et al., 2017).

Ainsi, les taux réduits de cholestérol plasmatiques sont associés à une augmentation du temps de survie des souris PLTP$^{-/-}$ inoculées par des prions en intrapéritonéal. L'hypothèse que la restauration du taux de cholestérol par un régime riche en lipides pourrait faciliter la propagation des prions chez les souris PLTP$^{-/-}$ a été émise. Dans un premier temps, des souris WT et PLTP$^{-/-}$ ont eu un régime alimentaire standard ou un régime enrichi en lipides pendant 4 semaines. Avant inoculation des animaux par la souche de prions, les différents taux de cholestérol plasmatiques ont été mesurés. L'analyse des données montre qu'après traitement avec un régime riche en lipides, les souris PLTP$^{-/-}$ ont une augmentation du taux plasmatique de cholestérol total de près 135% par rapport aux souris PLTP$^{-/-}$ nourries avec une alimentation standard (**Figure 98A**). Le régime riche en lipides ne provoque pas d'augmentation du cholestérol total chez les souris WT dont le métabolisme régule cet excès dans le sang des animaux. Le taux de triglycérides plasmatiques est inchangé pour les souris WT et PLTP$^{-/-}$ par rapport au régime standard (**Figure 98B**). Cependant, les taux de cholestérol HDL sont fortement augmentés pour les deux groupes de souris (**Figure 98C**) alors que le cholestérol non-HDL est uniquement augmenté pour les souris PLTP$^{-/-}$, sans régime riche en cholestérol (**Figure 98D**).

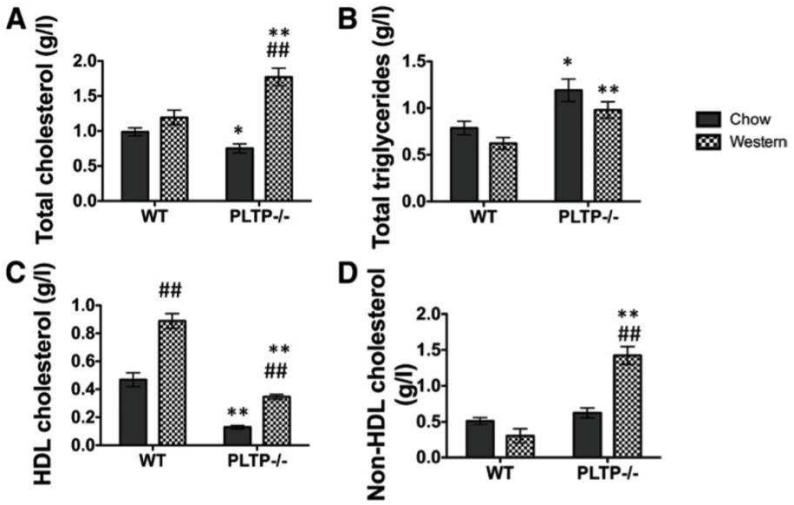


Figure 98. Analyse des taux plasmatiques de cholestérol (A), de triglycérides (B), de cholestérol HDL (C) et de cholestérol non-HDL (D) de souris WT et PLTP$^{-/-}$ soumises à un régime standard (chow) ou enrichi en cholestérol (western). Les étoiles (*) rapportent les différences statistiquement significatives entre les souris WT et PLTP$^{-/-}$, alors que les dièses (#) montrent les différences entre les deux types de régimes, au sein du même groupe d'animaux (extrait de Perrier et al., 2017).

Les souris WT et PLTP$^{-/-}$, sous régime standard ou enrichi en cholestérol, ont été inoculées en intrapéritonéal avec un homogénat de cerveau infecté par la souche de prions 22L. Chez les souris WT, il n'y a pas de différence entre les courbes de survie quel que soit le régime alimentaire, standard ou enrichi en cholestérol (**Figure 99A**) (médianes de survie : 226 j.p.i. pour les WT S et 218 j.p.i. pour les WT L). Cependant, on observe chez les souris PLTP$^{-/-}$ sous régime riche en cholestérol une diminution du temps de survie, statistiquement significative (**Figure 99B**, PLTP L, courbe violette) par rapport aux souris PLTP$^{-/-}$ sous régime standard (PLTP S, courbe noire) (médianes de survie : 233 j.p.i. pour les souris PLTP S versus 203 j.p.i. pour les PLTP L). Ces résultats illustrent bien que les taux plasmatiques de cholestérol modulent la propagation des prions *in vivo*.

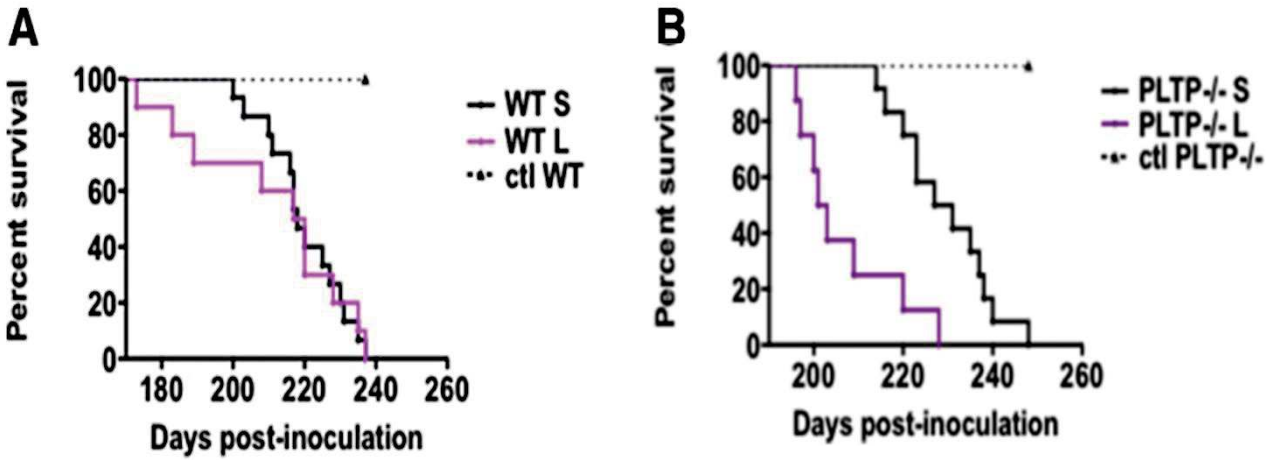


Figure 99. Courbes de survie des souris WT et PLTP$^{-/-}$ après inoculation de la souche prion 22L en intrapéritonéal et soumises à un régime standard ou un régime riche en cholestérol. L'augmentation de l'apport en cholestérol n'influence pas le temps de survie des WT (**A**) mais diminue le temps de survie des souris PLTP$^{-/-}$ (**B**) par rapport aux souris contrôles sous un régime standard (extrait de Perrier et al., 2017).

En conclusion, nos résultats montrent que le déficit en PLTP est associé à une augmentation de la survie des souris inoculées en intrapéritonéal avec la souche de prions 22L, sous un régime standard. Cependant, lorsque les souris sont soumises à un régime riche en lipides, la survie des souris PLTP-/- diminue fortement par rapport au souris sous régime standard. L'analyse des taux plasmatiques de cholestérol montre que le cholestérol non-HDL est fortement augmenté chez les souris PLTP $^{-/-}$ sous régime lipidique. Ces résultats démontrent que le cholestérol non-HDL joue un rôle critique dans la propagation des prions, en accord avec les données publiées par Safar et ses collaborateurs (Safar et al., 2006).

Mon rôle dans ce travail a été de former Mlle. M. Cefis aux différentes techniques d'hitologie : coupes histologiques de cerveaux inclus en paraffine, colorations Hématoxyline/Eosine, immunormarquages GFAP et PET-blots. Dans un deuxième temps, j'ai participé aux expériences complémentaires demandées lors du reviewing de l'article en mettant au point l'immunomarquage IBA1, nécessitant un démasquage épitopique des coupes en paraffine, puis les quantifications des différents marquages (GFAP, IBA1) ainsi que leurs analyses statistiques. Ma contribution s'est achevée par la relecture du manuscrit corrigé.

Article 3

« Plasma cholestérol level determines *in vivo* prion propagation »

Perrier Véronique, Imberdis Thibaut, Lafon Pierre-André, Cefis Marina, Wang Yunyun, Huetter Elisabeth, Arnaud Jacques-Damien, Alvarez-Martinez Maria-Teresa, Le Guern Naig, Maquart Guillaume, Lagrost Laurent and Desrumaux Catherine.

Journal of Lipid Research, 2017, 58(10) : 1950-1961.

Check for updates

✤ *Author's Choice*

Plasma cholesterol level determines in vivo prion propagation[S]

Véronique Perrier,[1,*] Thibaud Imberdis,[*] Pierre-André Lafon,[*] Marina Cefis,[*] Yunyun Wang,[*,†] Elisabeth Huetter,[*] Jacques-Damien Arnaud,[§] Teresa Alvarez-Martinez,[§] Naig Le Guern,[,††] Guillaume Maquart,[**,††] Laurent Lagrost,[**,††,§§] and Catherine Desrumaux[1,*,††]**

Université Montpellier* and Inserm U1198, Montpellier, F-34095 France and EPHE, Paris, F-75007 France; Cellular Signaling Laboratory,[†] College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China; Etablissement Confiné d'Expérimentation A3/L3,[§] CECEMA, US009 Biocampus, UMS 3426, Université Montpellier, Montpellier, F-34095 France; INSERM, LNC UMR866,** F-21000 Dijon, France and LNC UMR866, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France; LipSTIC LabEx,[††] Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Franche Comté, F-21000 Dijon, France; and University Hospital of Dijon,[§§] F-21000 Dijon, France

Abstract Transmissible spongiform encephalopathies are fatal neurodegenerative diseases with an urgent need for therapeutic and prophylactic strategies. At the time when the blood-mediated transmission of prions was demonstrated, in vitro studies indicated a high binding affinity of the scrapie prion protein (PrP^{Sc}) with apoB-containing lipoproteins, i.e., the main carriers of cholesterol in human blood. The aim of the present study was to explore the relationship between circulating cholesterol-containing lipoproteins and the pathogenicity of prions in vivo. We showed that, in mice with a genetically engineered deficiency for the plasma lipid transporter, phospholipid transfer protein (PLTP), abnormally low circulating cholesterol concentrations were associated with a significant prolongation of survival time after intraperitoneal inoculation of the 22L prion strain. Moreover, when circulating cholesterol levels rose after feeding PLTP-deficient mice a lipid-enriched diet, a significant reduction in survival time of mice together with a marked increase in the accumulation rate of PrP^{Sc} deposits in their brain were observed. Our results suggest that the circulating cholesterol level is a determinant of prion propagation in vivo and that cholesterol-lowering strategies might be a successful therapeutic approach for patients suffering from prion diseases.—Perrier, V., T. Imberdis, P-A. Lafon, M. Cefis, Y. Wang, E. Huetter, J-D. Arnaud, T. Alvarez-Martinez, N. Le Guern, G. Maquart, L. Lagrost, and C. Desrumaux. **Plasma cholesterol level determines in vivo prion propagation. *J. Lipid Res.* 2017.** 58: **1950–1961.**

Supplementary key words lipid transfer proteins • lipoproteins • neurons • brain • animal models • neurodegenerative diseases • encephalopathy

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders affecting mammals, and there are neither cures nor palliative therapies to delay their onset or progression (1, 2). They are sporadic, inherited, or acquired disorders. In humans, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is the most frequent prion disease; while in animals, the most common prion diseases are scrapie, bovine spongiform encephalopathy, and the chronic wasting disease (3, 4). Acquired prion diseases are mostly transmitted through the oral route via the ingestion of contaminated food or via contact with body fluids or feces (5). The hallmark of prion diseases is the deposition of scrapie prion protein (PrP^{Sc}), an abnormal β-sheet-rich form of the cellular prion protein (PrP^{C}), in the brain (6, 7). Two key events can be targeted to develop therapeutic strategies against transmissible spongiform encephalopathies: first, the conversion of PrP^{C} into the pathological scrapie isoform, PrP^{Sc}, which occurs through an autocatalytic process, also called prion replication (8); second, the propagation of PrP^{Sc} from the peripheral circulation to the brain, where it accumulates and causes spongiosis and neurodegeneration (9).

The mechanisms governing prion replication and propagation are not fully elucidated, but evidence suggested that lipids play a role in prion pathogenesis. First, the autocatalytic conversion of the transmembrane protein, PrP^{C}, into PrP^{Sc} seems to occur in cholesterol-enriched membrane domains called lipid rafts (10, 11). Phospholipids

This study was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021-LipSTIC. Additional support was provided by a fellowship from the China Scholarship Council under the PHC CAI YUANPEI 2014-16 project number 32106RD to Y.W.

✤***Author's Choice***—*Final version free via Creative Commons CC-BY license.*

Manuscript received 7 December 2016 and in revised form 28 July 2017.

Published, JLR Papers in Press, August 1, 2017
DOI https://doi.org/10.1194/jlr.M073718

Abbreviations: CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; dpi, days postinjection; ic, intracerebral; ip, intraperitoneal; PET, paraffin-embedded tissue; PK, proteinase K; PLTP, phospholipid transfer protein; PrP^{C}, cellular prion protein; PrP^{Sc}, scrapie prion protein.

[1] To whom correspondence should be addressed.
e-mail: veronique.perrier@univ-montp2.fr (V.P.);
catherine.desrumaux@univ-montp2.fr (C.D.)

[S] The online version of this article (available at http://www.jlr.org) contains a supplement.

Copyright © 2017 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at http://www.jlr.org

also act as cofactors of the prion conversion process (12, 13). Regarding prion transport, Safar et al. (14) used a capture-affinity assay to demonstrate that PrP^{Sc} in brain homogenates from CJD patients associates with VLDLs and LDLs, but not with HDLs. This association appears to be mediated by a specific interaction between PrP and apoB, the main protein component of VLDL and LDL particles. These in vitro findings suggest that lipoproteins act as transporters of the prion protein in the peripheral circulation (14).

To establish the in vivo relevance of these observations, we used an established mouse model of dyslipidemia, i.e., phospholipid transfer protein (PLTP)-deficient mice. PLTP is a multifunctional extracellular lipid transport protein involved in lipoprotein metabolism (15–17). PLTP plays a major role in the metabolism of HDLs (18, 19), as well as in the assembly and secretion of apoB-containing lipoproteins in the liver (20) and gut (21). Genetically engineered mice with PLTP deficiency ($PLTP^{-/-}$) constitute a highly relevant model to study the implication of circulating lipids in prion diseases because they display a marked decrease in plasma cholesterol levels and are highly responsive to hypercholesterolizing diets (19, 22). In addition, by contrast with the LDL receptor-deficient or the apoE-deficient mouse models, PLTP deficiency does not modify the uptake of lipids in peripheral cells, which is a prerequisite to address the impact of lipoproteins on prion transport.

We aimed to determine whether manipulation of plasma cholesterol levels in $PLTP^{-/-}$ mice could modulate prion infectivity. Our results showed that $PLTP^{-/-}$ mice fed a standard chow diet exhibited prolonged survival after peripheral prion inoculation due to the slowing down of PrP^{Sc} amyloid deposition and decreased spongiosis in the brain. Remarkably, feeding $PLTP^{-/-}$ mice with a lipid-enriched diet led to a substantial increase in plasma cholesterol and a concomitant reduction in the incubation time after prion inoculation, with more PrP^{Sc} amyloid deposits in animals' brains. Thus, our data provide the first in vivo evidence of the role of circulating cholesterol levels in prion propagation and suggest that therapeutic strategies aiming at lowering cholesterol levels in plasma might delay disease progression in affected patients.

MATERIALS AND METHODS

Animals and ethics statement

PLTP knockout ($PLTP^{-/-}$) and age-matched WT C57BL/6 female mice were used in this study. $PLTP^{-/-}$ mice were provided by Dr. X. C. Jiang (Columbia University, New York) (19). The mice (4–6 weeks old) were housed in an A3/L3 biosafety facility, had free access to water and food, and were fed either a standard chow diet (A03) or a Western-type diet (U8958 version 52) (SAFE Diets).

This project follows the specific French guidelines on animal experimentation and well-being and was approved by the Animal Care and Use Committee Languedoc-Roussillon (Nr. CEEA-LR-12097).

Biological reagents and antibodies

Pefabloc and proteinase K (PK) were from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The protein assay kit (BCA) was from Pierce (Thermo Fisher Scientific, Saint Herblain, France). For immunoblotting analyses, we used an anti-prion antibody called SAF84, from SpiBio (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France). This antibody recognizes the epitope 161-170 of the PrP proteins. Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). All other chemicals were from Sigma (Paris, France).

Prion inoculations

In the first set of experiments, 5 μl of 1% brain homogenate infected with 22L prion strain was inoculated by intracerebral (ic) route into the striatum of $PLTP^{-/-}$ (n = 9) and WT (n = 10) female mice using a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, CA) and the following coordinates: L, 2.0 mm; R, 0 mm; and P, −3.0 mm (23, 24). For control female mice (n = 10), either $PLTP^{-/-}$ or WT, 5 μl of PBS was inoculated in the striatum using the same method and coordinates. In parallel, transgenic $PLTP^{-/-}$ (n = 5) and WT (n = 5) female mice were intraperitoneally inoculated with 150 μl of 1% brain homogenate infected with 22L prion strain. Control female mice (n = 10), either $PLTP^{-/-}$ or WT, were intraperitoneally inoculated with 150 μl of PBS. Groups of five mice were housed in cages placed in a ventilated protective room. Mice were scored positive for prion disease when three signs of neurologic dysfunction were observed and when progressive deterioration (according to 16 diagnostic criteria) was apparent, as described previously (25, 26). Once clinical signs were detected, the animals were observed daily and euthanized in extremis. Their brains were removed and immediately frozen at −80°C for homogeneization or fixed in AntigenFix (Diapath, France) for immunohistochemical analysis.

In the second set of experiments, groups of $PLTP^{-/-}$ and WT female mice (n = 13 $PLTP^{-/-}$, n = 13 WT) were fed with either a standard chow diet or a Western-type cholesterol-rich diet (Safe diet U8958 version 52) for 4 weeks before being inoculated with 150 μl of 1% brain homogenate infected with the 22L prion strain by the intraperitoneal (ip) route. Then, mice were fed with their respective diets (standard chow or Western-type cholesterol-rich diet). Blood samples for lipid assays were collected by retro-orbital puncture, before (T0) and after the first 4 weeks of the specific diet (standard chow or Western-type cholesterol-rich diet). The mice were observed daily and euthanized in extremis, as described above (25, 26).

Lipid assays

Freshly drawn blood samples from nonfasted animals were centrifuged at 6,000 *g* for 15 min (4°C). Plasma was collected and kept at −80°C. Total cholesterol and triglycerides were assayed in plasma samples using commercial kits from Diasys (Condom, France); HDL cholesterol was measured using a commercial kit and an Indiko analyzer, both from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

Immunohistochemistry

Brain tissues were fixed in AntigenFix solution (Diapath, France) for 24 h. Then, they were decontaminated for 30 min in formic acid solution according to the protocol described by Andréoletti et al. (27) and stored in 100 mM phosphate buffer at pH 7.4 with 0.02% sodium azide. Samples were dehydrated in graded ethanol, cleared in cedar oil, and embedded in paraffin. Frontal 6 μm sections were cut using a microtome and mounted on Superfrost Plus slides (Microm France, Francheville). Sections were dewaxed and stained with hematoxylin and eosin, as described previously (24). Immunolabeling with anti-GFAP antibodies (1:500;

Dako, Les Ulis, France) was performed according to the instructions provided with the Strept ABC Complex kit (Vector Laboratories). Labeling was visualized using 3-3′-diaminobenzidine chromogen solution (Sigma, France). Immunolabeling with anti-Iba-1 antibodies (1:500; Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) was done after an antigen retrieval step processed by heating glass slides to 100°C in a decloaking chamber (Biocare Medical, Pacheco) for 30 min in citrate buffer (pH 6). The labeling with Iba-1 was then performed as described above using the Strept ABC Complex kit. For paraffin-embedded tissue (PET) blots, 6 μm frontal sections were cut using a microtome and placed onto nitrocellulose membrane. After drying at 50°C for 48 h, sections were dewaxed, digested with 25 μg/ml PK at 56°C overnight and then denatured with 3 M guanidine thiocyanate for 10 min. Membranes were blocked with casein for 30 min. The SAF84 antibody was used to label PrP^{Sc} and the Vectastain ABC-AmP kit (Vector Laboratories) was used to reveal antibody binding. Tissue analysis was performed on several animals (two to three per group, except for asymptomatic animals). For GFAP and Iba-1 immunolabelings, several tissues sections (n = 3–9) were analyzed per group of animals. GFAP-positive cells were quantified by measuring the intensity of the labeling once the background was subtracted, using the Fiji software (2.0 version 2.0; National Institutes of Health, Bethesda, MD) (28). A global threshold was applied to the image for intensity measurement. The values are expressed as mean ± SEM and normalized by surface unit in square millimeters. Iba-1-positive cells were counted using the Fiji software and expressed as mean cell number ± SEM and normalized by surface unit in square millimeters.

Immunoblotting

Western blot analyses were performed as described previously (29). Briefly, brain tissues were homogenized in 10% (w/v) PBS using microbead-containing tubes and a Ribolyser apparatus (Bio-Rad). Samples were shaken for 45 s and the supernatant was collected through an insulin syringe to obtain a homogeneous suspension. Protein concentrations were measured in each sample using a BCA test (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and normalized to have an equivalent level of proteins in each sample before PK digestion test. Fifty microliters of brain homogenates were diluted in 450 μl of PBS with 2% sarcosyl and digested with 20 μg/ml of PK for 1 h at 37°C. The reaction was stopped with 50 μl of Complete Mini (Roche, Switzerland) and 50 μl of each sample were mixed with an equal volume of 2× loading buffer and boiled for 5 min. Thirty microliters were then loaded onto 12% SDS-PAGE precast Criterion gels (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette) and analyzed by Western blotting, as described previously (29). PrP^{Sc} was detected with the SAF84 mouse monoclonal antibody, as described previously (24).

Cytokine assays

Interleukin (IL)-6, IL-1β, and TNF-α were assayed in brain homogenates using ELISA Ready-SET-Go kits from eBiosciences (San Diego, CA) and data were normalized to total protein concentrations.

Software and statistical analyses

Kaplan-Meier survival curves were done using the GraphPad Prism software (La Jolla, CA). Animals inoculated by ip route and fed the chow diet (first and second set of experiments) were analyzed as a single group. The difference between curves was tested using the nonparametric Mantel-Cox test, with a probability of 0.05 defined as a significant difference. Survival times are expressed as median values and lipid levels are expressed as mean ± SEM. The statistical significance of differences between data means was determined with a Student's *t*-test or a two-way ANOVA analysis, as appropriate.

RESULTS

Plasma lipid profiles in $PLTP^{-/-}$ and WT mice fed a standard diet

Prior to prion inoculation, cholesterol and triglyceride levels were measured in the plasma of $PLTP^{-/-}$ and WT mice fed a standard diet. As previously reported (18, 19, 30), $PLTP^{-/-}$ mice showed abnormal lipid levels in plasma, with a significantly lower total cholesterol concentration (0.72 ± 0.09 g/l vs. 1.01 ± 0.06 g/l in WT mice, $P < 0.01$) (**Fig. 1**, left panel) and a significantly higher triglyceride concentration (1.00 ± 0.09 g/l vs. 0.72 ± 0.05 g/l in WT mice, $P < 0.05$, Student's *t*-test) (Fig. 1, right panel) compared with WT animals.

Survival of chow diet-fed $PLTP^{-/-}$ and WT mice after ic or ip inoculation with prions

Because $PLTP^{-/-}$ mice exhibit reduced cholesterol levels in plasma, but no difference in cholesterol levels in the brain (19, 31, 32), we chose to evaluate the impact of PLTP deficiency on prion propagation using two different routes of administration, i.e., ic and ip. Control animals, which had been inoculated with PBS, remained healthy during the whole experiment. As shown in **Fig. 2**, WT and $PLTP^{-/-}$ mice inoculated with the 22L prion strain through the ic route had comparable survival curves [median survival: 158 days postinjection (dpi) for WT mice vs. 162 dpi for $PLTP^{-/-}$ mice, NS, Log-rank (Mantel-Cox) test] (Fig. 2A, B). In contrast, survival in the $PLTP^{-/-}$ group challenged with prion by the ip route was significantly longer than that in their WT counterparts [median survival time, 218 dpi for WT mice vs. 231 dpi for $PLTP^{-/-}$ mice, $P < 0.05$, Log-rank (Mantel-Cox) test] (Fig. 2C, D).

Impact of a Western diet on plasma lipid profiles in WT and $PLTP^{-/-}$ mice

Because the reduced levels of cholesterol in $PLTP^{-/-}$ mice were associated with prolonged survival after ip prion inoculation, we hypothesized that elevating plasma

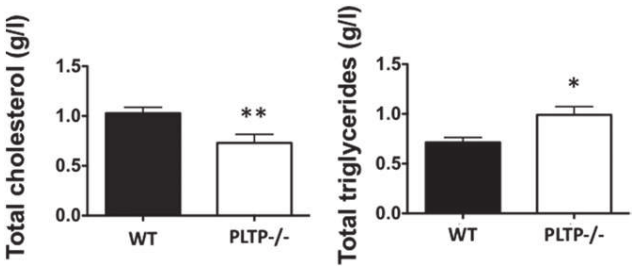


Fig. 1. $PLTP^{-/-}$ mice present a 30% decrease in plasma cholesterol compared with WT animals. Total cholesterol and triglycerides were assayed in plasma samples from WT (n = 8) and $PLTP^{-/-}$ mice (n = 8) before their inoculation with prions, using commercial kits from Diasys. Results are expressed in grams per liter and correspond to mean ± SEM. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, Student's *t*-test.

