

ÉCOLE DOCTORALE 414 : Science de la Vie et de la Santé

**Thèse préparée en collaboration entre l'Institut de Génétique et de Biologie
Moléculaire et Cellulaire (UMR 7104) et ManRos Therapeutics**

THÈSE présentée par :

Morgane CAM

soutenue le : **25 Septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé / Neurosciences

**Contribution à l'étude de la maladie
d'Alzheimer : induction de la production
d'amyloïdes beta-42/43 par le fipronil, un
pesticide de la famille des
phenylpyrazoles. Effets cellulaires des
Leucettines, une famille d'inhibiteurs des
kinases DYRKs/CLKs.**

THÈSE co-dirigée par :

Dr. MEIJER Laurent
Dr. HERAULT Yann

Président et directeur scientifique, ManRos Therapeutics
Directeur de recherche, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. JEGOU Bernard
Pr. Dr. BLONDEL Marc

Directeur de recherche, Université de Rennes 1
Professeur, Université de Brest

EXAMINATRICE (Présidente du jury) :

Dr. PITON Amélie

Maître de conférences, Université de Strasbourg

Remerciements

*Dans un premier temps, je tiens à remercier **Laurent Meijer**, responsable scientifique et directeur de ManRos Therapeutics, et le Dr. **Yann Hérault**, directeur de recherche à l'IGMBC (CNRS) de Strasbourg et directeur de l'Institut clinique de la souris, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma thèse de doctorat au sein de ManRos Therapeutics, en partenariat avec l'université de Strasbourg, pour avoir cru en mes compétences et m'avoir accordé leur confiance. Je remercie également Laurent pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir, pour ses conseils, ainsi que pour la relecture de cette thèse. Merci de m'avoir permis d'améliorer ma connaissance du milieu de la recherche en entreprise et mes capacités de réflexion scientifique.*

*J'adresse mes sincères remerciements aux Dr. **Marc Blondel**, **Bernard Jegou** et **Amélie Piton** qui me font l'honneur de faire partie de mon jury et pour l'intérêt qu'ils auront porté à mes travaux de thèse.*

*Je remercie particulièrement **Charlène Coquil**, une collègue devenue amie, pour tous les bons moments partagés pendant ces trois années. Merci également à **Yoann Peltier**, **Eletta Attanasio**, **Régis Lemestre**, **Guillaume LeCalvez**, **Loïc Micheron**, **Mélanie Rousseau**, **Guillaume Latgé** et **Antoine Arvor** pour la fraîcheur et la gaieté qu'ils ont apporté lors de leur passage dans l'entreprise. Je tiens à remercier **Katy Billot** et **Rozenn Jossé** pour les bons moments passés en leur compagnie, leur accueil et leur bienveillance. Merci aussi à **Hervé Galons**, **Nassima Oumata** et **Marie-Line Morvan** pour nos diverses conversations. De façon plus générale, j'adresse mes remerciements à **toute l'équipe de ManRos Therapeutics** pour leur accueil, leur esprit d'équipe, leur aide et leurs conseils ainsi que pour leur bonne humeur. Mes remerciements vont également à toutes les personnes ayant travaillé en amont de ces projets de thèse : **Hervé** et **Nassima** pour la synthèse de la roscovitine, **Romain Lucas** pour la mise au point de la synthèse des RCZ, ainsi que **Jean-Pierre Bazureau et son équipe** pour la synthèse des leucettines. Merci aussi à **tous nos collaborateurs** ayant permis de faire avancer ces projets.*

*Je souhaiterais remercier **mes professeurs et maîtres de stage** pour la confiance qu'ils m'ont témoigné et leurs conseils tout au long de mon cursus. Aussi m'ont-ils communiqué leur goût pour la recherche.*

*D'une manière plus personnelle, je remercie amplement **ma famille** et **mes amis** pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de cette aventure.*

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	3
Liste des figures	7
Liste des abréviations	9
Introduction	12
I. La Maladie d'Alzheimer	13
A. Découverte.....	13
B. Caractérisation, symptômes et diagnostic.....	14
1. Les différents stades de la MA.....	14
2. Biomarqueurs	15
3. Imagerie.....	16
C. Epidémiologie.....	17
D. Etiologie et mécanismes	18
1. Les facteurs de risque et de protection	18
a. Facteurs de risques	19
b. Facteurs protecteurs.....	21
2. La protéine précurseur de l'amyloïde (APP)	22
a. Synthèse d'APP.....	22
b. Voie métabolique d'APP (processing)	23
α-sécrétase	25
β-sécrétase	26
γ-sécrétase.....	27
c. Dégradation des peptides Aβ	29
d. Toxicité des peptides Aβ.....	29
3. La protéine Tau.....	31
E. Traitements	34
1. Traitements commercialisés	34
2. Nouvelles approches	35
II. Les protéines kinases.....	38
A. Généralités sur les protéines kinases	38
B. La protéine DYRK1A.....	41

1. Famille de la kinase	41
2. Structure génétique et protéique de DYRK1A	41
3. Activité et régulation normale et pathologique	42
4. Inhibiteurs de Dyrk1A.....	44
a. Inhibiteurs naturels	45
b. Inhibiteurs synthétiques	47
C. La protéine Kinase CDK5.....	48
1. Caractéristiques de CDK5	48
2. La roscovitine, un inhibiteur des CDK	49
III. Le fipronil.....	50
A. Découverte.....	51
B. Utilisation	51
1. Applications	51
2. Intoxication chez l'Homme	52
C. Propriétés chimiques et biochimiques.....	53
D. Métabolisme.....	53
E. Effets sur les mammifères.....	54
1. Evaluations toxicologiques.....	54
2. Mort cellulaire.....	55
3. Thyroïde.....	56
4. Système nerveux central	57
5. Autres fonctions métaboliques.....	58
F. Environnement.....	59
Résultats & discussion	61
I. Implication des pesticides dans la production de peptides amyloïdes.....	62
A. Les herbicides triazines.....	62
1. Article : « Specific triazine herbicides induce amyloid- β 42 production. »	63
2. Autres résultats.....	88
B. Les insecticides pyrazoles : zoom sur le fipronil et ses principaux métabolites	89
1. Résultats préliminaires.....	89
2. Article : « Induction