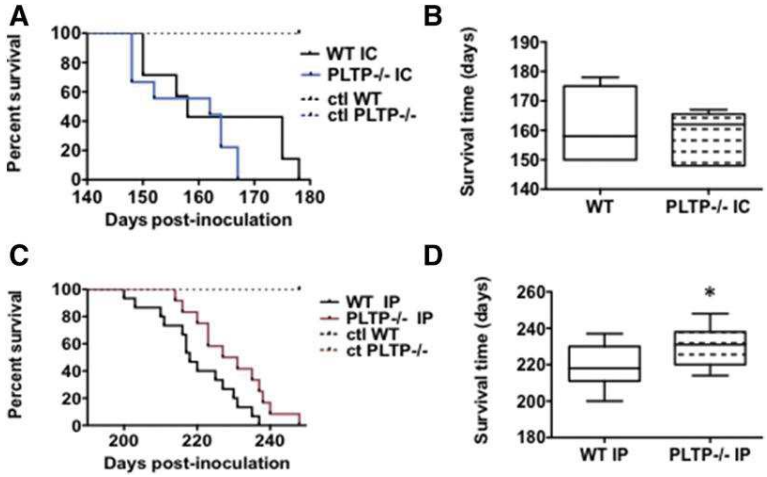


Fig. 2. PLTP$^{-/-}$ mice challenged intraperitoneally with prions exhibited prolonged survival compared with WT counterparts. A: Kaplan-Meier survival plots of WT (in black, n = 10) and PLTP$^{-/-}$ (in blue, n = 9) mice inoculated intracerebrally with 5 μl of brain homogenate infected with 22L prion strain. In each group (WT and PLTP$^{-/-}$), five mice were inoculated with 5 μl of PBS by ic (IC) route to serve as controls (ctl). B: Box-and-whiskers representation of median survival time of plots presented in (A). The median survival time, 158 dpi for WT mice versus 162 dpi for PLTP$^{-/-}$ mice, is not statistically different [Log-rank (Mantel-Cox) test]. C: Kaplan-Meier survival plots of WT (in black, n = 15) and PLTP$^{-/-}$ (in red, n = 13) mice inoculated intraperitoneally with 150 μl of brain homogenate infected with 22L prion strain. In each group, five mice were inoculated with 150 μl of PBS by the ip route to serve as controls. D: Box-and-whiskers representation of median survival time of plots presented in (C). The median survival time, 218 dpi for WT mice versus 231 dpi for PLTP$^{-/-}$ mice, is statistically different [*$P < 0.05$, Log-rank (Mantel-Cox) test].

cholesterol levels through a specific lipid-enriched diet might facilitate prion propagation. Mice were fed either a standard chow diet or a Western-type lipid-enriched diet for 4 weeks before prion ip inoculation (**Fig. 3A**). Lipid assays were performed on plasma samples from nonfasted animals, collected before and 4 weeks after they were put on their specific diet. A nonsignificant increase in plasma total cholesterol was observed in WT animals fed the Western-type diet compared with the chow diet (1.19 ± 0.11 g/l vs. 0.98 ± 0.06 g/l, respectively); while in PLTP$^{-/-}$ mice, plasma total cholesterol raised above the normal level with a strong 135% increase in the Western diet-fed group (1.77 ± 0.13 g/l vs. 0.75 ± 0.06 g/l in the chow diet-fed group, $P < 0.001$, Student's *t*-test) (Fig. 3B). Two-way ANOVA analysis of plasma total cholesterol levels showed a statistical effect for the diet [$F(1,25) = 40.34$, $P < 0.001$] and the interaction diet × genotype [$F(1,25) = 17.85$, $P < 0.001$]. We further determined cholesterol distribution between HDL and non-HDL particles. In mice fed the standard chow diet, a dramatic 79% decrease in HDL-cholesterol, but not in non-HDL-cholesterol, was measured in PLTP$^{-/-}$ mice compared with WT mice ($P < 0.001$). In Western diet-fed animals, HDL-cholesterol levels increased in similar proportions in both WT and PLTP$^{-/-}$ mice, while non-HDL-cholesterol was markedly increased only in PLTP$^{-/-}$ mice (Fig. 3C, D).

The Western diet did not significantly modify the levels of triglycerides in WT or PLTP$^{-/-}$ mice compared with

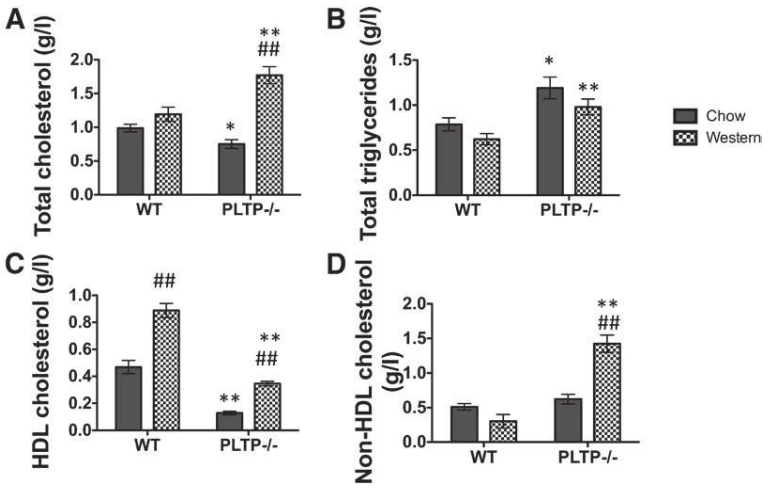


Fig. 3. Western-type cholesterol-rich diet substantially increases plasma levels of cholesterol in PLTP$^{-/-}$ mice. Total cholesterol (A), triglycerides (B), and HDL-cholesterol (C)were assayed in plasma samples from WT (n = 8) and PLTP$^{-/-}$ (n = 8) mice after they had been fed for 4 weeks either with a standard chow diet or a Western-type diet. Non-HDL cholesterol was calculated as the difference between total and HDL-cholesterol (D). Results are expressed in grams per liter and correspond to mean ± SEM (*$P < 0.05$,**$P < 0.001$ vs. WT, Student's *t*-test; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.001$ vs. chow, two-way ANOVA analysis with Bonferroni's post hoc analysis).

animals fed the chow diet. Two-way ANOVA analysis of plasma total triglyceride levels showed a statistical effect for the genotype only [$F(1,26) = 18.75$, $P < 0.001$], because the PLTP$^{-/-}$ genotype significantly increased the levels of triglycerides compared with WT animals, either on the chow or the Western-type diet.

Impact of Western-type diet on survival time in WT and PLTP$^{-/-}$ mice after ip prion inoculation

Both WT and PLTP$^{-/-}$ control animals that had been inoculated with PBS remained healthy during the whole experiment. The survival curves of WT mice were not significantly different whether the animals were fed the chow or the Western-type lipid-enriched diet (median survival, 226 dpi on the chow diet vs. 218 dpi on Western diet) (**Fig. 4A**, B). In contrast, a substantial decrease of the survival time was observed in PLTP$^{-/-}$ mice fed the Western-type diet compared with the group fed the chow diet, and the profile of the curves was well-separated [median survival time, 233 dpi with the chow diet vs. 203 dpi with the Western diet; $P < 0.002$, Log-rank (Mantel-Cox) test] (Fig. 4C, D).

Detection of the PrP^{Sc} marker by Western blot in brains of WT and PLTP$^{-/-}$ mice

After partial PK digestion to eliminate PrP^{C}, brain homogenates were subjected to Western blot analysis using the SAF84 anti-PrP antibody to detect the presence of PrP^{Sc} (29). As shown in **Fig. 5A**, no signal corresponding to PrP^{Sc} monomers was observed in homogenates from noninoculated healthy mice. The first mice that presented the typical symptoms of the disease were those fed the Western-type lipid-enriched diet. When the first PLTP$^{-/-}$ mice in this group needed to be euthanized (196 dpi), WT and PLTP$^{-/-}$ mice in the groups fed the chow diet were also euthanized on the same day (196 dpi), even though they were still asymptomatic (for Western blot and histological analysis), in order to assess prion levels in their brains. Western blot analysis revealed no detectable PrP^{Sc} in the brains of asymptomatic WT and PLTP$^{-/-}$ mice at 196 dpi (Fig. 5A). In contrast, a substantial amount of PrP^{Sc} was detected in PLTP$^{-/-}$ and WT mice fed the Western-type lipid-enriched diet and euthanized at 196 dpi and 189 dpi, respectively (Fig. 5A). Brain homogenates from mice fed either the chow or the Western-type diet and euthanized at the end-stage of the disease contained high and equivalent amounts of PrP^{Sc}, whatever their genotype (Fig. 5B for WT mice and Fig. 5C for PLTP$^{-/-}$ mice).

Histological assessment of prion propagation in brain tissue of WT and PLTP$^{-/-}$ mice

Because we did not find detectable levels of PrP^{Sc} in brain homogenates from asymptomatic WT and PLTP$^{-/-}$ mice, we further searched for the presence of the PrP^{Sc} marker and assessed its regionalization by histological analysis using the PET blot technique. A substantial difference in prion accumulation was revealed between asymptomatic PLTP$^{-/-}$ and WT mice on PET blots (**Fig. 6**). At 196 dpi, PrP^{Sc} was barely detectable in the brain of asymptomatic PLTP$^{-/-}$ mice (Fig. 6D); while in asymptomatic WT mice,

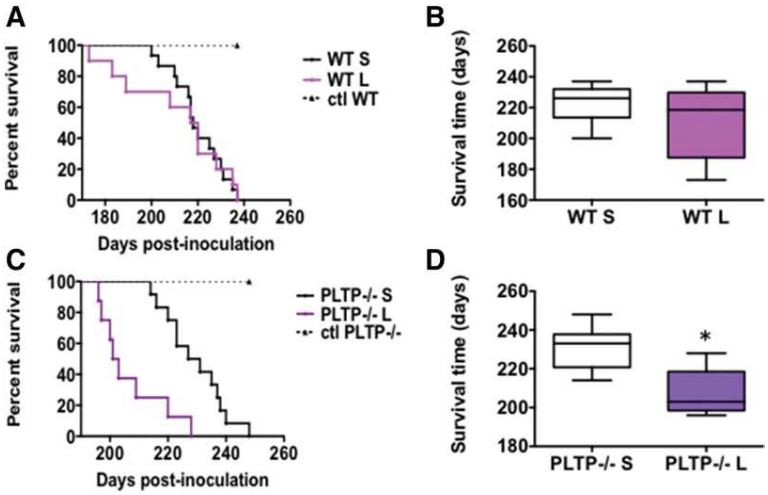


Fig. 4. Western-type cholesterol-rich diet markedly accelerates prion disease in PLTP$^{-/-}$ mice. A: Kaplan-Meier survival plots of WT mice inoculated with 150 µl of 22L prion strain by the ip route and fed with either a standard chow diet (WT S; in black, n = 15) or a Western-type cholesterol-rich diet (WT L; in pink, n = 10). In each group (WT S and WT L), five mice were inoculated with 150 µl of PBS by the ip route to serve as controls. B: Box-and-whiskers representation of median survival time of Kaplan-Meier plots presented in (A). The median survival time, 226 dpi for WT S mice versus 218 dpi for WT L mice, is not statistically different [Log-rank (Mantel-Cox) test]. C: Kaplan-Meier survival plots of PLTP$^{-/-}$ mice inoculated with 150 µl of 22L prion strain by the ip route and fed with either a standard chow diet (PLTP$^{-/-}$ S; in black, n = 13) or a Western-type cholesterol-rich diet (PLTP$^{-/-}$ L; in purple, n = 10). In each group (PLTP$^{-/-}$ S and PLTP$^{-/-}$ L), five mice were inoculated with 150 µl of PBS by the ip route to serve as controls. D: Box-and-whiskers representation of median survival time of Kaplan-Meier plots presented in (C). The median survival time, 233 dpi for PLTP$^{-/-}$ S mice versus 203 dpi for PLTP$^{-/-}$ L mice, is statistically significant (*$P < 0.05$, Mantel-Cox test).

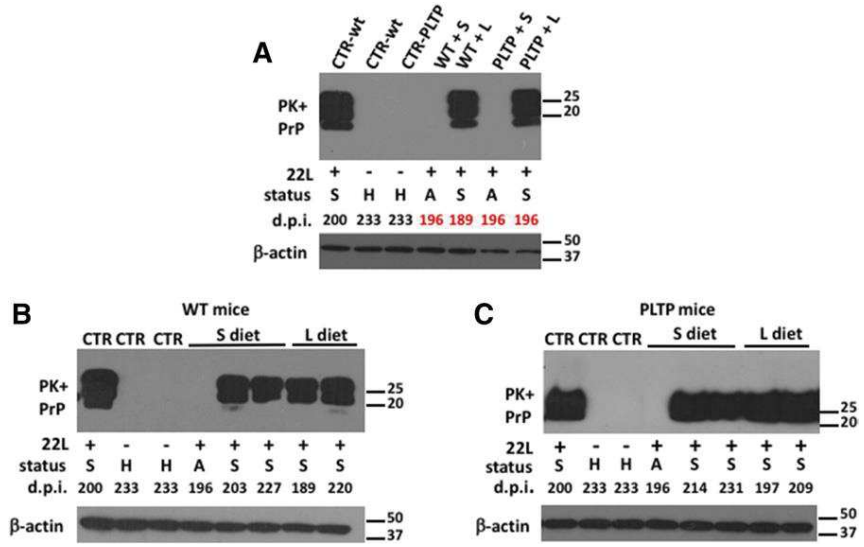


Fig. 5. Detection of the pathologic PrP^{SC} marker in brain homogenates of asymptomatic and sick mice. A–C: Brain homogenates of WT or $PLTP^{-/-}$ mice, inoculated (+) or not (−) with 22L prion strain and fed a standard chow diet (+S) or Western-type cholesterol-rich diet (+L) were analyzed by immunoblotting after PK digestion (PK+). The numbers below each panel indicate the day when the mice were euthanized (dpi). The letters below each panel (S, sick; H, healthy; A, asymptomatic) indicate the status of the mice when they were euthanized. PrP means that the immunoblots were probed with SAF84 anti-PrP antibodies. Loading control blots, performed on the identical samples before PK digestion were probed with anti-β-actin antibodies. The molecular weight markers are indicated on the right side of each immunoblot.

PrP^{Sc} deposits were observed in the thalamus and started to appear in the cortex (Fig. 6C), and in Western diet-fed sick $PLTP^{-/-}$ mice, abundant PrP^{Sc} deposits were also present in the cortex, the hippocampus, and striatal regions of the brain (Fig. 6E). Noninoculated WT and $PLTP^{-/-}$ animals did not present any PrP^{Sc} deposits in the brain (Fig. 6A, B). No difference was observed at the terminal stage of the disease (supplemental Fig. S1).

Assessment of brain inflammation in WT and $PLTP^{-/-}$ mice

In prion diseases, astrogliosis is a marker of brain inflammation consecutive to the neuroinvasion process. Differences of astrogliosis in $PLTP^{-/-}$ mice and WT animals could have an impact on animals' survival time. Thus, we performed histopathological analyses in healthy noninoculated animals as negative controls to evaluate the astrogliosis status of $PLTP^{-/-}$ mice compared with WT animals (**Fig. 7A**, B). We also assessed astrogliosis in WT and $PLTP^{-/-}$ animals after 22L prion inoculation, either at the asymptomatic (Fig. 7C, D) or terminal stage of the disease (Fig. 7E–H). Astrocytic gliosis was analyzed using anti-GFAP antibodies with colorimetric detection. Astroglial activation was barely detected in noninoculated healthy mice and no statistically significant difference was observed between WT and $PLTP^{-/-}$ animals (Fig. 7A, B). In asymptomatic mice, a higher level of reactive astrocytes was observed in WT compared with $PLTP^{-/-}$ mice (Fig. 7C, D) euthanized on the same day. This observation corroborates the PET blot analysis, showing higher PrP^{Sc} levels in WT mice than in $PLTP^{-/-}$ mice (Fig. 6C, D). This illustrates the advanced neuroinvasion process that occurred in the WT animals with a strong astrocytic gliosis in response to the prion invasion, which was not yet the case for the $PLTP^{-/-}$ mice. At the terminal stage of the disease, all groups exhibited increased levels of astrogliosis (Fig. 7E–H) compared with

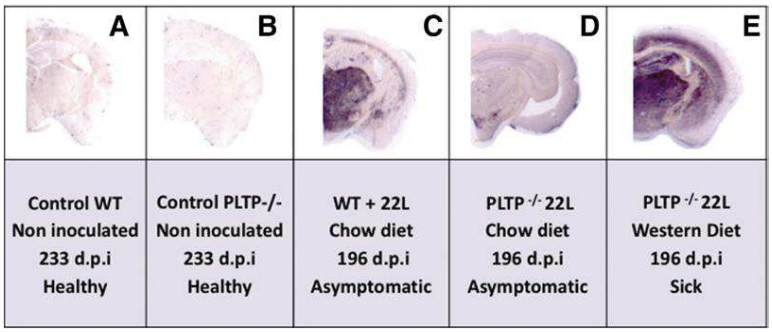


Fig. 6. The PrP^{Sc} amyloid load is substantially decreased in $PLTP^{-/-}$ mice fed a standard chow diet. A, B: PET blot analyses of frontal tissue sections of WT or $PLTP^{-/-}$ mice not inoculated with prions and euthanized at 233 days (dpi) while they were healthy. C–E: PET blot analyses of frontal tissue sections of WT or $PLTP^{-/-}$ mice inoculated with 22L prion strain, fed a standard chow diet or Western-type cholesterol-rich diet, and all euthanized on the same day (196 dpi), when they were in an asymptomatic stage (C, D) or while they were at the terminal stage of the disease (E). The SAF84 antibody was used to detect PrP^{SC} proteins and the Vectastain ABC-AmP kit (Vector Laboratories) was used to reveal antibody binding.

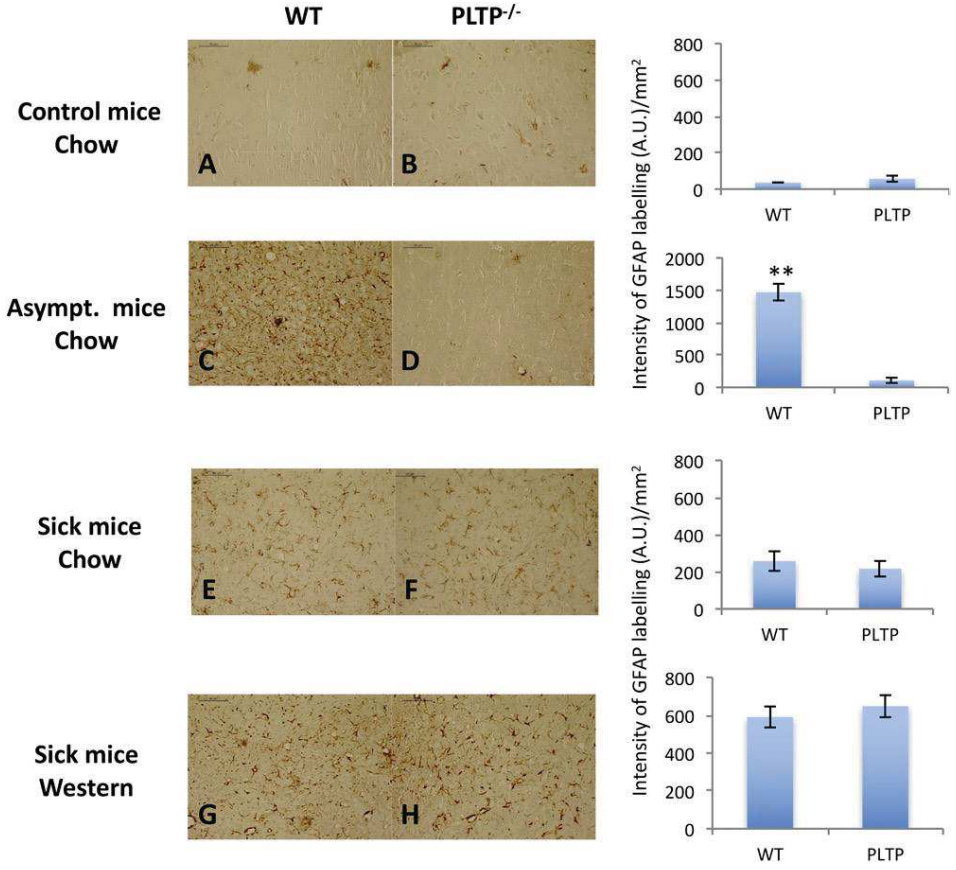


Fig. 7. Analysis of astrogliosis in brain tissue sections. A, B: Histological analyses of thalamus sections from healthy control WT and PLTP$^{-/-}$ mice not inoculated with prions. C–H: Thalamus tissue sections from WT and PLTP$^{-/-}$ mice inoculated with 22L prion strain and either euthanized while they were asymptomatic (196 dpi) (C, D) or at the terminal stage of the disease (E–H), and fed either a standard chow diet (E, F) or a Western-type cholesterol-rich diet (G, H). Tissue sections were stained using an anti-GFAP antibody to detect astrocytic gliosis, a marker of the inflammation process during prion disease. Tissue labeling was performed on several animals (two to three per group, except asymptomatic mice) and the selected images (enlargement ×20) are representative of the staining observed in each group. The intensity of the GFAP labeling was used to quantify the number of GFAP-positive cells and is expressed as mean intensity ± SEM (arbitrary units per square millimeter). Student's *t*-test was used for statistical data analyses (**$P < 0.01$).

noninoculated animals, which is a typical feature of prion sick animals, as described previously (24). The astrogliosis levels were equivalent between the genotypes (Student's *t*-test, $P > 0.05$) (Fig. 7E vs. Fig. 7F and Fig. 7G vs. Fig. 7H). Interestingly, one can notice that the intensity of astrogliosis was doubled (Fig. 7G, H) under the Western diet in both genotypes, compared with animals fed the chow diet (Fig. 7E, F). Altogether, these data show that both genotypes display equivalent levels of astrogliosis, thus this criterion is unlikely to be implicated in the survival time differences between WT and PLTP$^{-/-}$ animals.

We also checked the microglial response in WT and PLTP$^{-/-}$ mice (**Fig. 8**). The role of microglial cells in prion pathogenesis seems to depend on disease stage. Microglia would be neuroprotective at the early stage of the infection through their ability to clear PrP^{Sc}; however, it has been shown that once microglia numbers are upregulated during the course of the disease, they do not exhibit efficient prion clearing capacity and promote neuroinflammation (33). To decipher the role of microglia and their implication in prion survival time associated with PLTP deficiency, tissue sections were labeled with an anti-Iba-1 antibody and positive cells were counted using ImageJ. The brain tissue sections revealed a significant increase of 27% in microglial cell numbers in healthy noninoculated PLTP$^{-/-}$ mice compared with WT animals (microglial cells per square millimeter, mean ± SEM: 7,430 ± 300 vs. 5,830 ± 610 in WT, $P < 0.05$, Student's *t*-test) (Fig. 8A, B). At the terminal stage of the disease, we also observed a 35% increase of microglial cells in PLTP$^{-/-}$ mice in the chow diet-fed group (1,581 ± 68 vs. 1,171 ± 69 in WT, $P < 0.001$, Student's *t*-test) (Fig. 8E, F). The effect was even more drastic for groups fed the Western-type diet, with an increase of 58% of microglial cells in PLTP$^{-/-}$ versus WT animals (1,601 ± 55 vs. 1,016 ± 90 in WT, $P < 0.001$, Student's *t*-test) (Fig. 8G, H).

To further address the potential impact of brain inflammatory state on prion disease in WT and PLTP$^{-/-}$ mice, the prototypic pro-inflammatory cytokines, IL-6, IL-1β, and TNF-α, were assayed in brain homogenates from mice fed the standard chow or the Western diet. As shown in **Fig. 9**,

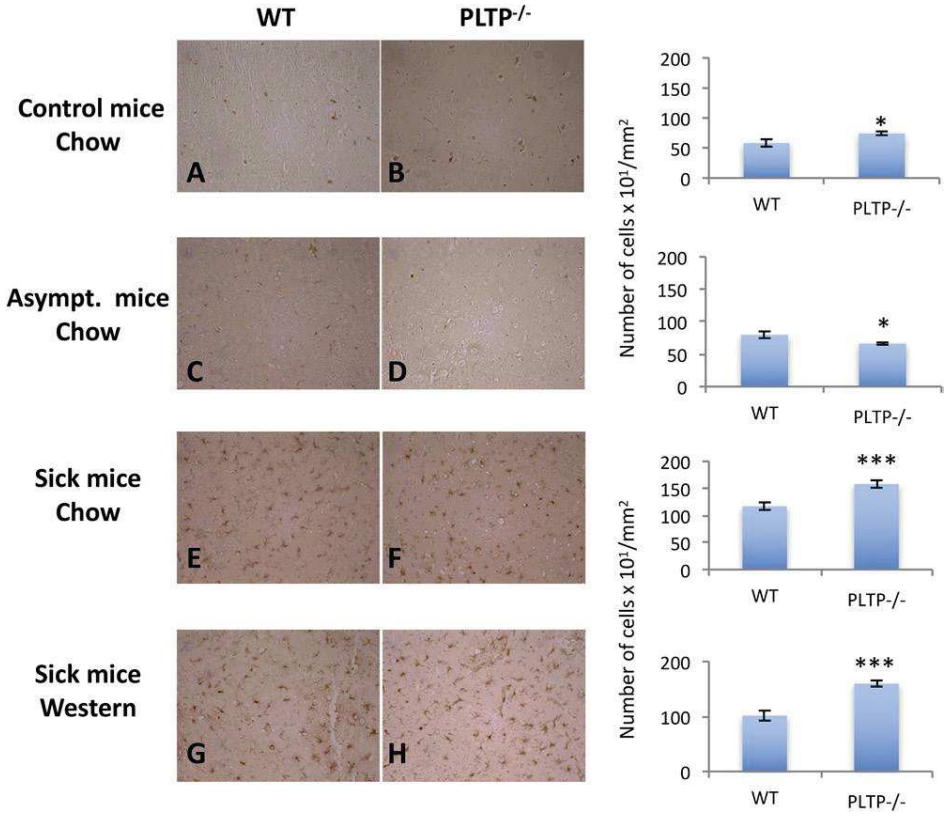


Fig. 8. Analysis of microglia in brain tissue sections. A, B: Histological analyses of thalamus sections from control WT and PLTP$^{-/-}$ mice not inoculated with prions. C–H: Thalamus tissue sections from WT and PLTP$^{-/-}$ mice inoculated with 22L prion strain and either euthanized while they were asymptomatic (196 dpi) (C, D) or at the terminal stage of the disease (E–H), and fed either a standard chow diet (E, F) or a Western-type cholesterol-rich diet (G, H). Tissue sections were stained with an anti-Iba1 antibody to detect microglia, a marker of brain inflammation during neurodegenerative disease. Tissue labeling was performed on several animals (two to three per group, except asymptomatic mice) and the selected images (enlargement ×40) are representative of the staining observed in each group. Quantification of Iba-1-positive cells is expressed as the mean ± SEM of the number of cells per square millimeter. Student's *t*-test was used for statistical data analyses (*P<0.05, ***P< 0.001).

in mice fed the standard chow diet, IL-6 and IL-1β levels were mildly, but not significantly, decreased in PLTP$^{-/-}$ mouse brains compared with WT, while a significant 27% decrease was measured for TNF-α ($P < 0.05$). Upon Western diet feeding, IL-6 and IL-1β levels were markedly increased in WT mouse brains (+76% and +89%, respectively, $P < 0.05$), while they remained constant in PLTP-deficient tissue. In a similar way, TNF-α levels increased by 45% in WT mouse brains (NS) and remained constant in PLTP-deficient mouse brains.

Histological assessment of spongiosis in the brain tissue of WT and PLTP$^{-/-}$ mice

Hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded tissue sections was performed to assess spongiosis in the tissue. Spongiosis is another marker of prion diseases, reflecting the neuronal loss by the presence of numerous white and round vacuoles in the brain of sick animals. As expected, no spongiosis was observed in noninoculated healthy mice (supplemental Fig. S2A, B). In mice euthanized while they were still asymptomatic, very few small vacuoles were observed in tissue sections from both WT and PLTP$^{-/-}$ animals (supplemental Fig. S2C, D). In contrast, extensive tissue spongiosis was present in all groups euthanized at the terminal stage of the disease and presenting classical prion symptoms (supplemental Fig. S2E–H).

DISCUSSION

Most animal and acquired human prion diseases are mainly due to oral or peripheral contamination (5). Thus, understanding the molecular mechanisms involved in prion propagation could lead to the identification of new markers or key steps in the disease process that might help to prevent prion agents from propagating to and replicating in the brain. Several routes of transmissible spongiform encephalopathy propagation from the peripheral system to the CNS have been identified. One of them is by spreading in a retrograde direction along efferent fibers of both sympathetic and parasympathetic nerves (34, 35). In parallel,

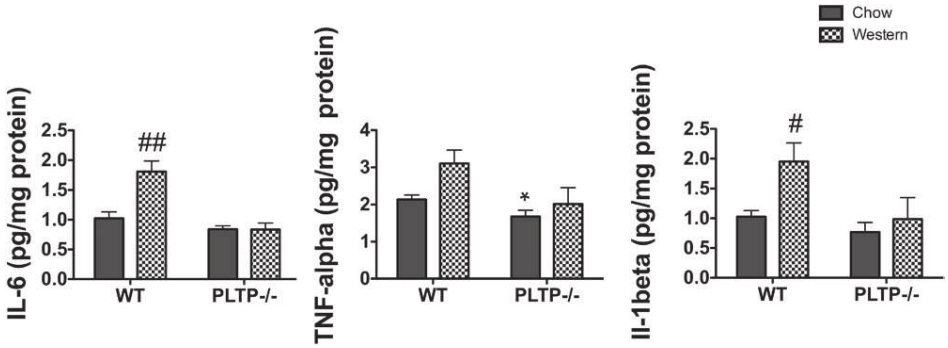


Fig. 9. Cytokine levels in WT and PLTP$^{-/-}$ mouse brains fed a standard chow diet or a Western-type diet. IL-6, TNF-α, and IL-1β were assayed in brain homogenates from WT and PLTP$^{-/-}$ mice (n = 7–10) after they had been fed for 4 weeks either with a standard chow diet or a Western-type cholesterol-rich diet. Results correspond to mean ± SEM (*$P < 0.05$ vs. WT, Student's *t*-test; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.001$ vs. chow, two-way ANOVA analysis with Bonferroni's post hoc analysis).

the neuroinvasion process can also occur through the bloodstream, independently of the peripheral nervous system (36, 37). Experimental transmission studies conducted in ovines and primates indicated that 30% of prion infectivity is associated with white blood cells and 50% with the plasma fraction, while total blood remains the most infectious (38, 39). In 2004, with the appearance of variant CJD cases through contaminated blood transfusion, this mode of transmission was demonstrated in humans (40, 41). The identification of the macromolecules implicated in prion transport via the bloodstream is a challenge for the development of therapeutic strategies. Interestingly, at the time when the blood-mediated transmission route was demonstrated, in vitro studies published by Safar et al. (14) indicated a high binding affinity of the PrP^{Sc} with apoB-containing lipoproteins, i.e., the main carriers of cholesterol in human blood. Thus, our aim was to determine the pathophysiological relevance of these findings and to address the role of circulating cholesterol-containing lipoproteins in the pathogenicity of prions in vivo. We took advantage of the PLTP-deficient mouse model. As described earlier, PLTP deficiency in mice is associated with a marked decrease in HDL-cholesterol levels, due to hypercatabolism and defective production of apoB-containing lipoprotein particles by the liver and intestine (18–20), which together contribute to abnormally low circulating cholesterol concentrations (Fig. 1); in contrast, cholesterol contents of peripheral tissues, including the brain, remain unaffected by PLTP deficiency (19, 20, 31, 32).

We showed that the PLTP-deficient trait was associated with significantly prolonged survival after ip inoculation of the 22L prion strain (Fig. 2C). It was accompanied by a reduction in the rate of accumulation of PrP^{Sc} aggregates in brain tissue (Figs. 5, 6). Moreover, and in support of a direct cause-effect relationship between high plasma cholesterol concentrations and accumulation of PrP^{Sc} aggregates, increasing circulating cholesterol levels by the means of dietary manipulation produced a significant reduction in survival times in PLTP$^{-/-}$ mice, as well as a marked increase in the accumulation rate of PrP^{Sc} deposits in their brains (Figs. 4C, 6D, E). The relationship between circulating cholesterol levels and prion propagation is further reinforced by the fact that, in WT mice, the lipid-enriched diet did not lead to a significant rise in circulating cholesterol levels, as these mice have better regulation of cholesterol metabolism, and no statistically significant difference was observed in survival times (Fig. 4A). To address the question of whether all lipoprotein particles or only a specific subpopulation of them contribute to prion transport,wemeasuredplasmaHDL-cholesterolandnon-HDL-cholesterol levels. In mice fed the standard chow diet, a dramatic 79% decrease in HDL-cholesterol, but not in non-HDL-cholesterol, was measured in PLTP-deficient mice compared with WT mice (Fig. 3C), suggesting that, in the context of standard diet feeding, HDL-containing lipoproteins play a key role in peripheral prion transport and propagation to the brain in our mouse model. In Western diet-fed animals, in agreement with previous reports (42), HDL-cholesterol levels increased in similar proportions in both WT and PLTP$^{-/-}$ mice, while non-HDL-cholesterol was markedly increased only in PLTP$^{-/-}$ mice (Fig. 3D); because PLTP is known to play a major role in lipid transfers from non-HDL to HDL particles during the postprandial state (15), this discrepancy most probably relies on the inefficient clearance of non-HDL particles in PLTP-deficient animals. The marked decrease in PLTP$^{-/-}$ mouse survival in the Western diet-fed group compared with the chow diet-fed group suggests that non-HDL-containing lipoproteins play a critical role in prion transport, which is in good agreement with the data reported by Safar et al. (14) showing that PrP^{Sc} in sporadic CJD patients associates with VLDLs and LDLs.

Taken together, our data show that both HDL and non-HDL particles can act as transporters for PrP^{Sc} molecules, but only total plasma cholesterol can be used to evaluate the extent of prion propagation from the periphery to the brain, and predict survival time. In contrast to cholesterol, triglycerides were unlikely to affect prion propagation because they were not statistically modified by the lipid-enriched diet, whatever the genotype of the mice (Fig. 3B).

It is noteworthy that due to reduced circulating levels of cholesterol-containing lipoproteins in PLTP$^{-/-}$ mice, the prion protein is less efficiently transported to the brain and may be more rapidly cleared from the blood by mononuclear phagocytes (dendritic cells and macrophages) (9).

Membrane cholesterol also plays an important role in prion conversion. The structure and integrity of lipid rafts, i.e., membrane domains enriched in cholesterol and sphingomyelin, are essential for the conversion of PrP^{C} into PrP^{Sc} (10, 11). Moreover, raft disruption through cholesterol depletion decreases PrP^{Sc} formation (43–46). In our PLTP-deficient mouse model, brain cholesterol levels, in contrast to circulating cholesterol levels, were not modified (31, 32) and, accordingly, when WT and PLTP$^{-/-}$ mice were inoculated with prions by the ic route, no difference in their survival time was observed (Fig. 2A).

Besides cholesterol lowering, PLTP deficiency is associated with a low inflammatory state in the periphery (47–50) that may also play a role in the observed effect on prion pathogenesis. Regarding brain inflammation, no data have been reported so far. In the present study, while the survival time was clearly reduced in PLTP$^{-/-}$ mice compared with WT mice under the chow diet, brain astrogliosis (as assessed by GFAP labeling) was similar in both genotypes either in control noninoculated animals or at the terminal stage of the disease, whatever the diet (Fig. 7A, B, E–H). Thus, this criterion is unlikely to be implicated in the survival time differences between WT and PLTP$^{-/-}$ animals. It is worthy of note that at the beginning of the neuroinvasion process, a strong astrogliosis occurs to protect neurons against prions (as observed in WT asymptomatic mice, Fig. 7C). However, at the terminal stage of the disease, when prion propagation is completed, less astrogliosis is observed because astrocytes are dying due to the appearance of numerous PrP^{Sc} deposits and brain spongiosis that are detrimental to them (Fig. 7E).

We also checked the microglia response (Fig. 8) in WT and PLTP$^{-/-}$ mice. The role of microglial cells in prion pathogenesis seems to depend on disease stage. Microglia seem to be neuroprotective at the early stage of the infection through their ability to clear PrP^{Sc}; however, it has been shown that once microglia numbers are upregulated during the course of the disease, they do not exhibit efficient prion clearing capacity and promote neuroinflammation (33). The brain tissue sections revealed a significant increase in microglial cell numbers in healthy noninoculated PLTP-deficient mice compared with WT mice. The same observation was made at the terminal stage of the disease, whether the mice were fed the standard chow diet or the Western diet. Because microglial cells are able to clear PrP^{Sc} at the early stage of the disease and can have a neuroprotective role (33), we would have expected that a basal increase of 27% in PLTP$^{-/-}$ mice would lead to higher survival time of animals intracerebrally challenged with prions. However, it was not the case (Fig. 2). By opposition, if microglia had promoted a deleterious neuro-inflammatory response under our experimental conditions, then we should have observed a decrease rather than an increase in the survival time of PLTP$^{-/-}$ mice fed the standard chow diet. For these reasons, it seems very unlikely that microglial cell numbers are related to survival times in our study.

To further address the potential impact of brain inflammatory state on prion disease, the prototypic pro-inflammatory cytokines, IL-6, IL-1β, and TNF-α, were assayed in brain homogenates from WT and PLTP$^{-/-}$ mice fed the standard chow or the Western diet. The levels of all three cytokines remained unchanged in PLTP$^{-/-}$ mice fed either with the standard chow or the Western diet, despite a significant reduction of their survival time; in WT mice, a strong increase in brain cytokines occurred in the Western diet-fed group, although their survival time remained unchanged; taken together, these data argue against a role of brain cytokine levels in prion propagation in our model.

Altogether, the results of the present study strongly support key participation of circulating cholesterol-rich lipoproteins in the propagation of prion agents from the peripheral system to the brain. PLTP$^{-/-}$ mice exhibit prolonged survival compared with WT animals, but this phenotype is reversed when animals are fed a hypercholesterolizing diet. Our study suggests that targeting circulating cholesterol may be a relevant therapeutic strategy. In previous studies, mice treated with the cholesterol-lowering drug, simvastatin, exhibited a substantial increase in their survival time (51, 52). However, the authors suggested that it might be linked to pleiotropic effects of statins, especially their immunomodulatory and anti-inflammatory properties. Although no data on plasma cholesterol are available in the above-mentioned studies, the increased survival time of simvastatin-treated mice might be explained, in part, by a reduction of plasma cholesterol level (53), as observed in our PLTP$^{-/-}$ mice.

CONCLUSIONS

Our results suggest that the circulating cholesterol level is a determinant of prion propagation in vivo and combining strategies to lower circulating cholesterol and restore cellular cholesterol homeostasis with inhibitors of cholesterol esterification enzymes could be a successful approach to treat prion diseases.

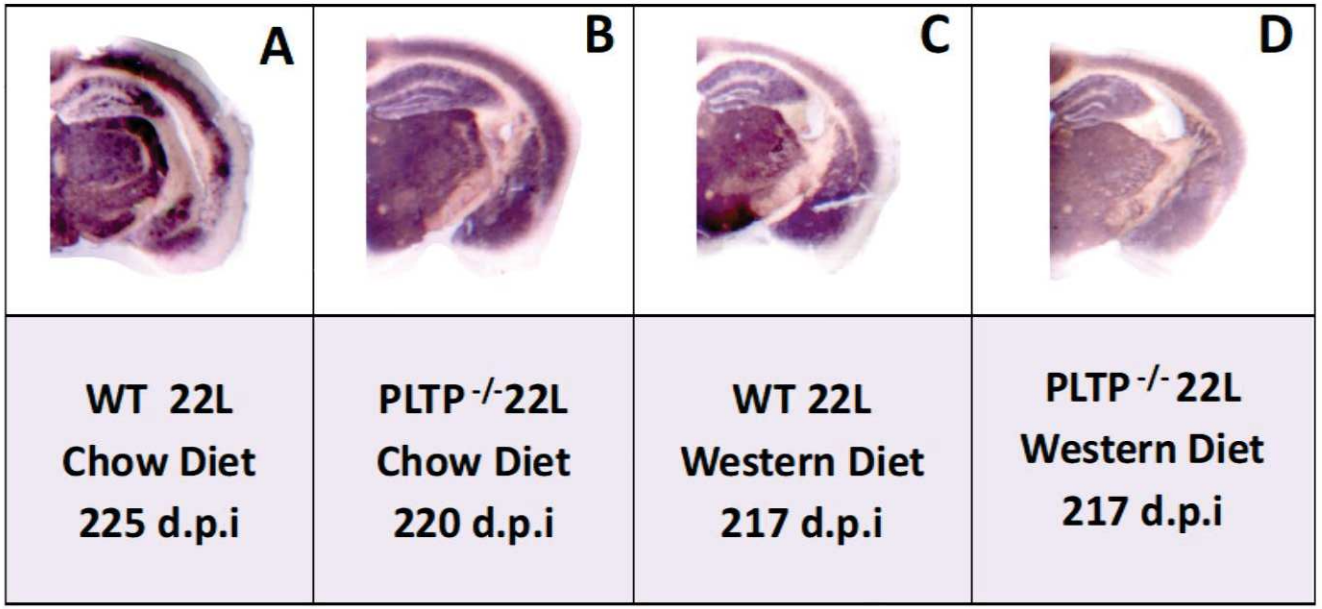
The authors are very grateful to Pr. Jean-Michel Verdier for his support and to Philip Bastable for editing this article. Tiffany Lihoreau and Mathieu Vitalis are acknowledged for their technical assistance.

REFERENCES

1. Prusiner, S. B., M. R. Scott, S. J. DeArmond, and F. E. Cohen. 1998. Prion protein biology. *Cell.* **93:** 337–348.
2. Colby, D. W., and S. B. Prusiner. 2011. Prions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3:** a006833.
3. Kovacs, G. G., and H. Budka. 2009. Molecular pathology of human prion diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **10:** 976–999.
4. Jennelle, C. S., V. Henaux, G. Wasserberg, B. Thiagarajan, R. E. Rolley, and M. D. Samuel. 2014. Transmission of chronic wasting disease in Wisconsin white-tailed deer: implications for disease spread and management. *PLoS One.* **9:** e91043.

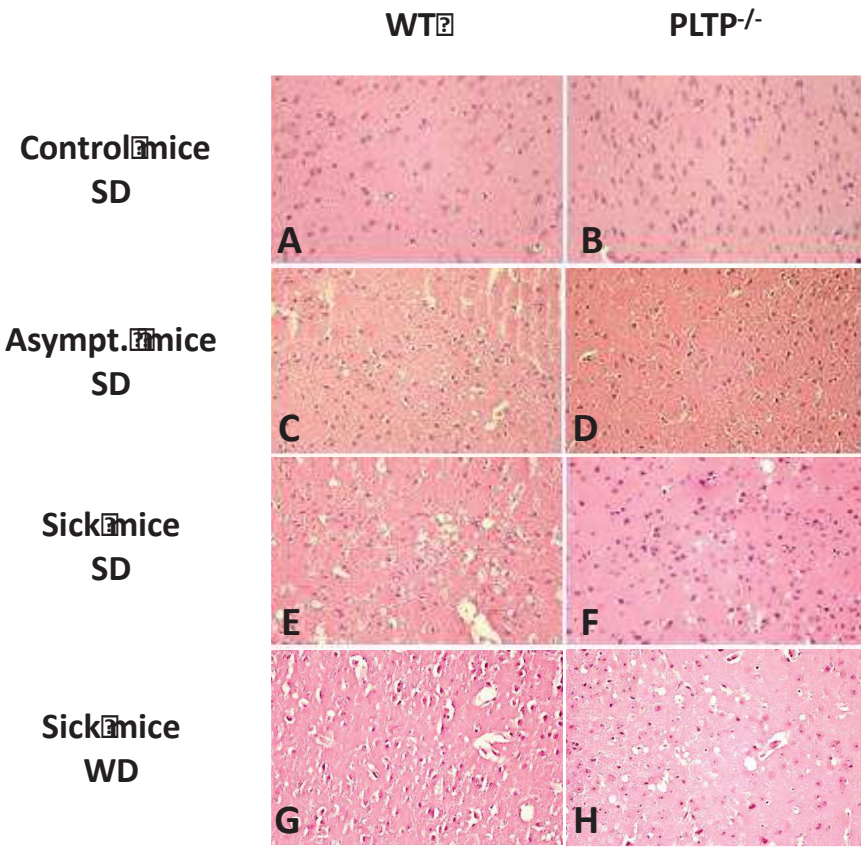
5. Haïk, S., and J-P. Brandel. 2014. Infectious prion diseases in humans: cannibalism, iatrogenicity and zoonoses. *Infect. Genet. Evol.* **26:** 303–312.
6. Caughey, B. W., A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes, and W. S. Caughey. 1991. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry.* **30:** 7672–7680.
7. Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, and F. E. Cohen. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90:** 10962–10966.
8. Aguzzi, A., C. Sigurdson, and M. Heikenwaelder. 2008. Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **3:** 11–40.
9. Mabbott, N. A., and B. M. Bradford. 2015. The good, the bad, and the ugly of dendritic cells during prion disease. *J. Immunol. Res.* **2015:** 168574.
10. Vey, M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S. J. DeArmond, E. J. Smart, R. G. Anderson, A. Taraboulos, and S. B. Prusiner. 1996. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93:** 14945–14949.
11. Pinheiro, T. J. T. 2006. The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. *Chem. Phys. Lipids.* **141:** 66–71.
12. Deleault, N. R., J. R. Piro, D. J. Walsh, F. Wang, J. Ma, J. C. Geoghegan, and S. Supattapone. 2012. Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109:** 8546–8551.
13. Tsiroulnikov, K., Y. Shchutskaya, V. Muronetz, J-M. Chobert, and T. Haertlé. 2009. Phospholipids influence the aggregation of recombinant ovine prions. From rapid extensive aggregation to amyloidogenic conversion. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794:** 506–511.
14. Safar, J. G., H. Wille, M. D. Geschwind, C. Deering, D. Latawiec, A. Serban, D. J. King, G. Legname, K. H. Weisgraber, R. W. Mahley, et al. 2006. Human prions and plasma lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103:** 11312–11317.
15. Jiang, X-C., W. Jin, and M. M. Hussain. 2012. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on lipoprotein metabolism. *Nutr. Metab. (Lond).* **9:** 75.
16. Albers, J. J., S. Vuletic, and M. C. Cheung. 2012. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1821:** 345–357.
17. Tzotzas, T., C. Desrumaux, and L. Lagrost. 2009. Plasma phospholipid transfer protein (PLTP): review of an emerging cardiometabolic risk factor. *Obes. Rev.* **10:** 403–411.
18. Qin, S., K. Kawano, C. Bruce, M. Lin, C. Bisgaier, A. R. Tall, and X. Jiang. 2000. Phospholipid transfer protein gene knock-out mice have low high density lipoprotein levels, due to hypercatabolism, and accumulate apoA-IV-rich lamellar lipoproteins. *J. Lipid Res.* **41:** 269–276.
19. Jiang, X. C., C. Bruce, J. Mar, M. Lin, Y. Ji, O. L. Francone, and A. R. Tall. 1999. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J. Clin. Invest.* **103:** 907–914.
20. Jiang, X-C., Z. Li, R. Liu, X. P. Yang, M. Pan, L. Lagrost, E. A. Fisher, and K. J. Williams. 2005. Phospholipid transfer protein deficiency impairs apolipoprotein-B secretion from hepatocytes by stimulating a proteolytic pathway through a relative deficiency of vitamin E and an increase in intracellular oxidants. *J. Biol. Chem.* **280:** 18336–18340.
21. Liu, R., J. Iqbal, C. Yeang, D. Q-H. Wang, M. M. Hussain, and X-C. Jiang. 2007. Phospholipid transfer protein-deficient mice absorb less cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27:** 2014–2021.
22. Yeang, C., S. Qin, K. Chen, D. Q-H. Wang, and X-C. Jiang. 2010. Diet-induced lipid accumulation in phospholipid transfer protein-deficient mice: its atherogenicity and potential mechanism. *J. Lipid Res.* **51:** 2993–3002.
23. Paxinos, G., and K. Franklin. 2012. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th edition. Academic Press, Cambridge, MA.
24. Imberdis, T., A. Ayrolles-Torro, A. Duarte Rodrigues, J. Torrent, M. T. Alvarez-Martinez, G. G. Kovacs, J-M. Verdier, M. Robitzer, and V. Perrier. 2016. A fluorescent oligothiophene-bis-triazine ligand interacts with PrP fibrils and detects SDS-resistant oligomers in human prion diseases. *Mol. Neurodegener.* **11:** 11.
25. Carlson, G. A., D. T. Kingsbury, P. A. Goodman, S. Coleman, S. T. Marshall, S. DeArmond, D. Westaway, and S. B. Prusiner. 1986. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell.* **46:** 503–511.
26. Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Wälchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond, et al. 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* **59:** 847–857.
27. Andréoletti, O. 2004. PrP^{Sc} immunohistochemistry. *In* Techniques in Prion Research. S. Lehmann and J. Grassi, editors. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 82–96.
28. Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* **9:** 676–682.
29. Ayrolles-Torro, A., T. Imberdis, J. Torrent, K. Toupet, I. V. Baskakov, G. Poncet-Montange, C. Gregoire, F. Roquet-Baneres, S. Lehmann, D. Rognan, et al. 2011. Oligomeric-induced activity by thienyl pyrimidine compounds traps prion infectivity. *J. Neurosci.* **31:** 14882–14892.
30. Kawano, K., S. Qin, C. Vieu, X. Collet, and X-C. Jiang. 2002. Role of hepatic lipase and scavenger receptor BI in clearing phospholipid/free cholesterol-rich lipoproteins in PLTP-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta.* **1583:** 133–140.
31. Desrumaux, C., P-Y. Risold, H. Schroeder, V. Deckert, D. Masson, A. Athias, H. Laplanche, N. Le Guern, D. Blache, X-C. Jiang, et al. 2005. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB J.* **19:** 296–297.
32. Desrumaux, C., A. Pisoni, J. Meunier, V. Deckert, A. Athias, V. Perrier, V. Villard, L. Lagrost, J-M. Verdier, and T. Maurice. 2013. Increased amyloid-β peptide-induced memory deficits in phospholipid transfer protein (PLTP) gene knockout mice. *Neuropsychopharmacology.* **38:** 817–825.
33. Zhu, C., U. S. Herrmann, J. Falsig, I. Abakumova, M. Nuvolone, P. Schwarz, K. Frauenknecht, E. J. Rushing, and A. Aguzzi. 2016. A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *J. Exp. Med.* **213:** 1047–1059.
34. Mabbott, N. A., and G. G. MacPherson. 2006. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **4:** 201–211.
35. McBride, P. A., W. J. Schulz-Schaeffer, M. Donaldson, M. Bruce, H. Diringer, H. A. Kretzschmar, and M. Beekes. 2001. Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J. Virol.* **75:** 9320–9327.
36. Hunter, N., J. Foster, A. Chong, S. McCutcheon, D. Parnham, S. Eaton, C. MacKenzie, and F. Houston. 2002. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* **83:** 2897–2905.
37. Houston, F., S. McCutcheon, W. Goldmann, A. Chong, J. Foster, S. Sisó, L. González, M. Jeffrey, and N. Hunter. 2008. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood.* **112:** 4739–4745.
38. Gregori, L., N. McCombie, D. Palmer, P. Birch, S. O. Sowemimo-Coker, A. Giulivi, and R. G. Rohwer. 2004. Effectiveness of leucoreduction for removal of infectivity of transmissible spongiform encephalopathies from blood. *Lancet.* **364:** 529–531.
39. Gregori, L., B. C. Lambert, P. V. Gurgel, L. Gheorghiu, P. Edwardson, J. T. Lathrop, C. Macauley, R. G. Carbonell, S. J. Burton, D. Hammond, et al. 2006. Reduction of transmissible spongiform encephalopathy infectivity from human red blood cells with prion protein affinity ligands. *Transfusion.* **46:** 1152–1161.
40. Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. G. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie, and R. G. Will. 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet.* **363:** 417–421.
41. Peden, A. H., M. W. Head, D. L. Ritchie, J. E. Bell, and J. W. Ironside. 2004. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet.* **364:** 527–529.
42. Escolà-Gil, J. C., G. Llaverias, J. Julve, M. Jauhiainen, J. Méndez-González, and F. Blanco-Vaca. 2011. The cholesterol content of Western diets plays a major role in the paradoxical increase in high-density lipoprotein cholesterol and upregulates the macrophage reverse cholesterol transport pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31:** 2493–2499.
43. Taraboulos, A., M. Scott, A. Semenov, D. Avrahami, L. Laszlo, and S. B. Prusiner. 1995. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* **129:** 121–132. [Erratum. 1995. *J. Cell Biol.* 130: 501.]

44. Bate, C., M. Salmona, L. Diomede, and A. Williams. 2004. Squalestatin cures prion-infected neurons and protects against prion neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279:** 14983–14990.
45. Campana, V., D. Sarnataro, C. Fasano, P. Casanova, S. Paladino, and C. Zurzolo. 2006. Detergent-resistant membrane domains but not the proteasome are involved in the misfolding of a PrP mutant retained in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **119:** 433–442.
46. Gilch, S., C. Kehler, and H. M. Schätzl. 2006. The prion protein requires cholesterol for cell surface localization. *Mol. Cell. Neurosci.* **31:** 346–353.
47. Shelly, L., L. Royer, T. Sand, H. Jensen, and Y. Luo. 2008. Phospholipid transfer protein deficiency ameliorates diet-induced hypercholesterolemia and inflammation in mice. *J. Lipid Res.* **49:** 773–781.
48. Desrumaux, C., S. Lemaire-Ewing, N. Ogier, A. Yessoufou, A. Hammann, A. Sequeira-Le Grand, V. Deckert, J-P. Pais de Barros, N. Le Guern, J. Guy, et al. 2016. Plasma phospholipid transfer protein (PLTP) modulates adaptive immune functions through alternation of T helper cell polarization. *Cell. Mol. Immunol.* **13:** 795–804.
49. Deckert, V., B. Kretz, A. Habbout, K. Raghay, J. Labbé, N. Abello, C. Desrumaux, T. Gautier, S. Lemaire-Ewing, G. Maquart, et al. 2013. Development of abdominal aortic aneurysm is decreased in mice with plasma phospholipid transfer protein deficiency. *Am. J. Pathol.* **183:** 975–986.
50. Schlitt, A., J. Liu, D. Yan, M. Mondragon-Escorpizo, A. J. Norin, and X-C. Jiang. 2005. Anti-inflammatory effects of phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency in mice. *Biochim. Biophys. Acta.* **1733:** 187–191.
51. Mok, S. W. F., K. M. Thelen, C. Riemer, T. Bamme, S. Gültner, D. Lütjohann, and M. Baier. 2006. Simvastatin prolongs survival times in prion infections of the central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348:** 697–702.
52. Haviv, Y., D. Avrahami, H. Ovadia, T. Ben-Hur, R. Gabizon, and R. Sharon. 2008. Induced neuroprotection independently from PrPSc accumulation in a mouse model for prion disease treated with simvastatin. *Arch. Neurol.* **65:** 762–775.
53. Hess, D. C., and S. C. Fagan. 2001. Pharmacology and clinical experience with simvastatin. *Expert Opin. Pharmacother.* **2:** 153–163.



Supplemental Figure S1. Immunoblotting of tissue sections of PLTP$^{-/-}$ and WT mice, killed at the terminal stage of the disease.

PET-blot analysis of frontal tissue sections from WT or PLTP$^{-/-}$ mice inoculated with 22L prions and sacrificed while they were sick, and presenting equivalent incubation times of the disease (217, 220, 225 d.p.i). Mice were fed a standard chow diet (**A-B**), or a Western-type cholesterol-rich diet (**C-D**). The SAF84 antibody was used to detect PrP^{Sc} proteins and the Vectastain ABC-AmP Kit (Vector laboratories, USA) to reveal antibody binding.



Supplemental Figure S2. Analysis of spongiosis in brain tissue sections. (**A-B**) Histological analyses of thalamus (Th) sections from control WT and PLTP$^{-/-}$ mice not inoculated with prions. (**C-H**) Thalamus tissue sections from WT and PLTP$^{-/-}$ mice inoculated with 22L prion strain and either sacrificed while they were asymptomatic (196 d.p.i) (C-D), or at the terminal stage of the disease (E-H), and fed either a standard chow diet (SD) (E-F), or a Western-type cholesterol-rich diet (WD) (G-H). Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to confirm the prion disease as indicated by the presence of vacuoles. Tissue labeling was performed on several animals (2-3 per group, except asymptomatic mice) and the selected images are representative of the staining observed in each group.

II. Publications et communications

➔ ***Articles de recherche***

En cours : Wang Y.*, **Lafon P.A**.*, Salvador-Prince L., Relano-Gines A., Trousse F., Huetter E., Crozet C., Liu J. & Perrier V. Prenatal exposure to fungicides disrupts neurogenesis in neonates and predisposes to the onset of Alzheimer's disease. *In preparation*.

Perrier V., Mayran C., Belondrade M., **Lafon P.A.**, Huetter E., Bruyère-Ostells L., Nicot S., Alvarez-Martinez M.T., Arnaud J.D., Imberdis T., Fournier-Wirth C & Bougard D. A rapid endogenous model for prion removal from whole blood and plasma. *In preparation*.

Lafon P.A.*, Wang Y.*, Arrango-Lievano M., Torrent J., Salvador-Prince L., Mansuy M., Mestre-Francès N., Liu J., Mercader J.V., Jeanneteau F., Desrumaux C. & Perrier V. Fungicide residues exacerbate vascular β-amyloid deposits in J20 mice. *Submission expected in April in Environmental Health Perspectives*.

2019 : **Lafon P.A.** & Perrier V. Pesticides et maladies neurodégénératives. Recueill de conférences 2016 – dixièmes débats de recherche : recherche en biosciences pour la santé. Editeur : Société Andorranne des Sciences (SACS).

2018 : **Lafon P.A.**, Imberdis T., Wang Y., Torrent J., Robitzer M., Huetter E., Alvarez-Martinez M.T., Chevallier N., Givalois L., Desrumaux C., Liu J. & Perrier V. Low doses of bioherbicide favour prion aggregation and propagation in vivo. *Scientific Reports* 8(1): 8023.

2017 : Perrier V., Imberdis T., **Lafon P.A.**, Cefis M., Wang Y., Huetter E., Arnaud J.D., Alvarez-Martinez T., Le Guern N., Maquart G., Lagrost L. & Desrumaux C. Plasma cholesterol level determines *in vivo* prion propagation. *Journal of Lipid Research*, 58(10): 1950-1961.

2015 : Ohayon D., Ventéo S., Sonrier C., **Lafon P.A.**, Garcès A., Valmier J., Rivat C., Topilko P., Carroll P. & Pattyn A. Zeb family members and bundary cap cells underlie developmental plasticity of sensory nociceptive neurons. *Developmental Cell*, 33(3): 343-350.

➔ ***Communications orales et présentations de posters***

Communications orales :

2018 : Premier congrès des 7 Centres d'excellence sur les maladies neurodégénératives (CoEN), 18-19 Octobre 2018, Montpellier, France. Flash talk sur : "Impact of pesticide residues in a mouse model of Alzheimer's disease". **Lafon P.A.**

2017 : Journée des neurosciences de Montpellier : 8 Décembre 2017, Montpellier, France. Impact of a chronic exposure to residues of pesticides in a mouse model of Alzheimer's disease. **Lafon P.A.**

2016 : Conférencier invité aux 10èmes débats de recherche : recherche en biosciences pour la santé, 1er Juin 2016, Andorra La Vella, Principauté d'Andorre. Pesticides et maladies neurodégénératives. **Lafon P.A.**

Posters :

2018 : **Congrès du club Alzheimer de Montpellier (CALM)**, 20 Novembre 2018, Montpellier, France. Chronic exposure to multiple residues of pesticides at low doses strengthens amyloid aggregation in a mouse model of Alzheimer's disease. **Lafon P.A.**, Wang Y., Arrango-Lievano M., Torrent J., Salvador-Prince L., Mansuy M., Mestre-Francès N., Liu J., Mercader J.V., Jeanneteau F., Desrumaux C. & Perrier V.

Congrès des 7 CoEN, 18-19 Octobre 2018, Montpellier, France. Chronic exposure to multiple residues of pesticides at low doses strengthens amyloid aggregation in a mouse model of Alzheimer's disease. **Lafon P.A.**, Wang Y., Arrango-Lievano M., Torrent J., Salvador-Prince L., Mansuy M., Mestre-Francès N., Liu J., Mercader J.V., Jeanneteau F., Desrumaux C. & Perrier V.

Congrès Prion 2018, 22-25 Mai 2018, Santiago de Compostella, Espagne. Low doses of bioherbicide favour prion aggregation and propagation in vivo. **Lafon PA.,** Imberdis T., Wang Y., Torrent J., Robitzer M., Huetter E., Alvarez-Martinez M.T., Chevallier N., Givalois L., Desrumaux C., Liu J. & Perrier V.

2017 : **Congrès du club Alzheimer de Montpellier (CALM)**, 21 Novembre 2017, Montpellier, France. Chronic exposure to low doses of fungicides aggravates amyloid aggregation in a mouse model of Alzheimer's disease. **Lafon P.A.**, Wang Y., Arrango-Lievano M., Torrent J., Salvador-Prince L., Mansuy M., Mestre-Francès N., Liu J., Mercader J.V., Jeanneteau F., Desrumaux C. & Perrier V.
Prix de présentation de poster.

Journée de l'école doctorale CBS2, 24 Mai 2017, Montpellier, France. A biopesticide analog acts as a modulator of the prion aggregation. **Lafon P.A.**, Imberdis T., Wang Y., Torrent J., Robitzer M., Huetter E., Alvarez-Martinez M.T., Chevallier N., Givalois L., Desrumaux C., Liu J. & Perrier V.

NeuroFrance 2017, 17-19 Mai 2017, Bordeaux, France. A biopesticide analog acts as a modulator of the prion aggregation. **Lafon P.A.**, Imberdis T., Wang Y., Torrent J., Robitzer M., Huetter E., Alvarez-Martinez M.T., Chevallier N., Givalois L., Desrumaux C., Liu J. & Perrier V.

2016 : **Journée de l'école doctorale CBS2**, 26 Mai 2016, Montpellier, France. A biopesticide analog acts as a modulator of the prion aggregation and propagation. **Lafon P.A.**, Imberdis T., Wang Y., Torrent J., Robitzer M., Huetter E., Alvarez-Martinez M.T., Chevallier N., Givalois L., Desrumaux C., Liu J. & Perrier V.

Bibliographie

A

Abid, K., and Soto, C. (2006). The intriguing prion disorders. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *63*, 2342–2351.

Ables, J.L., Breunig, J.J., Eisch, A.J., and Rakic, P. (2011). Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. Nat. Rev. Neurosci. *12*, 269–283.

Abskharon, R.N.N., Giachin, G., Wohlkonig, A., Soror, S.H., Pardon, E., Legname, G., and Steyaert, J. (2014). Probing the N-terminal β-sheet conversion in the crystal structure of the human prion protein bound to a nanobody. J. Am. Chem. Soc. *136*, 937–944.

Acevedo-Morantes, C.Y., and Wille, H. (2014). The structure of human prions: from biology to structural models-considerations and pitfalls. Viruses *6*, 3875–3892.

Aguilar-Calvo, P., Espinosa, J.C., Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A., Alamillo, E., Miranda, A., Prieto, I., Bossers, A., Andreoletti, O., and Torres, J.M. (2014). Role of the goat K222-PrP(C) polymorphic variant in prion infection resistance. J. Virol. *88*, 2670–2676.

Aguzzi, A., and Lakkaraju, A.K.K. (2016). Cell Biology of Prions and Prionoids: A Status Report. Trends Cell Biol. *26*, 40–51.

Aguzzi, A., and Polymenidou, M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. Cell *116*, 313–327.

Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. Annu. Rev. Pathol. *3*, 11–40.

Ahn, K., Shelton, C.C., Tian, Y., Zhang, X., Gilchrist, M.L., Sisodia, S.S., and Li, Y.-M. (2010). Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 21435–21440.

Al-Bassam, J., Ozer, R.S., Safer, D., Halpain, S., and Milligan, R.A. (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. J. Cell Biol. *157*, 1187–1196.

Albers, J.J., Vuletic, S., and Cheung, M.C. (2012). Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. Biochim. Biophys. Acta *1821*, 345–357.

Alfaidy, N., Chauvet, S., Donadio-Andrei, S., Salomon, A., Saoudi, Y., Richaud, P., Aude-Garcia, C., Hoffmann, P., Andrieux, A., Moulis, J.-M., et al. (2013). Prion protein expression and functional importance in developmental angiogenesis: role in oxidative stress and copper homeostasis. Antioxid. Redox Signal. *18*, 400–411.

Alleaume-Butaux, A., Nicot, S., Pietri, M., Baudry, A., Dakowski, C., Tixador, P., Ardila-Osorio, H., Haeberlé, A.-M., Bailly, Y., Peyrin, J.-M., et al. (2015). Double-Edge Sword of Sustained ROCK Activation in Prion Diseases through Neuritogenesis Defects and Prion Accumulation. PLoS Pathog. *11*.

Allinson, T.M.J., Parkin, E.T., Condon, T.P., Schwager, S.L.U., Sturrock, E.D., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2004). The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. Eur. J. Biochem. *271*, 2539–2547.

Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., and Clarke, M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature *214*, 764–766.

Alperovitch, A., Zerr, I., Pocchiari, M., Mitrova, E., de Pedro Cuesta, J., Hegyi, I., Collins, S., Kretzschmar, H., van Duijn, C., and Will, R.G. (1999). Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet Lond. Engl. *353*, 1673–1674.

Alpers, M.P. (2008). Review. The epidemiology of kuru: monitoring the epidemic from its peak to its end. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *363*, 3707–3713.

Altieri, M., Di Piero, V., Pasquini, M., Gasparini, M., Vanacore, N., Vicenzini, E., and Lenzi, G.L. (2004). Delayed poststroke dementia: a 4-year follow-up study. Neurology *62*, 2193–2197.
Altmeppen, H.C., Puig, B., Dohler, F., Thurm, D.K., Falker, C., Krasemann, S., and Glatzel, M. (2012). Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. Am. J. Neurodegener. Dis. *1*, 15–31.
Altmeppen, H.C., Prox, J., Puig, B., Dohler, F., Falker, C., Krasemann, S., and Glatzel, M. (2013). Roles of endoproteolytic α-cleavage and shedding of the prion protein in neurodegeneration. FEBS J. *280*, 4338–4347.
Alves da Costa, C., Sunyach, C., Pardossi-Piquard, R., Sévalle, J., Vincent, B., Boyer, N., Kawarai, T., Girardot, N., St George-Hyslop, P., and Checler, F. (2006). Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 6377–6385.
Alzheimer, A. (1906). Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeβ der Hirnrincle. Neurol Central. Neurol Cent. *25*, 1134.
Alzheimer's Disease International (2018). World Alzheimer Report 2018. The state of the art of dementia research: new frontiers.
Andréoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J.M., and Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. J. Gen. Virol. *81*, 3115–3126.
ANSES (2010a). Expostion de la population générale aux résidus de pesticides en France. Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides (ORP). Rapport scientifique.
ANSES (2010b). Recommandations et perspectives pour une surveillance nationale de la contamination de l'air par les pesticides. Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides (ORP). Rapport scientifique.
ANSES (2011). Second French Total Diet Study (TDS2). Report 2. Pesticide residues, additives, acrylamide and polycyclic aromatic hydrocarbons.
ANSES (2013). Évaluation des risques liés aux résidus de pesticides dans l'eau de distribution. Contribution à l'exposition alimentaire totale. Rapport d'étude scientifique.
Antonell, A., Gelpi, E., Sánchez-Valle, R., Martínez, R., Molinuevo, J.L., and Lladó, A. (2012). Breakpoint sequence analysis of an AβPP locus duplication associated with autosomal dominant Alzheimer's disease and severe cerebral amyloid angiopathy. J. Alzheimers Dis. JAD *28*, 303–308.
Appleby, B.S., Lu, M., Bizzi, A., Phillips, M.D., Berri, S.M., Harbison, M.D., and Schonberger, L.B. (2013). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease from Commercial Cadaveric Human Growth Hormone. Emerg. Infect. Dis. *19*, 682–684.
Arellano-Anaya, Z.E., Huor, A., Leblanc, P., Lehmann, S., Provansal, M., Raposo, G., Andréoletti, O., and Vilette, D. (2015). Prion strains are differentially released through the exosomal pathway. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *72*, 1185–1196.
Arendt, T., Stieler, J., and Ueberham, U. (2017). Is sporadic Alzheimer's disease a developmental disorder? J. Neurochem. *143*, 396–408.
Arispe, N., Rojas, E., and Pollard, H.B. (1993a). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 567–571.
Arispe, N., Pollard, H.B., and Rojas, E. (1993b). Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 10573–10577.

Arsac, J.-N., Andreoletti, O., Bilheude, J.-M., Lacroux, C., Benestad, S.L., and Baron, T. (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. Emerg. Infect. Dis. *13*, 58–65.
Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. Biochem. Biophys. Res. Commun. *301*, 231–235.
Ashe, K.H., and Zahs, K.R. (2010). Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. Neuron *66*, 631–645.
Auriel, E., and Greenberg, S.M. (2012). The pathophysiology and clinical presentation of cerebral amyloid angiopathy. Curr. Atheroscler. Rep. *14*, 343–350.
Ayrolles-Torro, A., Imberdis, T., Torrent, J., Toupet, K., Baskakov, I.V., Poncet-Montange, G., Grégoire, C., Roquet-Baneres, F., Lehmann, S., Rognan, D., et al. (2011). Oligomeric-induced activity by thienyl pyrimidine compounds traps prion infectivity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 14882–14892.

B

Baldi, I., Lebailly, P., Mohammed-Brahim, B., Letenneur, L., Dartigues, J.-F., and Brochard, P. (2003). Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. Am. J. Epidemiol. *157*, 409–414.
Balkema-Buschmann, A., Fast, C., Kaatz, M., Eiden, M., Ziegler, U., McIntyre, L., Keller, M., Hills, B., and Groschup, M.H. (2011). Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. Prev. Vet. Med. *102*, 112–117.
Ballatore, C., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 663–672.
Barbeau, A., Roy, M., Bernier, G., Campanella, G., and Paris, S. (1987). Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas. Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol. *14*, 36–41.
Barnwell, E., Padmaraju, V., Baranello, R., Pacheco-Quinto, J., Crosson, C., Ablonczy, Z., Eckman, E., Eckman, C.B., Ramakrishnan, V., Greig, N.H., et al. (2014). Evidence of a novel mechanism for partial γ-secretase inhibition induced paradoxical increase in secreted amyloid β protein. PloS One *9*, e91531.
Barrett, P.J., Song, Y., Van Horn, W.D., Hustedt, E.J., Schafer, J.M., Hadziselimovic, A., Beel, A.J., and Sanders, C.R. (2012). The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. Science *336*, 1168–1171.
Barria, M.A., Telling, G.C., Gambetti, P., Mastrianni, J.A., and Soto, C. (2011). Generation of a new form of human PrP(Sc) in vitro by interspecies transmission from cervid prions. J. Biol. Chem. *286*, 7490–7495.
Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T., and Zagorski, M.G. (1992). Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. J. Mol. Biol. *225*, 1075–1093.
Baskakov, I.V., Legname, G., Baldwin, M.A., Prusiner, S.B., and Cohen, F.E. (2002). Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. J. Biol. Chem. *277*, 21140–21148.
Bateman, R.J., Munsell, L.Y., Morris, J.C., Swarm, R., Yarasheski, K.E., and Holtzman, D.M. (2006). Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. Nat. Med. *12*, 856–861.
Beck, E., Daniel, P.M., Alpers, M., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J. (1966). Experimental "kuru" in chimpanzees. A pathological report. Lancet Lond. Engl. *2*, 1056–1059.

Beekes, M., and McBride, P.A. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. Neurosci. Lett. *278*, 181–184.
Bejanin, A., Schonhaut, D.R., La Joie, R., Kramer, J.H., Baker, S.L., Sosa, N., Ayakta, N., Cantwell, A., Janabi, M., Lauriola, M., et al. (2017). Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. Brain J. Neurol. *140*, 3286–3300.
Belay, E.D., Gambetti, P., Schonberger, L.B., Parchi, P., Lyon, D.R., Capellari, S., McQuiston, J.H., Bradley, K., Dowdle, G., Crutcher, J.M., et al. (2001). Creutzfeldt-Jakob disease in unusually young patients who consumed venison. Arch. Neurol. *58*, 1673–1678.
Belt, P.B., Muileman, I.H., Schreuder, B.E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A.L., and Smits, M.A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. J. Gen. Virol. *76 (Pt 3)*, 509–517.
Ben Halima, S., and Rajendran, L. (2011). Membrane anchored and lipid raft targeted β-secretase inhibitors for Alzheimer's disease therapy. J. Alzheimers Dis. JAD *24 Suppl 2*, 143–152.
Benelli, G., Canale, A., Toniolo, C., Higuchi, A., Murugan, K., Pavela, R., and Nicoletti, M. (2017). Neem (Azadirachta indica): towards the ideal insecticide? Nat. Prod. Res. *31*, 369–386.
Benestad, S.L., Sarradin, P., Thu, B., Schönheit, J., Tranulis, M.A., and Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. Vet. Rec. *153*, 202–208.
Benestad, S.L., Arsac, J.-N., Goldmann, W., and Nöremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. Vet. Res. *39*, 19.
Benestad, S.L., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B., and Vikøren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. Vet. Res. *47*, 88.
Benjannet, S., Cromlish, J.A., Diallo, K., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (2004). The metabolism of beta-amyloid converting enzyme and beta-amyloid precursor protein processing. Biochem. Biophys. Res. Commun. *325*, 235–242.
Beraldo, F.H., Arantes, C.P., Santos, T.G., Queiroz, N.G.T., Young, K., Rylett, R.J., Markus, R.P., Prado, M.A.M., and Martins, V.R. (2010). Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. J. Biol. Chem. *285*, 36542–36550.
Berger-Sweeney, J., McPhie, D.L., Arters, J.A., Greenan, J., Oster-Granite, M.L., and Neve, R.L. (1999). Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-terminus of the amyloid precursor protein. Brain Res. Mol. Brain Res. *66*, 150–162.
Bermúdez-Couso, A., Arias-Estévez, M., Nóvoa-Muñoz, J.C., López-Periago, E., Soto-González, B., and Simal-Gándara, J. (2007). Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards. Water Res. *41*, 4515–4525.
Bernoulli, C., Siegfried, J., Baumgartner, G., Regli, F., Rabinowicz, T., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J. (1977). Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. Lancet Lond. Engl. *1*, 478–479.
Berti, V., Walters, M., Sterling, J., Quinn, C.G., Logue, M., Andrews, R., Matthews, D.C., Osorio, R.S., Pupi, A., Vallabhajosula, S., et al. (2018). Mediterranean diet and 3-year Alzheimer brain biomarker changes in middle-aged adults. Neurology *90*, e1789–e1798.
Bertrand, C., Cousin, X., Haubruge, E., Toutant, J.P., and Chatonnet, A. (1998). L'acetylcholinesterase des poissons, cible des organophosphorés et des carbamates. Bull Fr Pêche Piscic *350*, 535–546.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nat. Neurosci. *3*, 1301–1306.
Bhattacharyya, R., Barren, C., and Kovacs, D.M. (2013). Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 11169–11183.
Bi, X., Gall, C.M., Zhou, J., and Lynch, G. (2002). Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. Neuroscience *112*, 827–840.
Biacabe, A.-G., Laplanche, J.-L., Ryder, S., and Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. EMBO Rep. *5*, 110–115.
Biasini, E., Turnbaugh, J., Unterberger, U., and Harris, D. (2012). Prion protein at the crossroads of physiology and disease. Trends Neurosci *35*, 92–103.
Biffi, A., and Greenberg, S.M. (2011). Cerebral amyloid angiopathy: a systematic review. J. Clin. Neurol. Seoul Korea *7*, 1–9.
Billette de Villemeur, T., Gourmelen, M., Beauvais, P., Rodriguez, D., Vaudour, G., Deslys, J.P., Dormont, D., Richard, P., and Richardet, J.M. (1992). [Creutzfeldt-Jakob disease in 4 children treated with growth hormone]. Rev. Neurol. (Paris) *148*, 328–334.
Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. J. Cell Biol. *101*, 1371–1378.
Bird, T.D. (1993). Early-Onset Familial Alzheimer Disease. In GeneReviews®, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B., and Teplow, D.B. (2003). Amyloid β-protein (Aβ) assembly: Aβ40 and Aβ42 oligomerize through distinct pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 330–335.
Black, S.A.G., Stys, P.K., Zamponi, G.W., and Tsutsui, S. (2014). Cellular prion protein and NMDA receptor modulation: protecting against excitotoxicity. Front. Cell Dev. Biol. *2*, 45.
Blacker, M., Noe, M.C., Carty, T.J., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A.C. (2002). Effect of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons. J. Neurochem. *83*, 1349–1357.
Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. Lancet Lond. Engl. *368*, 387–403.
Bonifacino, J.S., and Traub, L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. Annu. Rev. Biochem. *72*, 395–447.
Bordji, K., Becerril-Ortega, J., Nicole, O., and Buisson, A. (2010). Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ß production. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 15927–15942.
Bornebroek, M., De Jonghe, C., Haan, J., Kumar-Singh, S., Younkin, S., Roos, R., and Van Broeckhoven, C. (2003). Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis Dutch type (AbetaPP 693): decreased plasma amyloid-beta 42 concentration. Neurobiol. Dis. *14*, 619–623.
Boujon, C., Serra, F., and Seuberlich, T. (2016). Atypical variants of bovine spongiform encephalopathy: rare diseases with consequences for BSE surveillance and control. Schweiz. Arch. Tierheilkd. *158*, 171–177.
Boulton, M.E., Cai, J., and Grant, M.B. (2008). gamma-Secretase: a multifaceted regulator of angiogenesis. J. Cell. Mol. Med. *12*, 781–795.
Braak, H., and Braak, E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. Brain Pathol. Zurich Switz. *1*, 213–216.

Braak, H., and Braak, E. (1995). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neurobiol. Aging *16*, 271-278; discussion 278-284.
Braak, H., and Del Tredici, K. (2011). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. Acta Neuropathol. (Berl.) *121*, 171–181.
Braak, H., and Del Tredici, K. (2014). Are cases with tau pathology occurring in the absence of Aβ deposits part of the AD-related pathological process? Acta Neuropathol. (Berl.) *128*, 767–772.
Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Steele, A.D., Toyka, K.V., Nave, K.-A., Weis, J., et al. (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. Nat. Neurosci. *13*, 310–318.
Brooks, L. (2014). Pesticide use regulations on organic fruit and vegetable farms.
Brouwer, M., Koeman, T., van den Brandt, P.A., Kromhout, H., Schouten, L.J., Peters, S., Huss, A., and Vermeulen, R. (2015). Occupational exposures and Parkinson's disease mortality in a prospective Dutch cohort. Occup. Environ. Med. *72*, 448–455.
Brown, P. (1997). The risk of bovine spongiform encephalopathy ('mad cow disease') to human health. JAMA *278*, 1008–1011.
Brown, P. (2001). Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease. BMJ *322*, 841–844.
Brown, D., Qin, K., Herms, J., Madlung, A., Manson, J., Strome, J., Fraser, P., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., et al. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature *390*, 684–687.
Brown, D., Schulz-Schaeffer, W., Schmidt, B., and Kretzschmar, H. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. Exp Neurol *146*, 104–112.
Brown, D.R., Schmidt, B., and Kretzschmar, H.A. (1998). Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. J. Neurochem. *70*, 1686–1693.
Brown, D.R., Nicholas, R.S.J., and Canevari, L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. J. Neurosci. Res. *67*, 211–224.
Brown, K.L., Stewart, K., Ritchie, D.L., Mabbott, N.A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W.I., and Bruce, M.E. (1999). Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. Nat. Med. *5*, 1308–1312.
Brown, P., Preece, M., Brandel, J.P., Sato, T., McShane, L., Zerr, I., Fletcher, A., Will, R.G., Pocchiari, M., Cashman, N.R., et al. (2000). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. Neurology *55*, 1075–1081.
Brown, P., Brandel, J.-P., Sato, T., Nakamura, Y., MacKenzie, J., Will, R.G., Ladogana, A., Pocchiari, M., Leschek, E.W., and Schonberger, L.B. (2012). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease, Final Assessment. Emerg. Infect. Dis. *18*, 901–907.
Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., et al. (1997). Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. Nature *389*, 498–501.
Brugère-Picoux, J., and Chatelain, J. (1995). [Scrapie in sheep and transmissible encephalopathy of the mink]. Pathol. Biol. (Paris) *43*, 81–90.
Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature *356*, 577–582.
Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell *73*, 1339–1347.
Bukhari, H., Glotzbach, A., Kolbe, K., Leonhardt, G., Loosse, C., and Müller, T. (2017). Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. Prog. Neurobiol. *156*, 189–213.

Bush, A.I., Multhaup, G., Moir, R.D., Williamson, T.G., Small, D.H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1993). A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. J. Biol. Chem. *268*, 16109–16112.
Butault, J., Dedryver, C., Gary, C., Guichard, L., Jacquet, F., Meynard, J., Nicot, P., Pitrat, M., Reau, R., Sauphanor, B., et al. (2010). Ecophyto r&d. Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ?
Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Akeefe, H., Pitas, R.E., Wyss-Coray, T., Mucke, L., and Mahley, R.W. (1999). Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe-/- mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 4867–4880.
Buttini, M., Yu, G.-Q., Shockley, K., Huang, Y., Jones, B., Masliah, E., Mallory, M., Yeo, T., Longo, F.M., and Mucke, L. (2002). Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 10539–10548.
Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., and Black, R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. J. Biol. Chem. *273*, 27765–27767.

C

Cabidoche, Y.-M., Achard, R., Cattan, P., Clermont-Dauphin, C., Massat, F., and Sansoulet, J. (2009). Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: a simple leaching model accounts for current residue. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 *157*, 1697–1705.
Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. Dev. Camb. Engl. *131*, 2173–2181.
Campos, E.V.R., de Oliveira, J.L., Pascoli, M., de Lima, R., and Fraceto, L.F. (2016). Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future. Front. Plant Sci. *7*, 1494.
Cannon, J.R., Tapias, V., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E., and Greenamyre, J.T. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. *34*, 279–290.
Caporaso, G.L., Takei, K., Gandy, S.E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P., and De Camilli, P. (1994). Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 3122–3138.
Cappai, R., Cheng, F., Ciccotosto, G.D., Needham, B.E., Masters, C.L., Multhaup, G., Fransson, L.-A., and Mani, K. (2005). The amyloid precursor protein (APP) of Alzheimer disease and its paralog, APLP2, modulate the Cu/Zn-Nitric Oxide-catalyzed degradation of glypican-1 heparan sulfate in vivo. J. Biol. Chem. *280*, 13913–13920.
Carroll, C.M., and Li, Y.-M. (2016). Physiological and pathological roles of the γ-secretase complex. Brain Res. Bull. *126*, 199–206.
Carter, B.D., and Medzihradsky, F. (1993). Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 4062–4066.

Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., and Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 3065–3070.
Casley, C.S., Canevari, L., Land, J.M., Clark, J.B., and Sharpe, M.A. (2002). Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. J. Neurochem. *80*, 91–100.
Cerpa, W., Dinamarca, M.C., and Inestrosa, N.C. (2008). Structure-function implications in Alzheimer's disease: effect of Abeta oligomers at central synapses. Curr. Alzheimer Res. *5*, 233–243.
Chami, L., and Checler, F. (2012). BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and β-amyloid production in Alzheimer's disease. Mol. Neurodegener. *7*, 52.
Chan, S.L., Griffin, W.S., and Mattson, M.P. (1999). Evidence for caspase-mediated cleavage of AMPA receptor subunits in neuronal apoptosis and Alzheimer's disease. J. Neurosci. Res. *57*, 315–323.
Charidimou, A., Martinez-Ramirez, S., Shoamanesh, A., Oliveira-Filho, J., Frosch, M., Vashkevich, A., Ayres, A., Rosand, J., Gurol, M.E., Greenberg, S.M., et al. (2015). Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage: evidence for different disease phenotypes. Neurology *84*, 1206–1212.
Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., and Hardy, J. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. Nature *353*, 844–846.
Chasseigneaux, S., Dinc, L., Rose, C., Chabret, C., Coulpier, F., Topilko, P., Mauger, G., and Allinquant, B. (2011). Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. PloS One *6*, e16301.
Chazot, G., Broussolle, E., Lapras, C., Blättler, T., Aguzzi, A., and Kopp, N. (1996). New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. The Lancet *347*, 1181.
Chelle, P. (1942). Un cas de tremblante de la chèvre. Bull Acad Vét France 294–295.
Chen, H.M., and Tsong, T.Y. (1994). Chain condensation in protein folding. Biochimie *76*, 384–388.
Chen, L., Yoo, S.-E., Na, R., Liu, Y., and Ran, Q. (2012). Cognitive impairment and increased Aβ levels induced by paraquat exposure are attenuated by enhanced removal of mitochondrial H(2)O(2). Neurobiol. Aging *33*, 432.e15-26.
Chen, S., Mangé, A., Dong, L., Lehmann, S., and Schachner, M. (2003). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. Mol. Cell. Neurosci. *22*, 227–233.
Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J., and Quintanilla-Vega, B. (2015). Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. Front. Cell. Neurosci. *9*, 124.
Choi, J.-K., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Gambetti, P., and Surewicz, W.K. (2016). Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 13851–13856.
Chow, V.W., Mattson, M.P., Wong, P.C., and Gleichmann, M. (2010). An overview of APP processing enzymes and products. Neuromolecular Med. *12*, 1–12.
Civitelli, L., Sandin, L., Nelson, E., Khattak, S.I., Brorsson, A.-C., and Kågedal, K. (2016). The Luminescent Oligothiophene p-FTAA Converts Toxic Aβ1-42 Species into Nontoxic Amyloid Fibers with Altered Properties. J. Biol. Chem. *291*, 9233–9243.

Clark, M.J., Gagnon, J., Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1985). MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. EMBO J. *4*, 113–118.
Clouscard, C., Beaudry, P., Elsen, J.M., Milan, D., Dussaucy, M., Bounneau, C., Schelcher, F., Chatelain, J., Launay, J.M., and Laplanche, J.L. (1995). Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. J. Gen. Virol. *76 (Pt 8)*, 2097–2101.
Cochran, E.J., Bennett, D.A., Cervenáková, L., Kenney, K., Bernard, B., Foster, N.L., Benson, D.F., Goldfarb, L.G., and Brown, P. (1996). Familial Creutzfeldt-Jakob disease with a five-repeat octapeptide insert mutation. Neurology *47*, 727–733.
Cohen, F., Pan, K., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R., and Prusiner, S. (1994). Structural clues to prion replication. Science *264*, 530–531.
Cohn, B.A., Wolff, M.S., Cirillo, P.M., and Sholtz, R.I. (2007). DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. Environ. Health Perspect. *115*, 1406–1414.
Colby, D.W., and Prusiner, S.B. (2011). Prions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*, a006833.
Collinge, J., Palmer, M.S., and Dryden, A.J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet Lond. Engl. *337*, 1441–1442.
Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. Nature *383*, 685–690.
Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Beck, J., Mead, S., Thomas, D.J., and Alpers, M.P. (2006). Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. Lancet Lond. Engl. *367*, 2068–2074.
Comoy, E.E., Mikol, J., Luccantoni-Freire, S., Correia, E., Lescoutra-Etchegaray, N., Durand, V., Dehen, C., Andreoletti, O., Casalone, C., Richt, J.A., et al. (2015). Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. Sci. Rep. *5*.
Copanaki, E., Chang, S., Vlachos, A., Tschäpe, J.-A., Müller, U.C., Kögel, D., and Deller, T. (2010). sAPPalpha antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. Mol. Cell. Neurosci. *44*, 386–393.
Coscollà, C., Colin, P., Yahyaoui, A., Petrique, O., Yusà, V., Mellouki, A., and Pastor, A. (2010). Occurrence of currently used pesticides in ambient air of Centre Region (France). Atmos. Environ. *44*, 3915–3925.
Cras, P., van Harskamp, F., Hendriks, L., Ceuterick, C., van Duijn, C.M., Stefanko, S.Z., Hofman, A., Kros, J.M., Van Broeckhoven, C., and Martin, J.J. (1998). Presenile Alzheimer dementia characterized by amyloid angiopathy and large amyloid core type senile plaques in the APP 692Ala-->Gly mutation. Acta Neuropathol. (Berl.) *96*, 253–260.
Crawford, M.A. (1990). The early development and evolution of the human brain. Ups. J. Med. Sci. Suppl. *48*, 43–78.
Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A.M., Temussi, P.A., and Picone, D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. Eur. J. Biochem. *269*, 5642–5648.
Creutzfeldt, H.G. (1920). Uber eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentral nerven systems. Z Neurol Psychiatr *57*, 1–18.
Cuille, J., and Chelle, P. (1939). Transmission expérimentale de la tremblante à la chèvre. C R Acad Sci Paris 1058–1060.
Cummings, J.L., Morstorf, T., and Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. Alzheimers Res. Ther. *6*, 37.

D

Dahms, S.O., Hoefgen, S., Roeser, D., Schlott, B., Gührs, K.-H., and Than, M.E. (2010). Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 5381–5386.
Dahms, S.O., Könnig, I., Roeser, D., Gührs, K.-H., Mayer, M.C., Kaden, D., Multhaup, G., and Than, M.E. (2012). Metal binding dictates conformation and function of the amyloid precursor protein (APP) E2 domain. J. Mol. Biol. *416*, 438–452.
Daigle, I., and Li, C. (1993). apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 12045–12049.
Danielsson, J., Jarvet, J., Damberg, P., and Gräslund, A. (2005). The Alzheimer beta-peptide shows temperature-dependent transitions between left-handed 3-helix, beta-strand and random coil secondary structures. FEBS J. *272*, 3938–3949.
Davis, C.H., and Berkowitz, M.L. (2009). Interaction between amyloid-beta (1-42) peptide and phospholipid bilayers: a molecular dynamics study. Biophys. J. *96*, 785–797.
Dawkins, E., and Small, D.H. (2014). Insights into the physiological function of the β-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. J. Neurochem. *129*, 756–769.
Deane, R., Du Yan, S., Submamaryan, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., et al. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. Nat. Med. *9*, 907–913.
Deane, R., Bell, R.D., Sagare, A., and Zlokovic, B.V. (2009). Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. CNS Neurol. Disord. Drug Targets *8*, 16–30.
DeArmond, S.J., Kristensson, K., and Bowler, R.P. (1992). PrPSc causes nerve cell death and stimulates astrocyte proliferation: a paradox. Prog. Brain Res. *94*, 437–446.
Delamarre, A., and Meissner, W.G. (2017). Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. Presse Medicale Paris Fr. 1983 *46*, 175–181.
Deleault, N.R., Harris, B.T., Rees, J.R., and Supattapone, S. (2007). Formation of native prions from minimal components in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 9741–9746.
Deleault, N.R., Piro, J.R., Walsh, D.J., Wang, F., Ma, J., Geoghegan, J.C., and Supattapone, S. (2012). Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 8546–8551.
Desmond, D.W., Moroney, J.T., Sano, M., and Stern, Y. (2002). Incidence of dementia after ischemic stroke: results of a longitudinal study. Stroke *33*, 2254–2260.
Dickinson, A.G., and Outram, G.W. (1988). Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. Ciba Found. Symp. *135*, 63–83.
DIREN (2001). Le suivi de la contamination des rivières de la Martinique par les produits phytosanitaires. Bilan à l'issue des trois premières campagnes de mesure. Fort-de-France, Martinique Island: DIREN. 12.
Domert, J., Rao, S.B., Agholme, L., Brorsson, A.-C., Marcusson, J., Hallbeck, M., and Nath, S. (2014). Spreading of amyloid-β peptides via neuritic cell-to-cell transfer is dependent on insufficient cellular clearance. Neurobiol. Dis. *65*, 82–92.
Donaldson, D.S., Kobayashi, A., Ohno, H., Yagita, H., Williams, I.R., and Mabbott, N.A. (2012). M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. Mucosal Immunol. *5*, 216–225.
Donaldson, D.S., Else, K.J., and Mabbott, N.A. (2015). The Gut-Associated Lymphoid Tissues in the Small Intestine, Not the Large Intestine, Play a Major Role in Oral Prion Disease Pathogenesis. J. Virol. *89*, 9532–9547.

Donne, D., Viles, J., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T., Cohen, F., Prusiner, S., Wright, P., and Dyson, H. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 13452–13457.
Dorato, M.A., and Engelhardt, J.A. (2005). The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition(s). Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP *42*, 265–274.
Dormont, D., Delpech, B., Delpech, A., Courcel, M.N., Viret, J., Markovits, P., and Court, L. (1981). [Hyperproduction of glial fibrillary acidic protein (GFA) during development of experimental scrapie in mice]. Comptes Rendus Seances Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie *293*, 53–56.
Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. Mol. Biol. Cell *3*, 1141–1154.
Drolet, R.E., Cannon, J.R., Montero, L., and Greenamyre, J.T. (2009). Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. Neurobiol. Dis. *36*, 96–102.
DSDS (2001). Pesticides et alimentation en eau potable en Martinique. Etat des lieux et position sanitaire. Bilan actualisé en octobre 2001. Fort-de-France. Martinique Island: Direction de la Santé et du Développement Social de la Martinique. 11.
van Duijn, C.M., de Knijff, P., Cruts, M., Wehnert, A., Havekes, L.M., Hofman, A., and Van Broeckhoven, C. (1994). Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. Nat. Genet. *7*, 74–78.

E

EFSA (2018). The 2016 European Union report on pesticide residues in food. EFSA J. *16*, 5348.
Eidenmüller, J., Fath, T., Maas, T., Pool, M., Sontag, E., and Brandt, R. (2001). Phosphorylation-mimicking glutamate clusters in the proline-rich region are sufficient to simulate the functional deficiencies of hyperphosphorylated tau protein. Biochem. J. *357*, 759–767.
Eisele, Y.S., Bolmont, T., Heikenwalder, M., Langer, F., Jacobson, L.H., Yan, Z.-X., Roth, K., Aguzzi, A., Staufenbiel, M., Walker, L.C., et al. (2009). Induction of cerebral β-amyloidosis: Intracerebral versus systemic Aβ inoculation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 12926–12931.
Eisele, Y.S., Obermüller, U., Heilbronner, G., Baumann, F., Kaeser, S.A., Wolburg, H., Walker, L.C., Staufenbiel, M., Heikenwalder, M., and Jucker, M. (2010). Peripherally Applied Aβ-Containing Inoculates Induce Cerebral β-Amyloidosis. Science *330*, 980–982.
Ekinci, F.J., Malik, K.U., and Shea, T.B. (1999). Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. J. Biol. Chem. *274*, 30322–30327.
El Hachimi, K.H., Chaunu, M.-P., Cervenakova, L., Brown, P., and Foncin, J.-F. (1997). Putative neurosurgical transmission of Creutzfeldt-Jakob disease with analysis of donor and recipient: agent strains. Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie *320*, 319–328.
Ellis, R.J., Olichney, J.M., Thal, L.J., Mirra, S.S., Morris, J.C., Beekly, D., and Heyman, A. (1996). Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. Neurology *46*, 1592–1596.

Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B., and Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. Biochemistry (Mosc.) *28*, 8380–8388.
Engel, L.S., Checkoway, H., Keifer, M.C., Seixas, N.S., Longstreth, W.T., Scott, K.C., Hudnell, K., Anger, W.K., and Camicioli, R. (2001). Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. Occup. Environ. Med. *58*, 582–589.
Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. Science *248*, 1122–1124.
Esteve-Turrillas, F.A., Agulló, C., Abad-Fuentes, A., Abad-Somovilla, A., and Mercader, J.V. (2012). Immunoreagent generation and competitive assay development for cyprodinil analysis. J. Agric. Food Chem. *60*, 4803–4811.
Esteve-Turrillas, F.A., Mercader, J.V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., and Abad-Fuentes, A. (2013). Mepanipyrim haptens and antibodies with nanomolar affinity. The Analyst *138*, 3360–3364.
Ezpeleta, J., Boudet-Devaud, F., Pietri, M., Baudry, A., Baudouin, V., Alleaume-Butaux, A., Dagoneau, N., Kellermann, O., Launay, J.-M., and Schneider, B. (2017). Protective role of cellular prion protein against TNFα-mediated inflammation through TACE α-secretase. Sci. Rep. *7*.

F

Fan, F., Li, N., Li, G.Q., and Luo, C.X. (2016). Occurrence of Fungicide Resistance in Botrytis cinerea from Greenhouse Tomato in Hubei Province, China. Plant Dis. *100*, 2414–2421.
FAO reports Pyrimethanil (226). First draft was prepared by Mr Stephen Funk, Health Effects Division, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., and Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 9683–9688.
Filograna, R., Godena, V., Sanchez-Martinez, A., Ferrari, E., Casella, L., Beltramini, M., Bubacco, L., Whithworth, A., and Bisaglia, M. (2016). Superoxide Dismutase (SOD)-mimetic M40403 Is Protective in Cell and Fly Models of Paraquat Toxicity: IMPLICATIONS FOR PARKINSON DISEASE. J Biol Chem *291*, 9257–9267.
Fischer, M., Rülicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. EMBO J. *15*, 1255–1264.
Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2000). Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP konckout mice. Neuron *27*, 399–408.
Floris, G., Di Stefano, F., Cherchi, M.V., Costa, G., Marrosu, F., and Marrosu, M.G. (2015). Multiple Spontaneous Cerebral Microbleeds and Leukoencephalopathy in PSEN1-Associated Familial Alzheimer's Disease: Mirror of Cerebral Amyloid Angiopathy? J. Alzheimers Dis. JAD *47*, 535–538.
Fonar, G., and Samson, A.O. (2014). NMR structure of the water soluble Aβ17-34 peptide. Biosci. Rep. *34*, e00155.
Fowler, M., and Robertson, E.G. (1959). Observations on kuru. III. Pathological features in five cases. Australas. Ann. Med. *8*, 16–26.

Fraser, H., and Dickinson, A.G. (1970). Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. Nature *226*, 462–463.
Fraser, H., and Dickinson, A.G. (1978). Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus. J. Comp. Pathol. *88*, 563–573.
Freude, K.K., Penjwini, M., Davis, J.L., LaFerla, F.M., and Blurton-Jones, M. (2011). Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. J. Biol. Chem. *286*, 24264–24274.
Friedman, D., and Friedman, P. (1995). A THEORETICAL-STUDY OF 2,2',5',2''-TERTHIOPHENE (ALPHA-T) AND ITS ANALOGS .1. CORRELATION OF ELECTRONIC-STRUCTURE AND ENERGIES WITH HERBICIDAL PHOTOTOXICITY. J. Mol. Struct. Theochem *333*, 71–78.
Frost, B., and Diamond, M.I. (2010). Prion-like Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 155–159.
Fu, M., and Holzbaur, E.L.F. (2013). JIP1 regulates the directionality of APP axonal transport by coordinating kinesin and dynein motors. J Cell Biol jcb.201302078.
Fujita, S.C., Sakuta, K., Tsuchiya, R., and Hamanaka, H. (1999). Apolipoprotein E is found in astrocytes but not in microglia in the normal mouse brain. Neurosci. Res. *35*, 123–133.
Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., and Mattson, M.P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. J. Neurochem. *67*, 1882–1896.

G

Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J. (1968). Slow, latent and temperate virus infections of the central nervous system. Res. Publ. - Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. *44*, 254–280.
Gajdusek, D.C., and Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. N. Engl. J. Med. *257*, 974–978.
Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., and Alpers, M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. Nature *209*, 794–796.
Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., and Chen, S.G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. Br. Med. Bull. *66*, 213–239.
Gardener, H., and Caunca, M.R. (2018). Mediterranean Diet in Preventing Neurodegenerative Diseases. Curr. Nutr. Rep. *7*, 10–20.
Gaspari, L., Paris, F., Jeandel, C., and Sultan, C. (2011). Peripheral precocious puberty in a 4-month-old girl: role of pesticides? Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol. *27*, 721–724.
Gasperini, L., Meneghetti, E., Pastore, B., Benetti, F., and Legname, G. (2015). Prion protein and copper cooperatively protect neurons by modulating NMDA receptor through S-nitrosylation. Antioxid. Redox Signal. *22*, 772–784.
Gatz, M., Svedberg, P., Pedersen, N.L., Mortimer, J.A., Berg, S., and Johansson, B. (2001). Education and the risk of Alzheimer's disease: findings from the study of dementia in Swedish twins. J. Gerontol. B. Psychol. Sci. Soc. Sci. *56*, P292-300.
GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Lond. Engl. *388*, 1459–1544.

Générations Futures (2013). Enquête EXPPERT II : des pesticides interdits et des perturbateurs endocriniens (PE) dans des fraises.
Générations Futures (2016a). Enquête EXPPERT 7 : des pesticides perturbateurs endocriniens dans des mueslis.
Générations Futures (2016b). Enquête EXPPERT 6 (analyses de puossières) : des riverains de zones cultivées exposés aux pesticides perturbateurs endocriniens chez eux, tout au long de l'année !
Générations Futures (2017). Enqu^te EXPPERT 9 : exposition aux pesticides pertubateurs endocriniens, 7 personnalités de l'écologie font analyser leurs cheveaux.
Ghosal, K., Vogt, D.L., Liang, M., Shen, Y., Lamb, B.T., and Pimplikar, S.W. (2009). Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 18367–18372.
Giambarella, U., Yamatsuji, T., Okamoto, T., Matsui, T., Ikezu, T., Murayama, Y., Levine, M.A., Katz, A., Gautam, N., and Nishimoto, I. (1997). G protein betagamma complex-mediated apoptosis by familial Alzheimer's disease mutant of APP. EMBO J. *16*, 4897–4907.
Gibbs, C.J., Asher, D.M., Kobrine, A., Amyx, H.L., Sulima, M.P., and Gajdusek, D.C. (1994). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *57*, 757–758.
Gilch, S., Chitoor, N., Taguchi, Y., Stuart, M., Jewell, J.E., and Schätzl, H.M. (2011). Chronic wasting disease. Top. Curr. Chem. *305*, 51–77.
Gioia, R., Offenberg, J.H., Gigliotti, C.L., Totten, L.A., Du, S., and Eisenreich, S.J. (2005). Atmospheric concentrations and deposition of organochlorine pesticides in the US Mid-Atlantic region. Atmos. Environ. *39*, 2309–2322.
Glatzel, M., Heppner, F.L., Albers, K.M., and Aguzzi, A. (2001). Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. Neuron *31*, 25–34.
Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. *120*, 885–890.
Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature *349*, 704–706.
Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. EMBO J. *8*, 393–399.
Goldfarb, L.G., Brown, P., McCombie, W.R., Goldgaber, D., Swergold, G.D., Wills, P.R., Cervenakova, L., Baron, H., Gibbs, C.J., and Gajdusek, D.C. (1991). Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 10926–10930.
Goldfarb, L.G., Brown, P., Haltia, M., Cathala, F., McCombie, W.R., Kovanen, J., Cervenáková, L., Goldin, L., Nieto, A., and Godec, M.S. (1992). Creutzfeldt-Jakob disease cosegregates with the codon 178Asn PRNP mutation in families of European origin. Ann. Neurol. *31*, 274–281.
Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. Science *235*, 877–880.
Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J., and Hope, J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. J. Gen. Virol. *75 (Pt 5)*, 989–995.

Goodman, Y., and Mattson, M.P. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. Exp. Neurol. *128*, 1–12.
Goold, R., McKinnon, C., Rabbanian, S., Collinge, J., Schiavo, G., and Tabrizi, S.J. (2013). Alternative fates of newly formed PrPSc upon prion conversion on the plasma membrane. J. Cell Sci. *126*, 3552–3562.
Gordon, I., Abdulla, E.M., Campbell, I.C., and Whatley, S.A. (1998). Phosmet induces up-regulation of surface levels of the cellular prion protein. Neuroreport *9*, 1391–1395.
Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D.T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., et al. (2009). Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. Nat. Cell Biol. *11*, 328–336.
Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V.A., and Priess, J.R. (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in Caenorhabditis elegans embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 775–779.
Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., and Cohen, F.E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 8342–8347.
Gralle, M., Oliveira, C.L.P., Guerreiro, L.H., McKinstry, W.J., Galatis, D., Masters, C.L., Cappai, R., Parker, M.W., Ramos, C.H.I., Torriani, I., et al. (2006). Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the human amyloid precursor protein. J. Mol. Biol. *357*, 493–508.
Gray, C.W., and Patel, A.J. (1993). Induction of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by bFGF in astrocytes. Neuroreport *4*, 811–814.
Greenberg, S.M., Vonsattel, J.P., Segal, A.Z., Chiu, R.I., Clatworthy, A.E., Liao, A., Hyman, B.T., and Rebeck, G.W. (1998). Association of apolipoprotein E epsilon2 and vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. Neurology *50*, 961–965.
Greenberg, S.M., Shin, Y., Grabowski, T.J., Cooper, G.E., Rebeck, G.W., Iglesias, S., Chapon, F., Tournier-Lasserve, E., and Baron, J.-C. (2003). Hemorrhagic stroke associated with the Iowa amyloid precursor protein mutation. Neurology *60*, 1020–1022.
Gremer, L., Schölzel, D., Schenk, C., Reinartz, E., Labahn, J., Ravelli, R.B.G., Tusche, M., Lopez-Iglesias, C., Hoyer, W., Heise, H., et al. (2017). Fibril structure of amyloid-β(1-42) by cryo-electron microscopy. Science *358*, 116–119.
Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. Nature *215*, 1043–1044.
Grimm, M.O.W., Mett, J., Stahlmann, C.P., Grösgen, S., Haupenthal, V.J., Blümel, T., Hundsdörfer, B., Zimmer, V.C., Mylonas, N.T., Tanila, H., et al. (2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic β- and γ-secretase cleavage regulates neprilysin expression. Front. Aging Neurosci. *7*, 77.
Gschwind, M., and Huber, G. (1995). Apoptotic cell death induced by beta-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. J. Neurochem. *65*, 292–300.

H

Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. Nature *357*, 500–503.
Haïk, S., and Brandel, J.-P. (2014). Infectious prion diseases in humans: Cannibalism, iatrogenicity and zoonoses. Infect. Genet. Evol. *26*, 303–312.

Hainfellner, J.A., Brantner-Inthaler, S., Cervenáková, L., Brown, P., Kitamoto, T., Tateishi, J., Diringer, H., Liberski, P.P., Regele, H., and Feucht, M. (1995). The original Gerstmann-Sträussler-Scheinker family of Austria: divergent clinicopathological phenotypes but constant PrP genotype. Brain Pathol. Zurich Switz. *5*, 201–211.
Haley, N.J., and Hoover, E.A. (2015). Chronic wasting disease of cervids: current knowledge and future perspectives. Annu. Rev. Anim. Biosci. *3*, 305–325.
Haley, N.J., Mathiason, C.K., Carver, S., Zabel, M., Telling, G.C., and Hoover, E.A. (2011). Detection of chronic wasting disease prions in salivary, urinary, and intestinal tissues of deer: potential mechanisms of prion shedding and transmission. J. Virol. *85*, 6309–6318.
Hamley, I.W. (2012). The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. Chem. Rev. *112*, 5147–5192.
Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E.A., Fuller, J., Hui, J.O., Bennett, B.D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T., et al. (2000). Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. J. Biol. Chem. *275*, 21099–21106.
Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D.R., Teplow, D., Hood, L., and Burlingame, A. (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. Arch. Biochem. Biophys. *274*, 1–13.
Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science *256*, 184–185.
Hartung, T. (2007). ESAC statement on the OECD adopted Test Guidelines for acute oral toxicity testing. Eur. Comm. Eur. Cent. Valid. Altern. Methods.
Hasebe, N., Fujita, Y., Ueno, M., Yoshimura, K., Fujino, Y., and Yamashita, T. (2013). Soluble β-amyloid Precursor Protein Alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. PloS One *8*, e82321.
Hasegawa, H., Sanjo, N., Chen, F., Gu, Y.-J., Shier, C., Petit, A., Kawarai, T., Katayama, T., Schmidt, S.D., Mathews, P.M., et al. (2004). Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. J. Biol. Chem. *279*, 46455–46463.
Hauw, J.J., Naccache, P.Y., Seilhean, D., Camilleri, S., Mokhtari, K., and Duyckaerts, C. (1995). [Neuropathology of non conventional infectious agents or prions]. Pathol. Biol. (Paris) *43*, 43–52.
Hawkes, C.A., Jayakody, N., Johnston, D.A., Bechmann, I., and Carare, R.O. (2014). Failure of perivascular drainage of β-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. Brain Pathol. Zurich Switz. *24*, 396–403.
Hayashi, Y., Kashiwagi, K., Ohta, J., Nakajima, M., Kawashima, T., and Yoshikawa, K. (1994). Alzheimer Amyloid Protein Precursor Enhances Proliferation of Neural Stem Cells from Fetal Rat Brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. *205*, 936–943.
Hayden, K.M., Norton, M.C., Darcey, D., Ostbye, T., Zandi, P.P., Breitner, J.C.S., Welsh-Bohmer, K.A., and Cache County Study Investigators (2010). Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. Neurology *74*, 1524–1530.
Head, M.W., and Ironside, J.W. (2012). Review: Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *38*, 296–310.
Healy, D.G., Falchi, M., O'Sullivan, S.S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C.P., Goldwurm, S., et al. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. Lancet Neurol. *7*, 583–590.
Heckmann, J., Lang, C., Petruch, F., Druschky, A., Erb, C., Brown, P., and Neundorfer, B. (1997). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *63*, 388–390.

Herrero-Hernández, E., Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M.J., Andrades, M.S., and Rodríguez-Cruz, M.S. (2016). Intra-annual trends of fungicide residues in waters from vineyard areas in La Rioja region of northern Spain. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. *23*, 22924–22936.
Herrmann, U.S., Schütz, A.K., Shirani, H., Huang, D., Saban, D., Nuvolone, M., Li, B., Ballmer, B., Åslund, A.K.O., Mason, J.J., et al. (2015). Structure-based drug design identifies polythiophenes as antiprion compounds. Sci. Transl. Med. *7*, 299ra123.
Hesse, L., Beher, D., Masters, C.L., and Multhaup, G. (1994). The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. FEBS Lett. *349*, 109–116.
Hewitt, P.E., Llewelyn, C.A., Mackenzie, J., and Will, R.G. (2006). Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. Vox Sang. *91*, 221–230.
Hill, A.F., Zeidler, M., Ironside, J., and Collinge, J. (1997a). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. Lancet Lond. Engl. *349*, 99–100.
Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., and Lantos, P. (1997b). The same prion strain causes vCJD and BSE. Nature *389*, 448–450, 526.
Hilton, D.A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J.W., and Zajicek, J. (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet Lond. Engl. *352*, 703–704.
Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., et al. (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 2892–2897.
Hornabrook, R.W. (1968). Kuru--a subacute cerebellar degeneration. The natural history and clinical features. Brain J. Neurol. *91*, 53–74.
Hornshaw, M., McDermott, J., and Candy, J. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. Biochem Biophys Res Commun *207*, 621–629.
Hou, Y., Ghosh, P., Wan, R., Ouyang, X., Cheng, H., Mattson, M.P., and Cheng, A. (2014). Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes mediate an early inhibitory effect of amyloid beta1-42 on neural progenitor cell proliferation. Neurobiol. Aging *35*, 975–989.
Howell, S., Nalbantoglu, J., and Crine, P. (1995). Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. Peptides *16*, 647–652.
Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science *274*, 99–102.
Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. Neuron *52*, 831–843.
Huang, Y., Weisgraber, K.H., Mucke, L., and Mahley, R.W. (2004). Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. J. Mol. Neurosci. MN *23*, 189–204.
Huang, Z., Prusiner, S., and Cohen, F. (1996). Structures of prion proteins and conformational models for prion diseases. Cuur Top Microbiol Immunol *207*, 49–67.
Huber, G., Bailly, Y., Martin, J.R., Mariani, J., and Brugg, B. (1997). Synaptic beta-amyloid precursor proteins increase with learning capacity in rats. Neuroscience *80*, 313–320.

Huc-Brandt, S., Hieu, N., Imberdis, T., Cubedo, N., Silhol, M., Leighton, P.L.A., Domaschke, T., Allison, W.T., Perrier, V., and Rossel, M. (2014). Zebrafish Prion Protein PrP2 Controls Collective Migration Process during Lateral Line Sensory System Development. PLoS ONE *9*.
Hung, H., Blanchard, P., Halsall, C.J., Bidleman, T.F., Stern, G.A., Fellin, P., Muir, D.C.G., Barrie, L.A., Jantunen, L.M., Helm, P.A., et al. (2005). Temporal and spatial variabilities of atmospheric polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine (OC) pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Canadian Arctic: results from a decade of monitoring. Sci. Total Environ. *342*, 119–144.
Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. EMBO J. *30*, 3481–3500.
Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., et al. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. Mol. Cell. Neurosci. *14*, 419–427.

I

Imberdis, T., Ayrolles-Torro, A., Verdier, J.-M., and Perrier, V. (2013). Thienyl pyrimidine derivatives with PrP(Sc) oligomer-inducing activity are a promising tool to study prions. Curr. Top. Med. Chem. *13*, 2477–2483.
Imberdis, T., Ayrolles-Torro, A., Duarte Rodrigues, A., Torrent, J., Alvarez-Martinez, M.T., Kovacs, G.G., Verdier, J.-M., Robitzer, M., and Perrier, V. (2016). A Fluorescent Oligothiophene-Bis-Triazine ligand interacts with PrP fibrils and detects SDS-resistant oligomers in human prion diseases. Mol. Neurodegener. *11*, 11.
Inomata, H., Nakamura, Y., Hayakawa, A., Takata, H., Suzuki, T., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (2003). A scaffold protein JIP-1b enhances amyloid precursor protein phosphorylation by JNK and its association with kinesin light chain 1. J. Biol. Chem. *278*, 22946–22955.
INSERM (2013). Pesticides: effets sur la santé. Expertise collective. Synthèse et recommandations.
Iqbal, K., Liu, F., and Gong, C.-X. (2016). Tau and neurodegenerative disease: the story so far. Nat. Rev. Neurol. *12*, 15–27.
Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., et al. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. Nat. Med. *6*, 143–150.
Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J., and Saido, T.C. (2001). Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. Science *292*, 1550–1552.
Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). Neuron *13*, 45–53.

J

Jackson, G., Murray, I., Hosszu, L., Gibbs, N., Waltho, J., Clarke, A., and Collinge, J. (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 8531–8535.

Jacquet, F., Butault, J., and Guichard, L. (2011). An economic analysis of the possibility of reducing oesticides in the French field crops. Ecol. Econ. *70*, 1638–1648.
Jakob, A. (1921). Uber eigenartige Erkrakung des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Z Neurol Psychiatr *64*, 147–228.
Jellinger, K.A., and Attems, J. (2003). Incidence of cerebrovascular lesions in Alzheimer's disease: a postmortem study. Acta Neuropathol. (Berl.) *105*, 14–17.
Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., and Zhao, B. (2017). The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. J. Alzheimers Dis. JAD *58*, 1–15.
Jiang, X.-C., Li, Z., Liu, R., Yang, X.P., Pan, M., Lagrost, L., Fisher, E.A., and Williams, K.J. (2005). Phospholipid transfer protein deficiency impairs apolipoprotein-B secretion from hepatocytes by stimulating a proteolytic pathway through a relative deficiency of vitamin E and an increase in intracellular oxidants. J. Biol. Chem. *280*, 18336–18340.
Jiang, X.-C., Jin, W., and Hussain, M.M. (2012). The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on lipoprotein metabolism. Nutr. Metab. *9*, 75.
Johansson, S., Radesäter, A.-C., Cowburn, R.F., Thyberg, J., and Luthman, J. (2006). Modelling of amyloid beta-peptide induced lesions using roller-drum incubation of hippocampal slice cultures from neonatal rats. Exp. Brain Res. *168*, 11–24.
Johnson, K.A., Schultz, A., Betensky, R.A., Becker, J.A., Sepulcre, J., Rentz, D., Mormino, E., Chhatwal, J., Amariglio, R., Papp, K., et al. (2016). Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. Ann. Neurol. *79*, 110–119.
Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. Nature *488*, 96–99.

K

Kadavath, H., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Biernat, J., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015). Folding of the Tau Protein on Microtubules. Angew. Chem. Int. Ed Engl. *54*, 10347–10351.
Kanaani, J., Prusiner, S.B., Diacovo, J., Baekkeskov, S., and Legname, G. (2005). Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. J. Neurochem. *95*, 1373–1386.
Kanekiyo, T., Liu, C.-C., Shinohara, M., Li, J., and Bu, G. (2012). LRP1 in brain vascular smooth muscle cells mediates local clearance of Alzheimer's amyloid-β. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *32*, 16458–16465.
Kanekiyo, T., Cirrito, J.R., Liu, C.-C., Shinohara, M., Li, J., Schuler, D.R., Shinohara, M., Holtzman, D.M., and Bu, G. (2013). Neuronal clearance of amyloid-β by endocytic receptor LRP1. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 19276–19283.
Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M., Wallace, A.C., James, T.L., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1997). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 10069–10074.
Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature *325*, 733–736.
Kapasi, Z.F., Burton, G.F., Shultz, L.D., Tew, J.G., and Szakal, A.K. (1993). Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *150*, 2648–2658.

Kero, M., Paetau, A., Polvikoski, T., Tanskanen, M., Sulkava, R., Jansson, L., Myllykangas, L., and Tienari, P.J. (2013). Amyloid precursor protein (APP) A673T mutation in the elderly Finnish population. Neurobiol. Aging *34*, 1518.e1-3.
Khosravani, H., Zhang, Y., Tsutsui, S., Hameed, S., Altier, C., Hamid, J., Chen, L., Villemaire, M., Ali, Z., Jirik, F.R., et al. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. J. Cell Biol. *181*, 551–565.
Kim, J., and Holtzman, D.M. (2010). Medicine. Prion-like behavior of amyloid-beta. Science *330*, 918–919.
Kimberlin, R.H. (1982). Scrapie agent: prions or virinos? Nature *297*, 107–108.
Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Guénette, S.Y., and Selkoe, D.J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. J. Biol. Chem. *276*, 40288–40292.
Kimbrough, I.F., Robel, S., Roberson, E.D., and Sontheimer, H. (2015). Vascular amyloidosis impairs the gliovascular unit in a mouse model of Alzheimer's disease. Brain J. Neurol. *138*, 3716–3733.
Kimura, R., and Ohno, M. (2009). Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. Neurobiol. Dis. *33*, 229–235.
Kingsbury, D.T., Kasper, K.C., Stites, D.P., Watson, J.D., Hogan, R.N., and Prusiner, S.B. (1983). Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *131*, 491–496.
Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C.M., Irizarry, M.C., and Hyman, B.T. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. J. Cell Sci. *116*, 3339–3346.
Kirazov, E., Kirazov, L., Bigl, V., and Schliebs, R. (2001). Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci. *19*, 287–296.
Klatzo, I., Gajdusek, D.C., and Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *8*, 799–847.
Klein, A.M., Kowall, N.W., and Ferrante, R.J. (1999). Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex. Ann. N. Y. Acad. Sci. *893*, 314–320.
Klein, C., Kramer, E.-M., Cardine, A.-M., Schraven, B., Brandt, R., and Trotter, J. (2002). Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 698–707.
Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. Biochem. J. *343 Pt 2*, 371–375.
Kong, Q., Huang, S., Zou, W., Vanegas, D., Wang, M., Wu, D., Yuan, J., Zheng, M., Bai, H., Deng, H., et al. (2005). Chronic Wasting Disease of Elk: Transmissibility to Humans Examined by Transgenic Mouse Models. J. Neurosci. *25*, 7944–7949.
Konold, T., Moore, S.J., Bellworthy, S.J., Terry, L.A., Thorne, L., Ramsay, A., Salguero, F.J., Simmons, M.M., and Simmons, H.A. (2013). Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. BMC Vet. Res. *9*, 99.
Konold, T., Thorne, L., Simmons, H.A., Hawkins, S.A.C., Simmons, M.M., and González, L. (2016). Evidence of scrapie transmission to sheep via goat milk. BMC Vet. Res. *12*, 208.
Koo, E.H., and Squazzo, S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. J. Biol. Chem. *269*, 17386–17389.

Koo, E.H., Squazzo, S.L., Selkoe, D.J., and Koo, C.H. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. J. Cell Sci. *109 (Pt 5)*, 991–998.
Kralovicova, S., Fontaine, S.N., Alderton, A., Alderman, J., Ragnarsdottir, K.V., Collins, S.J., and Brown, D.R. (2009). The effects of prion protein expression on metal metabolism. Mol. Cell. Neurosci. *41*, 135–147.
Kristensen, A.S., Jenkins, M.A., Banke, T.G., Schousboe, A., Makino, Y., Johnson, R.C., Huganir, R., and Traynelis, S.F. (2011). Mechanism of CaMKII regulation of AMPA receptor gating. Nat. Neurosci. *14*, 727–735.
Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. EMBO J. *29*, 3020–3032.
Kujala, P., Raymond, C.R., Romeijn, M., Godsave, S.F., Kasteren, S.I. van, Wille, H., Prusiner, S.B., Mabbott, N.A., and Peters, P.J. (2011). Prion Uptake in the Gut: Identification of the First Uptake and Replication Sites. PLOS Pathog. *7*, e1002449.
Kukull, W.A., Higdon, R., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Schellenberg, G.D., van Belle, G., Jolley, L., and Larson, E.B. (2002). Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. Arch. Neurol. *59*, 1737–1746.
Kumar, N., Boeve, B.F., Boot, B.P., Orr, C.F., Duffy, J., Woodruff, B.K., Nair, A.K., Ellison, J., Kuntz, K., Kantarci, K., et al. (2011). Clinical characterization of a kindred with a novel 12-octapeptide repeat insertion in the prion protein gene. Arch. Neurol. *68*, 1165–1170.
Kurochkin, I.V., and Goto, S. (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. FEBS Lett. *345*, 33–37.
Kurochkin, I.V., Guarnera, E., and Berezovsky, I.N. (2018). Insulin-Degrading Enzyme in the Fight against Alzheimer's Disease. Trends Pharmacol. Sci. *39*, 49–58.
Kurschner, C., and Morgan, J.I. (1995). The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. Brain Res. Mol. Brain Res. *30*, 165–168.

L

LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 499–509.
Laffont-Proust, I., Faucheux, B.A., Hässig, R., Sazdovitch, V., Simon, S., Grassi, J., Hauw, J.-J., Moya, K.L., and Haïk, S. (2005). The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. FEBS Lett. *579*, 6333–6337.
Lafon, P.-A., Imberdis, T., Wang, Y., Torrent, J., Robitzer, M., Huetter, E., Alvarez-Martinez, M.-T., Chevallier, N., Givalois, L., Desrumaux, C., et al. (2018). Low doses of bioherbicide favour prion aggregation and propagation in vivo. Sci. Rep. *8*.
Lamb, B.T., Sisodia, S.S., Lawler, A.M., Slunt, H.H., Kitt, C.A., Kearns, W.G., Pearson, P.L., Price, D.L., and Gearhart, J.D. (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. Nat. Genet. *5*, 22–30.
Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 3922–3927.
Langevin, C., Gousset, K., Costanzo, M., Richard-Le Goff, O., and Zurzolo, C. (2010). Characterization of the role of dendritic cells in prion transfer to primary neurons. Biochem. J. *431*, 189–198.

Lasmézas, C.I., Deslys, J.P., Demaimay, R., Adjou, K.T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J., and Hauw, J.J. (1996). BSE transmission to macaques. Nature *381*, 743–744.
de Lau, L.M.L., and Breteler, M.M.B. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. Lancet Neurol. *5*, 525–535.
Laude, H., and Béringue, V. (2009). [Newly discovered forms of prion diseases in ruminants]. Pathol. Biol. (Paris) *57*, 117–126.
Laudon, H., Hansson, E.M., Melén, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., and Näslund, J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. J. Biol. Chem. *280*, 35352–35360.
Laurén, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., and Strittmatter, S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature *457*, 1128–1132.
LaVoie, M.J., Fraering, P.C., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Kimberly, W.T., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2003). Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. J. Biol. Chem. *278*, 37213–37222.
Le Pichon, C.E., Valley, M.T., Polymenidou, M., Chesler, A.T., Sagdullaev, B.T., Aguzzi, A., and Firestein, S. (2009). Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. Nat. Neurosci. *12*, 60–69.
Lee, S., Antony, L., Hartmann, R., Knaus, K.J., Surewicz, K., Surewicz, W.K., and Yee, V.C. (2010). Conformational diversity in prion protein variants influences intermolecular beta-sheet formation. EMBO J. *29*, 251–262.
Lee, S.-F., Shah, S., Yu, C., Wigley, W.C., Li, H., Lim, M., Pedersen, K., Han, W., Thomas, P., Lundkvist, J., et al. (2004). A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex. J. Biol. Chem. *279*, 4144–4152.
Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.-O.B., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2004). Synthetic mammalian prions. Science *305*, 673–676.
Lehmann, S., Milhavet, O., and Mangé, A. (1999). Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother. *53*, 39–46.
Leighton, P.L.A., and Allison, W.T. (2016). Protein Misfolding in Prion and Prion-Like Diseases: Reconsidering a Required Role for Protein Loss-of-Function. J. Alzheimers Dis. JAD *54*, 3–29.
Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P., and Selkoe, D.J. (2003). Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. Neuron *40*, 1087–1093.
Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell *141*, 1117–1134.
Lesné, S., Ali, C., Gabriel, C., Croci, N., MacKenzie, E.T., Glabe, C.G., Plotkine, M., Marchand-Verrecchia, C., Vivien, D., and Buisson, A. (2005). NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 9367–9377.
Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature *440*, 352–357.
Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., and Wang, K. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science *269*, 973–977.
Li, A., and Harris, D.A. (2005). Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. J. Biol. Chem. *280*, 17430–17434.

Li, G., Kim, C., Kim, J., Yoon, H., Zhou, H., and Kim, J. (2015). Common Pesticide, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), Increases Amyloid-β Levels by Impairing the Function of ABCA1 and IDE: Implication for Alzheimer's Disease. J. Alzheimers Dis. JAD *46*, 109–122.
Li, J., Zhang, G., Guo, L., Xu, W., Li, X., Lee, C., Ding, A., and Wang, T. (2007). Organochlorine pesticides in the atmosphere of Guangzhou and Hong Kong: Regional sources and long-range atmospheric transport. Atmos. Environ. *41*, 3889–3903.
Li, W., Wu, Y., Min, F., Li, Z., Huang, J., and Huang, R. (2010a). A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid-β42 and thiorphan. Metab. Brain Dis. *25*, 277–284.
Li, Z., Jo, J., Jia, J.-M., Lo, S.-C., Whitcomb, D.J., Jiao, S., Cho, K., and Sheng, M. (2010b). Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. Cell *141*, 859–871.
Liang, J., and Kong, Q. (2012). α-Cleavage of cellular prion protein. Prion *6*, 453–460.
Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A.M., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Brentani, R.R. (2008). Physiology of the prion protein. Physiol. Rev. *88*, 673–728.
Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H., and Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. Nat. Rev. Neurol. *9*, 106–118.
Liu, C.-C., Hu, J., Zhao, N., Wang, J., Wang, N., Cirrito, J.R., Kanekiyo, T., Holtzman, D.M., and Bu, G. (2017). Astrocytic LRP1 Mediates Brain Aβ Clearance and Impacts Amyloid Deposition. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *37*, 4023–4031.
Liu, R., Iqbal, J., Yeang, C., Wang, D.Q.-H., Hussain, M.M., and Jiang, X.-C. (2007). Phospholipid transfer protein-deficient mice absorb less cholesterol. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *27*, 2014–2021.
Liu, S.-J., Gasperini, R., Foa, L., and Small, D.H. (2010). Amyloid-beta decreases cell-surface AMPA receptors by increasing intracellular calcium and phosphorylation of GluR2. J. Alzheimers Dis. JAD *21*, 655–666.
Lombardo, S., Catteau, J., Besson, M., and Maskos, U. (2016). A role for β2* nicotinic receptors in a model of local amyloid pathology induced in dentate gyrus. Neurobiol. Aging *46*, 221–234.
Lopes, M.H., Hajj, G.N.M., Muras, A.G., Mancini, G.L., Castro, R.M.P.S., Ribeiro, K.C.B., Brentani, R.R., Linden, R., and Martins, V.R. (2005). Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 11330–11339.
Lopez Garcia, F., Zahn, R., Riek, R., and Wüthrich, K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 8334–8339.
LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 10369–10373.
Lott, I.T., and Head, E. (2005). Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. Neurobiol. Aging *26*, 383–389.
Ludewigs, H., Zuber, C., Vana, K., Nikles, D., Zerr, I., and Weiss, S. (2007). Therapeutic approaches for prion disorders. Expert Rev. Anti Infect. Ther. *5*, 613–630.
Lukowicz, C., Ellero-Simatos, S., Régnier, M., Polizzi, A., Lasserre, F., Montagner, A., Lippi, Y., Jamin, E.L., Martin, J.-F., Naylies, C., et al. (2018). Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. Environ. Health Perspect. *126*, 067007.
Luo, W., Wang, H., Li, H., Kim, B.S., Shah, S., Lee, H.-J., Thinakaran, G., Kim, T.-W., Yu, G., and Xu, H. (2003a). PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. J. Biol. Chem. *278*, 7850–7854.

Luo, Y., Bolon, B., Damore, M.A., Fitzpatrick, D., Liu, H., Zhang, J., Yan, Q., Vassar, R., and Citron, M. (2003b). BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. Neurobiol. Dis. *14*, 81–88.

M

Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 5644–5651.
Málaga-Trillo, E., Solis, G.P., Schrock, Y., Geiss, C., Luncz, L., Thomanetz, V., and Stuermer, C.A.O. (2009). Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. PLoS Biol. *7*, e55.
Mangé, A., Milhavet, O., Umlauf, D., Harris, D., and Lehmann, S. (2002). PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells. FEBS Lett. *514*, 159–162.
Mangé, A., Béranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y., and Lehmann, S. (2004). Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. Biol. Cell *96*, 125–132.
Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., and Di Monte, D.A. (2002). The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. J. Biol. Chem. *277*, 1641–1644.
Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I., and Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. Mol. Neurobiol. *8*, 121–127.
Manuelidis, L., and Fritch, W. (1996). Infectivity and host responses in Creutzfeldt-Jakob disease. Virology *216*, 46–59.
Marcon, G., Indaco, A., Di Fede, G., Suardi, S., Finato, N., Moretti, V., Micoli, S., Fociani, P., Zerbi, P., Pincherle, A., et al. (2014). Panencephalopathic Creutzfeldt-Jakob disease with distinct pattern of prion protein deposition in a patient with D178N mutation and homozygosity for valine at codon 129 of the prion protein Gene. Brain Pathol. Zurich Switz. *24*, 148–151.
van der Mark, M., Brouwer, M., Kromhout, H., Nijssen, P., Huss, A., and Vermeulen, R. (2012). Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. Environ. Health Perspect. *120*, 340–347.
Marr, R.A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M.S., Hersh, L.B., Gage, F.H., Verma, I.M., and Masliah, E. (2003). Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 1992–1996.
Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *82*, 4245–4249.
Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling, R.A., and Cummings, J.L. (2015). Alzheimer's disease. Nat. Rev. Dis. Primer *1*, 15056.
Mastrianni, J.A. (2010). The genetics of prion diseases. Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet. *12*, 187–195.
Mathiason, C.K., Powers, J.G., Dahmes, S.J., Osborn, D.A., Miller, K.V., Warren, R.J., Mason, G.L., Hays, S.A., Hayes-Klug, J., Seelig, D.M., et al. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. Science *314*, 133–136.
Matsui, T., Ingelsson, M., Fukumoto, H., Ramasamy, K., Kowa, H., Frosch, M.P., Irizarry, M.C., and Hyman, B.T. (2007). Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. Brain Res. *1161*, 116–123.

Mattei, V., Barenco, M.G., Tasciotti, V., Garofalo, T., Longo, A., Boller, K., Löwer, J., Misasi, R., Montrasio, F., and Sorice, M. (2009). Paracrine Diffusion of PrPC and Propagation of Prion Infectivity by Plasma Membrane-Derived Microvesicles. PLoS ONE *4*.
Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. Neuron *10*, 243–254.
McBride, P.A., Schulz-Schaeffer, W.J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H.A., and Beekes, M. (2001). Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. J. Virol. *75*, 9320–9327.
McCann, S.J., LeCouteur, D.G., Green, A.C., Brayne, C., Johnson, A.G., Chan, D., McManus, M.E., and Pond, S.M. (1998). The epidemiology of Parkinson's disease in an Australian population. Neuroepidemiology *17*, 310–317.
McDermott, J.R., and Gibson, A.M. (1997). Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. Neurochem. Res. *22*, 49–56.
McDonald, A.J., Dibble, J.P., Evans, E.G.B., and Millhauser, G.L. (2014). A new paradigm for enzymatic control of α-cleavage and β-cleavage of the prion protein. J. Biol. Chem. *289*, 803–813.
Mead, S. (2006). Prion disease genetics. Eur. J. Hum. Genet. EJHG *14*, 273–281.
Mercader, J.V., Esteve-Turrillas, F.A., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., and Abad-Fuentes, A. (2012). Antibody generation and immunoassay development in diverse formats for pyrimethanil specific and sensitive analysis. The Analyst *137*, 5672–5679.
Merz, P.A., Somerville, R.A., Wisniewski, H.M., and Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. Acta Neuropathol. (Berl.) *54*, 63–74.
Mestre-Francés, N., Nicot, S., Rouland, S., Biacabe, A.-G., Quadrio, I., Perret-Liaudet, A., Baron, T., and Verdier, J.-M. (2012). Oral transmission of L-type bovine spongiform encephalopathy in primate model. Emerg. Infect. Dis. *18*, 142–145.
Milosch, N., Tanriöver, G., Kundu, A., Rami, A., François, J.-C., Baumkötter, F., Weyer, S.W., Samanta, A., Jäschke, A., Brod, F., et al. (2014). Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPPα-induced activation of the Akt survival pathway. Cell Death Dis. *5*, e1391.
Milusheva, E., Baranyi, M., Kittel, A., Sperlágh, B., and Vizi, E.S. (2005). Increased sensitivity of striatal dopamine release to H2O2 upon chronic rotenone treatment. Free Radic. Biol. Med. *39*, 133–142.
Mizuguchi, M., Ikeda, K., and Kim, S.U. (1992). Differential distribution of cellular forms of beta-amyloid precursor protein in murine glial cell cultures. Brain Res. *584*, 219–225.
Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., et al. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. J. Mol. Biol. *292*, 797–817.
Morales, R., Duran-Aniotz, C., Castilla, J., Estrada, L.D., and Soto, C. (2012). De novo induction of amyloid-β deposition in vivo. Mol. Psychiatry *17*, 1347–1353.
Moreno, H., Yu, E., Pigino, G., Hernandez, A.I., Kim, N., Moreira, J.E., Sugimori, M., and Llinás, R.R. (2009). Synaptic transmission block by presynaptic injection of oligomeric amyloid beta. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 5901–5906.
Moriarty, T.M., Padrell, E., Carty, D.J., Omri, G., Landau, E.M., and Iyengar, R. (1990). Go protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. Nature *343*, 79–82.

Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J., Lehmann, S., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2000). Signal transduction through prion protein. Science *289*, 1925–1928.
Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., Moldal, T., Valheim, M., Moum, T., and Benestad, S.L. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. J. Gen. Virol. *86*, 231–235.
Mouri, A., Zou, L.-B., Iwata, N., Saido, T.C., Wang, D., Wang, M.-W., Noda, Y., and Nabeshima, T. (2006). Inhibition of neprilysin by thiorphan (i.c.v.) causes an accumulation of amyloid beta and impairment of learning and memory. Behav. Brain Res. *168*, 83–91.
Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 4050–4058.
Müller, T., Meyer, H.E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. Prog. Neurobiol. *85*, 393–406.
Multhaup, G., Bush, A.I., Pollwein, P., and Masters, C.L. (1994). Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP). FEBS Lett. *355*, 151–154.
Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1996). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). Science *271*, 1406–1409.
Multigner, L., Kadhel, P., Rouget, F., Blanchet, P., and Cordier, S. (2016). Chlordecone exposure and adverse effects in French West Indies populations. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. *23*, 3–8.
Munter, L.-M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K.E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., and Multhaup, G. (2007). GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. EMBO J. *26*, 1702–1712.
Mura, T., Dartigues, J.-F., and Berr, C. (2010). How many dementia cases in France and Europe? Alternative projections and scenarios 2010-2050. Eur. J. Neurol. *17*, 252–259.
Murugan, K., Panneerselvam, C., Subramaniam, J., Madhiyazhagan, P., Hwang, J.-S., Wang, L., Dinesh, D., Suresh, U., Roni, M., Higuchi, A., et al. (2016). Eco-friendly drugs from the marine environment: spongeweed-synthesized silver nanoparticles are highly effective on Plasmodium falciparum and its vector Anopheles stephensi, with little non-target effects on predatory copepods. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. *23*, 16671–16685.

N

Nalbantoglu, J., Tirado-Santiago, G., Lahsaïni, A., Poirier, J., Goncalves, O., Verge, G., Momoli, F., Welner, S.A., Massicotte, G., Julien, J.P., et al. (1997). Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. Nature *387*, 500–505.
Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2013). The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. FEBS Lett. *587*, 2046–2054.
Naseer, M.I., Bibi, F., Alqahtani, M.H., Chaudhary, A.G., Azhar, E.I., Kamal, M.A., and Yasir, M. (2014). Role of gut microbiota in obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. CNS Neurol. Disord. Drug Targets *13*, 305–311.
Nasri, A., Valverde, A.J., Roche, D.B., Desrumaux, C., Clair, P., Beyrem, H., Chaloin, L.,

Ghysen, A., and Perrier, V. (2016). Neurotoxicity of a Biopesticide Analog on Zebrafish Larvae at Nanomolar Concentrations. Int. J. Mol. Sci. *17*.
Naudet, N., Antier, E., Gaillard, D., Morignat, E., Lakhdar, L., Baron, T., and Bencsik, A. (2017). Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α-Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α-Synuclein Transgenic Mice. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *76*, 1046–1057.
Newell, A.J., Sue, L.I., Scott, S., Rauschkolb, P.K., Walker, D.G., Potter, P.E., and Beach, T.G. (2003). Thiorphan-induced neprilysin inhibition raises amyloid beta levels in rabbit cortex and cerebrospinal fluid. Neurosci. Lett. *350*, 178–180.
Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D.M., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature *457*, 981–989.
Nishida, N., Harris, D.A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavet, O., and Lehmann, S. (2000). Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. J. Virol. *74*, 320–325.
Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., and Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). Nature *362*, 75–79.
Nistor, M., Don, M., Parekh, M., Sarsoza, F., Goodus, M., Lopez, G.E., Kawas, C., Leverenz, J., Doran, E., Lott, I.T., et al. (2007). Alpha- and beta-secretase activity as a function of age and beta-amyloid in Down syndrome and normal brain. Neurobiol. Aging *28*, 1493–1506.
Nivsarkar, M., Cherian, B., and Padh, H. (2001). Alpha-terthienyl: A plant-derived new generation insecticide. Curr Sci *81*, 667–672.
Nizzari, M., Thellung, S., Corsaro, A., Villa, V., Pagano, A., Porcile, C., Russo, C., and Florio, T. (2012). Neurodegeneration in Alzheimer disease: role of amyloid precursor protein and presenilin 1 intracellular signaling. J. Toxicol. *2012*, 187297.

O

Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 10129–10140.
Obregon, D., Hou, H., Deng, J., Giunta, B., Tian, J., Darlington, D., Shahaduzzaman, M., Zhu, Y., Mori, T., Mattson, M.P., et al. (2012). Soluble amyloid precursor protein-α modulates β-secretase activity and amyloid-β generation. Nat. Commun. *3*, 777.
OECD (2018). Care needed: improving the lives of people with dementia, OECD Health Policy Studies, OECD Publishing, Paris.
Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., and Hood, L.E. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell *40*, 735–746.
Ohno, M., Cole, S.L., Yasvoina, M., Zhao, J., Citron, M., Berry, R., Disterhoft, J.F., and Vassar, R. (2007). BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. Neurobiol. Dis. *26*, 134–145.
Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., and Nishimoto, I. (1995). Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. J. Biol. Chem. *270*, 4205–4208.

Okamura, N., and Yanai, K. (2017). Brain imaging: Applications of tau PET imaging. Nat. Rev. Neurol. *13*, 197–198.
Omtri, R.S., Davidson, M.W., Arumugam, B., Poduslo, J.F., and Kandimalla, K.K. (2012). Differences in the cellular uptake and intracellular itineraries of amyloid beta proteins 40 and 42: ramifications for the Alzheimer's drug discovery. Mol. Pharm. *9*, 1887–1897.
Ossowska, K., Wardas, J., Smiałowska, M., Kuter, K., Lenda, T., Wierońska, J.M., Zieba, B., Nowak, P., Dabrowska, J., Bortel, A., et al. (2005). A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? Eur. J. Neurosci. *22*, 1294–1304.
Ott, A., Breteler, M.M., van Harskamp, F., Claus, J.J., van der Cammen, T.J., Grobbee, D.E., and Hofman, A. (1995). Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. BMJ *310*, 970–973.
Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A., and Breteler, M.M. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. Neurology *53*, 1937–1942.
Owen, F., Poulter, M., Lofthouse, R., Collinge, J., Crow, T.J., Risby, D., Baker, H.F., Ridley, R.M., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1989). Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet Lond. Engl. *1*, 51–52.

P

Padurariu, M., Ciobica, A., Mavroudis, I., Fotiou, D., and Baloyannis, S. (2012). Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. Psychiatr. Danub. *24*, 152–158.
Pająk, B., Kania, E., and Orzechowski, A. (2016). Killing Me Softly: Connotations to Unfolded Protein Response and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. Oxid. Med. Cell. Longev. *2016*, 1805304.
Palmer, M.S., Dryden, A.J., Hughes, J.T., and Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Nature *352*, 340–342.
Pan, K., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R., Cohen, F., et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 10962–10966.
PAN Europe (2008). Etude vin de PAN-Europe / MDRGF. Etude sur la présence de résidus de pesticides dans le vin.
Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., Jung, R., Jackson, S., Gille, G., Spillantini, M.G., Reichmann, H., et al. (2010). Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. PloS One *5*, e8762.
Papasozomenos, S.C., and Binder, L.I. (1987). Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. Cell Motil. Cytoskeleton *8*, 210–226.
Parameshwaran, K., Sims, C., Kanju, P., Vaithianathan, T., Shonesy, B.C., Dhanasekaran, M., Bahr, B.A., and Suppiramaniam, V. (2007). Amyloid beta-peptide Abeta(1-42) but not Abeta(1-40) attenuates synaptic AMPA receptor function. Synap. N. Y. N *61*, 367–374.
Parizek, P., Roeckl, C., Weber, J., Flechsig, E., Aguzzi, A., and Raeber, A.J. (2001). Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. J. Biol. Chem. *276*, 44627–44632.
Park, J.S., Shin, S.K., Kim, W.I., and Kim, B.H. (2011). Residual levels and identify possible sources of organochlorine pesticides in Korea atmosphere. Atmos. Environ. *45*, 7496–7502.

Parkin, E.T., Watt, N.T., Hussain, I., Eckman, E.A., Eckman, C.B., Manson, J.C., Baybutt, H.N., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2007). Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 11062–11067.
Parrón, T., Requena, M., Hernández, A.F., and Alarcón, R. (2011). Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. Toxicol. Appl. Pharmacol. *256*, 379–385.
Parsons, M.P., and Raymond, L.A. (2014). Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. Neuron *82*, 279–293.
Patterson, A.T., Kaffenberger, B.H., Keller, R.A., and Elston, D.M. (2016). Skin diseases associated with Agent Orange and other organochlorine exposures. J. Am. Acad. Dermatol. *74*, 143–170.
Pattison, I.H., and Jones, K.M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. Vet. Rec. *80*, 2–9.
Pattison, I.H., and Millson, G.C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. J. Comp. Pathol. *71*, 101–109.
Pattison, I.H., Hoare, M.N., Jebbett, J.N., and Watson, W.A. (1972). Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. Vet. Rec. *90*, 465–468.
Peden, A.H., Head, M.W., Ritchie, D.L., Bell, J.E., and Ironside, J.W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. Lancet Lond. Engl. *364*, 527–529.
Perera, W.S., and Hooper, N.M. (2001). Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. Curr. Biol. CB *11*, 519–523.
Perrier, V., Imberdis, T., Lafon, P.-A., Cefis, M., Wang, Y., Huetter, E., Arnaud, J.-D., Alvarez-Martinez, T., Le Guern, N., Maquart, G., et al. (2017). Plasma cholesterol level determines in vivo prion propagation. J. Lipid Res. *58*, 1950–1961.
Pflanzner, T., Petsch, B., André-Dohmen, B., Müller-Schiffmann, A., Tschickardt, S., Weggen, S., Stitz, L., Korth, C., and Pietrzik, C.U. (2012). Cellular prion protein participates in amyloid-β transcytosis across the blood–brain barrier. J. Cereb. Blood Flow Metab. *32*, 628–632.
Pietri, M., Dakowski, C., Hannaoui, S., Alleaume-Butaux, A., Hernandez-Rapp, J., Ragagnin, A., Mouillet-Richard, S., Haik, S., Bailly, Y., Peyrin, J.-M., et al. (2013). PDK1 decreases TACE-mediated α-secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases. Nat. Med. *19*, 1124–1131.
Pigino, G., Morfini, G., Atagi, Y., Deshpande, A., Yu, C., Jungbauer, L., LaDu, M., Busciglio, J., and Brady, S. (2009). Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 5907–5912.
Pinheiro, T.J.T. (2006). The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. Chem. Phys. Lipids *141*, 66–71.
Pirisinu, L., Tran, L., Chiappini, B., Vanni, I., Di Bari, M.A., Vaccari, G., Vikøren, T., Madslien, K.I., Våge, J., Spraker, T., et al. (2018). Novel Type of Chronic Wasting Disease Detected in Moose (Alces alces), Norway. Emerg. Infect. Dis. *24*, 2210–2218.
Podlisny, M.B., Tolan, D.R., and Selkoe, D.J. (1991). Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. *138*, 1423–1435.

Podlisny, M.B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., et al. (1997). Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. Neurobiol. Dis. *3*, 325–337.
Poggiolini, I., Saverioni, D., and Parchi, P. (2013). Prion protein misfolding, strains, and neurotoxicity: an update from studies on Mammalian prions. Int. J. Cell Biol. *2013*, 910314.
Poirier, J., Minnich, A., and Davignon, J. (1995). Apolipoprotein E, synaptic plasticity and Alzheimer's disease. Ann. Med. *27*, 663–670.
Pollard, H.B., Rojas, E., and Arispe, N. (1993). A new hypothesis for the mechanism of amyloid toxicity, based on the calcium channel activity of amyloid beta protein (A beta P) in phospholipid bilayer membranes. Ann. N. Y. Acad. Sci. *695*, 165–168.
Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., and Fuller, F. (1988). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. Nature *331*, 525–527.
Portet, F., Dauvilliers, Y., Campion, D., Raux, G., Hauw, J.J., Lyon-Caen, O., Camu, W., and Touchon, J. (2003). Very early onset AD with a de novo mutation in the presenilin 1 gene (Met 233 Leu). Neurology *61*, 1136–1137.
Potier, D. (2014). Pesticides et agroécologie, les champs du possible.
Pradines, E., Loubet, D., Mouillet-Richard, S., Manivet, P., Launay, J.-M., Kellermann, O., and Schneider, B. (2009). Cellular prion protein coupling to TACE-dependent TNF-alpha shedding controls neurotransmitter catabolism in neuronal cells. J. Neurochem. *110*, 912–923.
Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F.L., Fu, Y.-X., Lipp, M., and Aguzzi, A. (2003). Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. Nature *425*, 957–962.
Prusiner, S. (1998). Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 13363–13383.
Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science *216*, 136–144.
Puglielli, L., Ellis, B.C., Saunders, A.J., and Kovacs, D.M. (2003). Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. J. Biol. Chem. *278*, 19777–19783.
Purdey, M. (1994). Are organophosphate pesticides involved in the causation of bovine spongiform encephalopathy (BSE) ? hypothesis based upon a literature review and limited trials on BSE cattle. J. Nutr. Med. *4*, 43–89.
Purdey, M. (1996a). The UK epidemic of BSE: slow virus or chronic pesticide-initiated modification of the prion protein? Part 1: Mechanisms for a chemically induced pathogenesis/transmissibility. Med. Hypotheses *46*, 429–443.
Purdey, M. (1996b). The UK epidemic of BSE: slow virus or chronic pesticide-initiated modification of the prion protein? Part 2: An epidemiological perspective. Med. Hypotheses *46*, 445–454.

Q

Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotani, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R., et al. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 436–445.
Qiu, W.Q., Walsh, D.M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M.B., Rosner, M.R., Safavi, A., Hersh, L.B., and Selkoe, D.J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. J. Biol. Chem. *273*, 32730–32738.

R

Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 11172–11177.

Reddy, P.H., and Beal, M.F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. Trends Mol. Med. *14*, 45–53.

Rial-Otero, R., González-Rodríguez, R.M., Cancho-Grande, B., and Simal-Gándara, J. (2004). Parameters affecting extraction of selected fungicides from vineyard soils. J. Agric. Food Chem. *52*, 7227–7234.

Richardson, J.R., Roy, A., Shalat, S.L., von Stein, R.T., Hossain, M.M., Buckley, B., Gearing, M., Levey, A.I., and German, D.C. (2014). Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. JAMA Neurol. *71*, 284–290.

Richter-Landsberg, C. (2008). The cytoskeleton in oligodendrocytes. Microtubule dynamics in health and disease. J. Mol. Neurosci. MN *35*, 55–63.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). Nature *382*, 180–182.

Riesner, D. (2003). Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). Br. Med. Bull. *66*, 21–33.

Ritz, B.R., Manthripragada, A.D., Costello, S., Lincoln, S.J., Farrer, M.J., Cockburn, M., and Bronstein, J. (2009). Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease. Environ. Health Perspect. *117*, 964–969.

Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., and Murri, L. (2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. Brain Res. Bull. *61*, 1–24.

Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., and Tsuda, T. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. Nature *376*, 775–778.

Rosen, R.F., Fritz, J.J., Dooyema, J., Cintron, A.F., Hamaguchi, T., Lah, J.J., LeVine, H., Jucker, M., and Walker, L.C. (2012). Exogenous seeding of cerebral β-amyloid deposition in βAPP-transgenic rats. J. Neurochem. *120*, 660–666.

Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S.C., Henry, A., McKinstry, W.J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., et al. (1999). Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. Nat. Struct. Biol. *6*, 327–331.

Rottkamp, C.A., Raina, A.K., Zhu, X., Gaier, E., Bush, A.I., Atwood, C.S., Chevion, M., Perry, G., and Smith, M.A. (2001). Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity. Free Radic. Biol. Med. *30*, 447–450.

Roucou, X., Giannopoulos, P.N., Zhang, Y., Jodoin, J., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A. (2005). Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. Cell Death Differ. *12*, 783–795.

Rovelet-Lecrux, A., Frebourg, T., Tuominen, H., Majamaa, K., Campion, D., and Remes, A.M. (2007). APP locus duplication in a Finnish family with dementia and intracerebral haemorrhage. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *78*, 1158–1159.

Rubenstein, R., Chang, B., Gray, P., Piltch, M., Bulgin, M.S., Sorensen-Melson, S., and Miller, M.W. (2011). Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep naturally/experimentally infected with scrapie and deer with preclinical/clinical chronic wasting disease. J. Virol. *85*, 9031–9038.

Ryan, N.S., Nicholas, J.M., Weston, P.S.J., Liang, Y., Lashley, T., Guerreiro, R., Adamson, G., Kenny, J., Beck, J., Chavez-Gutierrez, L., et al. (2016). Clinical phenotype and genetic associations in autosomal dominant familial Alzheimer's disease: a case series. Lancet Neurol. *15*, 1326–1335.

S

Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D., and Greengard, P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. J. Cell Biol. *153*, 1403–1414.
Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature *411*, 810–813.
Safar, J., Roller, P., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. J Biol Chem *268*, 20276–20284.
Safar, J.G., Geschwind, M.D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H., Giles, K., et al. (2005). Diagnosis of human prion disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 3501–3506.
Safar, J.G., Wille, H., Geschwind, M.D., Deering, C., Latawiec, D., Serban, A., King, D.J., Legname, G., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., et al. (2006). Human prions and plasma lipoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 11312–11317.
Saftig, P., and Lichtenthaler, S.F. (2015). The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. Prog. Neurobiol. *135*, 1–20.
Saftig, P., and de Strooper, B. (1998). Downregulation of PS1 expression in neurons decreases beta-amyloid production: a biochemical link between the two major familial Alzheimer's disease genes. Mol. Psychiatry *3*, 287–289.
Saganich, M.J., Schroeder, B.E., Galvan, V., Bredesen, D.E., Koo, E.H., and Heinemann, S.F. (2006). Deficits in synaptic transmission and learning in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice require C-terminal cleavage of APP. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 13428–13436.
Saito, S., and Xiao, C.L. (2018). Fungicide Resistance in Botrytis cinerea Populations in California and its Influence on Control of Gray Mold on Stored Mandarin Fruit. Plant Dis. *102*, 2545–2549.
Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., Iwata, N., and Saido, T.C. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. Nat. Neurosci. *17*, 661–663.
Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., et al. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. Nature *380*, 528–531.
Sakudo, A., and Onodera, T. (2014). Prion protein (PrP) gene-knockout cell lines: insight into functions of the PrP. Front. Cell Dev. Biol. *2*, 75.
Salazar, J.G., Ribes, D., Cabré, M., Domingo, J.L., Sanchez-Santed, F., and Colomina, M.T. (2011). Amyloid β peptide levels increase in brain of AβPP Swedish mice after exposure to chlorpyrifos. Curr. Alzheimer Res. *8*, 732–740.
Sambamurti, K., Greig, N.H., and Lahiri, D.K. (2002). Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. Neuromolecular Med. *1*, 1–31.
Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1994). APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor. Neurobiol. Dis. *1*, 13–24.

Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., and Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. J. Cell Biol. *169*, 341–354.
Saravanan, K.S., Sindhu, K.M., and Mohanakumar, K.P. (2005). Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. Brain Res. *1049*, 147–155.
Scheyer, A., Graeff, C., Morville, S., Mirabel, P., and Millet, M. (2005). Analysis of some organochlorine pesticides in an urban atmosphere (Strasbourg, east of France). Chemosphere *58*, 1517–1524.
Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 9649–9653.
Schmidt, C., Lepsverdize, E., Chi, S.L., Das, A.M., Pizzo, S.V., Dityatev, A., and Schachner, M. (2008). Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. Mol. Psychiatry *13*, 953–969.
Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M.A., Ball, H.L., Bradon, N., Bosque, P.J., Crossin, K.L., Edelman, G.M., DeArmond, S.J., Cohen, F.E., et al. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. J. Mol. Biol. *314*, 1209–1225.
Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., and Kellermann, O. (2003). NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 13326–13331.
Scholtz, M.T., Voldner, E., McMillan, A.C., and Van Heyst, B.J. (2002). A pesticide emission model (PEM) Part I: model development. Atmos. Environ. *36*, 5005–5013.
Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dircksen, H., Multhaup, G., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1991). Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. Brain Res. *563*, 184–194.
Schummer, C., Mothiron, E., Appenzeller, B.M.R., Rizet, A.-L., Wennig, R., and Millet, M. (2010). Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 *158*, 576–584.
Schwarz, A.J., Yu, P., Miller, B.B., Shcherbinin, S., Dickson, J., Navitsky, M., Joshi, A.D., Devous, M.D., and Mintun, M.S. (2016). Regional profiles of the candidate tau PET ligand 18F-AV-1451 recapitulate key features of Braak histopathological stages. Brain J. Neurol. *139*, 1539–1550.
Selkoe, D.J. (1994). Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. Curr. Opin. Neurobiol. *4*, 708–716.
Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol. Rev. *81*, 741–766.
Serrano-Pozo, A., Mielke, M.L., Gómez-Isla, T., Betensky, R.A., Growdon, J.H., Frosch, M.P., and Hyman, B.T. (2011). Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. *179*, 1373–1384.
Sharp, E.S., and Gatz, M. (2011). The Relationship between Education and Dementia An Updated Systematic Review. Alzheimer Dis. Assoc. Disord. *25*, 289–304.
Shaw, I., Berry, C., Lane, E., Fitzmaurice, P., Clarke, D., and Holden, A. (2002). Studies on the putative interactions between the organophosphorus insecticide Phosmet and recombinant mouse PrP and its implication in the BSE epidemic. Vet. Res. Commun. *26*, 263–271.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature *375*, 754–760.
Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. J. Clin. Invest. *106*, 1489–1499.
Shimizu, K., Ohtaki, K., Matsubara, K., Aoyama, K., Uezono, T., Saito, O., Suno, M., Oqawa, K., Hayase, N., Kimura, K., et al. (2001). Carrier-mediated processes in blood–brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. Brain Res. *906*, 135–142.
Shimizu, K., Matsubara, K., Ohtaki, K., Fujimaru, S., Saito, O., and Shiono, H. (2003). Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. Brain Res. *976*, 243–252.
Shirotani, K., Edbauer, D., Capell, A., Schmitz, J., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. J. Biol. Chem. *278*, 16474–16477.
Shirotani, K., Edbauer, D., Kostka, M., Steiner, H., and Haass, C. (2004). Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1. J. Neurochem. *89*, 1520–1527.
Shyng, S.L., Moulder, K.L., Lesko, A., and Harris, D.A. (1995). The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. J. Biol. Chem. *270*, 14793–14800.
Sigurdson, C.J., Williams, E.S., Miller, M.W., Spraker, T.R., O'Rourke, K.I., and Hoover, E.A. (1999). Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (Odocoileus hemionus). J. Gen. Virol. *80 (Pt 10)*, 2757–2764.
Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F., and Caughey, B. (2005). The most infectious prion protein particles. Nature *437*, 257–261.
Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J.-G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J., et al. (2007). In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. PLoS Pathog. *3*, e125.
Simoneau, S., Ruchoux, M., Vignier, N., Lebon, P., Freire, S., Comoy, E.E., Deslys, J.P., and Fournier, J.-G. (2009). Small critical RNAs in the scrapie agent. Nat. Preced.
Simpson, D.A., Lander, H., and Robson, H.N. (1959). Observations on kuru: II. Clinical features. Australas. Ann. Med. *8*, 8–15.
Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., et al. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature *402*, 537–540.
Sirk, D., Zhu, Z., Wadia, J.S., Shulyakova, N., Phan, N., Fong, J., and Mills, L.R. (2007). Chronic exposure to sub-lethal beta-amyloid (Abeta) inhibits the import of nuclear-encoded proteins to mitochondria in differentiated PC12 cells. J. Neurochem. *103*, 1989–2003.
Slack, B.E., Ma, L.K., and Seah, C.C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. Biochem. J. *357*, 787–794.
Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 2117–2127.
Smith, D.G., Cappai, R., and Barnham, K.J. (2007). The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. Biochim. Biophys. Acta *1768*, 1976–1990.
Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter,

M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. Nat. Neurosci. *8*, 1051–1058.
Somavarapu, A.K., and Kepp, K.P. (2016). Loss of stability and hydrophobicity of presenilin 1 mutations causing Alzheimer's disease. J. Neurochem. *137*, 101–111.
Song, H.-L., Shim, S., Kim, D.-H., Won, S.-H., Joo, S., Kim, S., Jeon, N.L., and Yoon, S.-Y. (2014). β-Amyloid is transmitted via neuronal connections along axonal membranes. Ann. Neurol. *75*, 88–97.
Soto, C. (2004). Diagnosing prion diseases: needs, challenges and hopes. Nat. Rev. Microbiol. *2*, 809–819.
Soto, C., Estrada, L., and Castilla, J. (2006). Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. Trends Biochem. Sci. *31*, 150–155.
Spencer, B., Marr, R.A., Gindi, R., Potkar, R., Michael, S., Adame, A., Rockenstein, E., Verma, I.M., and Masliah, E. (2011). Peripheral delivery of a CNS targeted, metalo-protease reduces aβ toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. PloS One *6*, e16575.
Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. Trends Neurosci. *21*, 428–433.
Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell *51*, 229–240.
Stern, D., Yan, S.D., Yan, S.F., and Schmidt, A.M. (2002). Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. Adv. Drug Deliv. Rev. *54*, 1615–1625.
Stöhr, J., Elfrink, K., Weinmann, N., Wille, H., Willbold, D., Birkmann, E., and Riesner, D. (2011). In vitro conversion and seeded fibrillization of posttranslationally modified prion protein. Biol. Chem. *392*, 415–421.
Stöhr, J., Watts, J.C., Mensinger, Z.L., Oehler, A., Grillo, S.K., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Giles, K. (2012). Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (Aβ) prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 11025–11030.
Storck, S.E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J.N., Schubert, N., Di Spiezio, A., Baches, S., Vandenbroucke, R.E., Bouter, Y., Prikulis, I., et al. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid-β(1-42) across the blood-brain barrier. J. Clin. Invest. *126*, 123–136.
Stranahan, A.M., Khalil, D., and Gould, E. (2006). Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. Nat. Neurosci. *9*, 526–533.
Striebel, J.F., Race, B., Meade-White, K.D., LaCasse, R., and Chesebro, B. (2011). Strain specific resistance to murine scrapie associated with a naturally occurring human prion protein polymorphism at residue 171. PLoS Pathog. *7*, e1002275.
Stys, P.K., You, H., and Zamponi, G.W. (2012). Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. J. Physiol. *590*, 1357–1368.
Sudoh, S., Kawamura, Y., Sato, S., Wang, R., Saido, T.C., Oyama, F., Sakaki, Y., Komano, H., and Yanagisawa, K. (1998). Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid beta-protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. J. Neurochem. *71*, 1535–1543.
Sudoh, S., Frosch, M.P., and Wolf, B.A. (2002). Differential effects of proteases involved in intracellular degradation of amyloid beta-protein between detergent-soluble and -insoluble pools in CHO-695 cells. Biochemistry (Mosc.) *41*, 1091–1099.
Sun, L., Li, X., Lin, X., Yan, F., Chen, K., and Xiao, S. (2015). Familial fatal insomnia with atypical clinical features in a patient with D178N mutation and homozygosity for Met at codon 129 of the prion protein gene. Prion *9*, 228–235.
Sutherland, G.R., and Auer, R.N. (2006). Primary intracerebral hemorrhage. J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas. *13*, 511–517.

Sveinbjornsdottir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. J. Neurochem. *139 Suppl 1*, 318–324.
Szczepanik, A.M., Rampe, D., and Ringheim, G.E. (2001). Amyloid-beta peptide fragments p3 and p4 induce pro-inflammatory cytokine and chemokine production in vitro and in vivo. J. Neurochem. *77*, 304–317.

T

Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., and Ihara, Y. (2009). gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 13042–13052.
Tamayev, R., Zhou, D., and D'Adamio, L. (2009). The interactome of the amyloid beta precursor protein family members is shaped by phosphorylation of their intracellular domains. Mol. Neurodegener. *4*, 28.
Tamgüney, G., Richt, J.A., Hamir, A.N., Greenlee, J.J., Miller, M.W., Wolfe, L.L., Sirochman, T.M., Young, A.J., Glidden, D.V., Johnson, N.L., et al. (2012). Salivary prions in sheep and deer. Prion *6*, 52–61.
Tang, S.-C., Lathia, J.D., Selvaraj, P.K., Jo, D.-G., Mughal, M.R., Cheng, A., Siler, D.A., Markesbery, W.R., Arumugam, T.V., and Mattson, M.P. (2008). Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. Exp. Neurol. *213*, 114–121.
Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., et al. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Environ. Health Perspect. *119*, 866–872.
Tanzi, R.E., and Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. Cell *120*, 545–555.
Taylor, D.R., and Hooper, N.M. (2006). The prion protein and lipid rafts. Mol. Membr. Biol. *23*, 89–99.
Taylor, C.J., Ireland, D.R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N.M., Turner, P.R., Bilkey, D.K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. Neurobiol. Dis. *31*, 250–260.
Taylor, D.R., Parkin, E.T., Cocklin, S.L., Ault, J.R., Ashcroft, A.E., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2009). Role of ADAMs in the ectodomain shedding and conformational conversion of the prion protein. J. Biol. Chem. *284*, 22590–22600.
Teather, L.A., Magnusson, J.E., Chow, C.M., and Wurtman, R.J. (2002). Environmental conditions influence hippocampus-dependent behaviours and brain levels of amyloid precursor protein in rats. Eur. J. Neurosci. *16*, 2405–2415.
Telling, G.C., Scott, M., Hsiao, K.K., Foster, D., Yang, S.L., Torchia, M., Sidle, K.C., Collinge, J., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1994). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 9936–9940.
Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. Cell *83*, 79–90.
Terry, L.A., Howells, L., Bishop, K., Baker, C.A., Everest, S., Thorne, L., Maddison, B.C., and Gough, K.C. (2011). Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. Vet. Res. *42*, 65.

Tesseur, I., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Bronfman, F., Sciot, R., Van Lommel, A., and Van Leuven, F. (2000). Prominent axonopathy and disruption of axonal transport in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 in neurons of brain and spinal cord. Am. J. Pathol. *157*, 1495–1510.
Tester, S., Juillerat, V., Doherr, M.G., Haase, B., Polak, M., Ehrensperger, F., Leeb, T., Zurbriggen, A., and Seuberlich, T. (2009). Biochemical typing of pathological prion protein in aging cattle with BSE. Virol. J. *6*, 64.
Thal, D.R., Capetillo-Zarate, E., Larionov, S., Staufenbiel, M., Zurbruegg, S., and Beckmann, N. (2009). Capillary cerebral amyloid angiopathy is associated with vessel occlusion and cerebral blood flow disturbances. Neurobiol. Aging *30*, 1936–1948.
Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. J. Biol. Chem. *283*, 29615–29619.
Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., et al. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. Neuron *17*, 181–190.
Tiwana, H., Wilson, C., Pirt, J., Cartmell, W., and Ebringer, A. (1999). Autoantibodies to brain components and antibodies to Acinetobacter calcoaceticus are present in bovine spongiform encephalopathy. Infect. Immun. *67*, 6591–6595.
Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., and Manson, J.C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. Nature *380*, 639–642.
Tobler, I., Deboer, T., and Fischer, M. (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *17*, 1869–1879.
Tomaselli, S., Esposito, V., Vangone, P., van Nuland, N.A.J., Bonvin, A.M.J.J., Guerrini, R., Tancredi, T., Temussi, P.A., and Picone, D. (2006). The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's Abeta-(1-42) peptide in aqueous media is reversible: a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding. Chembiochem Eur. J. Chem. Biol. *7*, 257–267.
Tsiroulnikov, K., Shchutskaya, Y., Muronetz, V., Chobert, J.-M., and Haertlé, T. (2009). Phospholipids influence the aggregation of recombinant ovine prions. From rapid extensive aggregation to amyloidogenic conversion. Biochim. Biophys. Acta *1794*, 506–511.
Tsui-Pierchala, B.A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E.M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. Trends Neurosci. *25*, 412–417.
Turk, E., Teplow, D., Hood, L., and Prusiner, S. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. Eur J Biochem *176*, 21–30.
Turner, M.L., and Ludlam, C.A. (2009). An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. Br. J. Haematol. *144*, 14–23.
Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. Prog. Neurobiol. *70*, 1–32.
Tzotzas, T., Desrumaux, C., and Lagrost, L. (2009). Plasma phospholipid transfer protein (PLTP): review of an emerging cardiometabolic risk factor. Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes. *10*, 403–411.

V

Van Maele-Fabry, G., Gamet-Payrastre, L., and Lison, D. (2017). Residential exposure to pesticides as risk factor for childhood and young adult brain tumors: A systematic review and meta-analysis. Environ. Int. *106*, 69–90.
Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., and Butterfield, D.A. (2000). Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. J. Struct. Biol. *130*, 184–208.
Vassallo, N., and Herms, J. (2003). Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. J. Neurochem. *86*, 538–544.
Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science *286*, 735–741.
Vázquez-Fernández, E., Vos, M.R., Afanasyev, P., Cebey, L., Sevillano, A.M., Vidal, E., Rosa, I., Renault, L., Ramos, A., Peters, P.J., et al. (2016). The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. PLoS Pathog. *12*, e1005835.
Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W.Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., Rosner, M.R., and Selkoe, D.J. (2000). Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 1657–1665.
Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S.J., Smart, E.J., Anderson, R.G., Taraboulos, A., and Prusiner, S.B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 14945–14949.
Victoria, G.S., Arkhipenko, A., Zhu, S., Syan, S., and Zurzolo, C. (2016). Astrocyte-to-neuron intercellular prion transfer is mediated by cell-cell contact. Sci. Rep. *6*, 20762.
Viles, J., Cohen, F., Prusiner, S.B., Goodin, D., Wright, P., and Dyson, H. (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 2042–2047.
Vinson, F., Merhi, M., Baldi, I., Raynal, H., and Gamet-Payrastre, L. (2011). Exposure to pesticides and risk of childhood cancer: a meta-analysis of recent epidemiological studies. Occup. Environ. Med. *68*, 694–702.

W

Wadsworth, J.D.F., and Collinge, J. (2007). Update on human prion disease. Biochim. Biophys. Acta *1772*, 598–609.
Wallin, C., Hiruma, Y., Wärmländer, S.K.T.S., Huvent, I., Jarvet, J., Abrahams, J.P., Gräslund, A., Lippens, G., and Luo, J. (2018). The Neuronal Tau Protein Blocks in Vitro Fibrillation of the Amyloid-β (Aβ) Peptide at the Oligomeric Stage. J. Am. Chem. Soc.
Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisny, M.B., and Selkoe, D.J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. Biochemistry (Mosc.) *39*, 10831–10839.
Wan, N., and Lin, G. (2016). Parkinson's Disease and Pesticides Exposure: New Findings From a Comprehensive Study in Nebraska, USA. J. Rural Health Off. J. Am. Rural Health Assoc. Natl. Rural Health Care Assoc. *32*, 303–313.

Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., and Reitz, A.B. (2000a). beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. J. Biol. Chem. *275*, 5626–5632.
Wang, H.Y., Lee, D.H., Davis, C.B., and Shank, R.P. (2000b). Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. J. Neurochem. *75*, 1155–1161.
Watt, N.T., Taylor, D.R., Gillott, A., Thomas, D.A., Perera, W.S.S., and Hooper, N.M. (2005). Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. J. Biol. Chem. *280*, 35914–35921.
Weggen, S., and Beher, D. (2012). Molecular consequences of amyloid precursor protein and presenilin mutations causing autosomal-dominant Alzheimer's disease. Alzheimers Res. Ther. *4*, 9.
Wei, W., Norton, D.D., Wang, X., and Kusiak, J.W. (2002). Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. Brain J. Neurol. *125*, 2036–2043.
Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *72*, 1858–1862.
Weissmann, C. (1991). A "unified theory" of prion propagation. Nature *352*, 679–683.
Weissmann, C. (2004). The state of the prion. Nat. Rev. Microbiol. *2*, 861–871.
Weller, R.O., Massey, A., Newman, T.A., Hutchings, M., Kuo, Y.M., and Roher, A.E. (1998). Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. *153*, 725–733.
Wells, G.A., and Wilesmith, J.W. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. Brain Pathol. Zurich Switz. *5*, 91–103.
Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. Vet. Rec. *121*, 419–420.
Wells, M.A., Jackson, G.S., Jones, S., Hosszu, L.L.P., Craven, C.J., Clarke, A.R., Collinge, J., and Waltho, J.P. (2006). A reassessment of copper(II) binding in the full-length prion protein. Biochem. J. *399*, 435–444.
van der Werf, H.M.G. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. Agric. Ecosyst. Environ. *60*, 81–96.
Weskamp, G., Cai, H., Brodie, T.A., Higashyama, S., Manova, K., Ludwig, T., and Blobel, C.P. (2002). Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. Mol. Cell. Biol. *22*, 1537–1544.
Weuve, J., Ridker, P.M., Cook, N.R., Buring, J.E., and Grodstein, F. (2006). High-sensitivity C-reactive protein and cognitive function in older women. Epidemiol. Camb. Mass *17*, 183–189.
WHO (1992). Our planet, our health; Geneva, Switzerland. Rep. WHO Comm. Health Environ.
Wilesmith, J.W. (1994). Bovine spongiform encephalopathy and related diseases: an epidemiological overview. N. Z. Vet. J. *42*, 1–8.
Wilesmith, J.W., Wells, G.A., Cranwell, M.P., and Ryan, J.B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. Vet. Rec. *123*, 638–644.
Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., and Atkinson, M.J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. Vet. Rec. *128*, 199–203.
Will, R., and Matthews, W. (1982). Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *45*, 235–238.

Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Estibeiro, K., Cousens, S.N., Smith, P.G., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., and Hofman, A. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. The Lancet *347*, 921–925.
Wille, H., and Requena, J.R. (2018). The Structure of PrPSc Prions. Pathog. Basel Switz. *7*.
Wille, P., Michelitsch, M., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F., Agard, D., and Prusiner, S. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 3563–3568.
Williams, A.E., Lawson, L.J., Perry, V.H., and Fraser, H. (1994). Characterization of the microglial response in murine scrapie. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *20*, 47–55.
Wingo, T.S., Lah, J.J., Levey, A.I., and Cutler, D.J. (2012). Autosomal Recessive Causes Likely in Early-Onset Alzheimer Disease. Arch. Neurol. *69*, 59–64.
Wisniewski, T., Castaño, E.M., Golabek, A., Vogel, T., and Frangione, B. (1994). Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. Am. J. Pathol. *145*, 1030–1035.
Witman, G.B., Cleveland, D.W., Weingarten, M.D., and Kirschner, M.W. (1976). Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *73*, 4070–4074.
Wolfe, M.S., Xia, W., Moore, C.L., Leatherwood, D.D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I.O., and Selkoe, D.J. (1999). Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. Biochemistry (Mosc.) *38*, 4720–4727.
Wright, A.L., Zinn, R., Hohensinn, B., Konen, L.M., Beynon, S.B., Tan, R.P., Clark, I.A., Abdipranoto, A., and Vissel, B. (2013). Neuroinflammation and neuronal loss precede Aβ plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. PloS One *8*, e59586.
Wroe, S.J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., Linehan, J.M., Brandner, S., Wadsworth, J.D., Hewitt, P., et al. (2006). Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. The Lancet *368*, 2061–2067.
Wu, S.-C., Cao, Z.-S., Chang, K.-M., and Juang, J.-L. (2017). Intestinal microbial dysbiosis aggravates the progression of Alzheimer's disease in Drosophila. Nat. Commun. *8*, 24.

X

Xiao, X., Cali, I., Dong, Z., Puoti, G., Yuan, J., Qing, L., Wang, H., Kong, Q., Gambetti, P., and Zou, W.-Q. (2013). Protease-sensitive prions with 144-bp insertion mutations. Aging *5*, 155–173.
Xie, Z., O'Rourke, K.I., Dong, Z., Jenny, A.L., Langenberg, J.A., Belay, E.D., Schonberger, L.B., Petersen, R.B., Zou, W., Kong, Q., et al. (2006). Chronic Wasting Disease of Elk and Deer and Creutzfeldt-Jakob Disease. J. Biol. Chem. *281*, 4199–4206.
Xu, H., Greengard, P., and Gandy, S. (1995). Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein. J. Biol. Chem. *270*, 23243–23245.
Xu, P.T., Schmechel, D., Rothrock-Christian, T., Burkhart, D.S., Qiu, H.L., Popko, B., Sullivan, P., Maeda, N., Saunders, A.M., Roses, A.D., et al. (1996). Human apolipoprotein E2, E3, and E4 isoform-specific transgenic mice: human-like pattern of glial and neuronal immunoreactivity in central nervous system not observed in wild-type mice. Neurobiol. Dis. *3*, 229–245.
Xu, P.T., Gilbert, J.R., Qiu, H.L., Rothrock-Christian, T., Settles, D.L., Roses, A.D., and Schmechel, D.E. (1998). Regionally specific neuronal expression of human APOE gene in transgenic mice. Neurosci. Lett. *246*, 65–68.

Y

Yamada, M., Itoh, Y., Inaba, A., Wada, Y., Takashima, M., Satoh, S., Kamata, T., Okeda, R., Kayano, T., Suematsu, N., et al. (1999). An inherited prion disease with a PrP P105L mutation: clinicopathologic and PrP heterogeneity. Neurology *53*, 181–188.
Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., et al. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. Nature *402*, 533–537.
Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., et al. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. Nature *382*, 685–691.
Yegambaram, M., Manivannan, B., Beach, T.G., and Halden, R.U. (2015). Role of environmental contaminants in the etiology of Alzheimer's disease: a review. Curr. Alzheimer Res. *12*, 116–146.
Yoon, S.-S., and Jo, S.A. (2012). Mechanisms of Amyloid-β Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. Biomol. Ther. *20*, 245–255.
Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. Gene *87*, 257–263.
Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., et al. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. Nature *407*, 48–54.

Z

Zahn, R., Liu, A., Lührs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G., and Wüthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 145–150.
Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N.M., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R.O., Cabral, A.L.B., Lee, K.S., Juliano, M.A., et al. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. EMBO J. *21*, 3307–3316.
Zhang, Z., Zhang, Y., Wang, F., Wang, X., Xu, Y., Yang, H., Yu, G., Yuan, C., and Ma, J. (2013). De novo generation of infectious prions with bacterially expressed recombinant prion protein. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *27*, 4768–4775.
Zhao, D., Watson, J.B., and Xie, C.-W. (2004). Amyloid beta prevents activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor phosphorylation during hippocampal long-term potentiation. J. Neurophysiol. *92*, 2853–2858.
Zhou, D.F., Wu, C.S., Qi, H., Fan, J.H., Sun, X.D., Como, P., Qiao, Y.L., Zhang, L., and Kieburtz, K. (2006). Prevalence of dementia in rural China: impact of age, gender and education. Acta Neurol. Scand. *114*, 273–280.
Zhou, Z., Chan, C.H., Ma, Q., Xu, X., Xiao, Z., and Tan, E. (2011). The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. Cell Adhes. Migr. *5*, 280–292.
Zhu, S., Victoria, G.S., Marzo, L., Ghosh, R., and Zurzolo, C. (2015). Prion aggregates transfer through tunneling nanotubes in endocytic vesicles. Prion *9*, 125–135.
Zigas, V., and Gajdusek, D.C. (1957). Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. Med. J. Aust.

44, 745–754.
Zou, W.-Q., and Gambetti, P. (2005). From microbes to prions the final proof of the prion hypothesis. Cell *121*, 155–157.

Impact des pesticides sur l'agrégation des amyloïdes dans différents modèles de maladies neurodégénératives

La contamination des ressources en eau potable et des terres agricoles par les pesticides qui entrent dans la chaine alimentaire est un problème environnemental et sanitaire majeur. Des études épidémiologiques ont montré un lien entre l'exposition aux pesticides et la maladie de Parkinson, mais peu d'études sont disponibles sur les autres pathologies neurodégénératives. Notre hypothèse est que les pesticides pourraient être des facteurs déclencheurs ou aggravants, communs aux maladies neurodégénératives.

Au laboratoire, nous avons identifié par criblage sur la protéine prion, PrP, un composé nommé A6 décrit pour ses propriétés herbicides. A6 est un dérivé de l'α-terthiényl, molécule naturelle extraite des œillets d'inde. Le composé A6 a la capacité de promouvoir des formes oligomériques de la protéine prion sur une lignée cellulaire infectée par des prions. Mon projet de recherche visait à étudier les effets du bio-herbicide A6 sur l'agrégation et la propagation des prions *in vivo*. Des souris infectées par les prions ont été traitées avec différentes doses de cette molécule (5, 10 et 20 mg/kg). A la dose de 5 mg/kg, le composé A6 diminue le temps de survie des animaux avec une augmentation de la charge amyloïde. Tandis qu'aux plus fortes doses le traitement par A6 augmente la survie des souris avec une diminution de la charge amyloïde. Par un test de centrifugation rapide (RCA), nous avons montré que les faibles concentrations d'A6 favorisent la formation d'oligomères solubles de PrP^{Sc} SDS résistants (rSDS-PrP^{Sc}), alors que les plus fortes concentrations induisent des formes insolubles. L'analyse des cerveaux montre que seules les souris traitées avec 10 et 20 mg/kg d'A6 présentent des formes dimériques de rSDS-PrP^{Sc}. Cette étude montre une dualité d'effet du composé A6 : à de faibles doses, il favorise la pathologie probablement via des formes oligomériques solubles favorisant la réplication des prions. A de plus fortes doses, le composé A6 piègerait une partie de l'infectiosité des prions sous forme d'agrégats amorphes SDS résistants, bloquant la réplication des prions, et ayant un effet « protecteur ».

Une recherche d'analogues structurels au composé A6 a permis l'identification d'une classe d'antifongiques commercialisés : les anilinopyrimidines. Cette famille est composée de 3 molécules : cyprodinil, mépanipyrim et pyriméthanil, qui luttent contre des champignons responsables de la pourriture grise des fruits. L'analyse de nombreux rapports a révélé que nous sommes chroniquement exposés à des résidus d'anilinopyrimidines. Dans cette deuxième étude, nous avons étudié l'effet de ces 3 fongicides dans plusieurs modèles de la maladie d'Alzheimer (MA) et les conséquences sur les marqueurs de la pathologie. Des études d'incubation *ex vivo* associées à des expériences de cinétique d'agrégation de peptides $A\beta_{1-42}$ ont montré que ces composés interagissent directement avec les peptides et accélèrent sa cinétique d'agrégation. Afin de déterminer leurs effets *in vivo*, nous avons exposé chroniquement des souris J20 à un cocktail des 3 fongicides via l'eau de boisson. Les souris ont été traitées à 0,1 µg/L (0,44 nM) de chaque composé, correspondant à la concentration maximale autorisée dans l'eau potable. Après 9 mois de traitement, l'analyse des souris J20 a montré une augmentation du nombre et de la surface des plaques amyloïdes au niveau de l'hippocampe et du cortex. Pour déterminer à quel moment se produit l'effet proagrégant du cocktail, une étude longitudinale d'apparition des agrégats à 3, 6 et 9 mois par microscopie biphotonique, a montré que les plaques amyloïdes augmentent entre 6 et 9 mois et que les pesticides exacerbent les agrégats vasculaires. Les anilinopyrimidines modifient la production et la clairance des peptides Aβ en augmentant l'expression de BACE1 et en diminuant l'expression de la néprilysine. Nos travaux montrent que les antifongiques aggravent la MA.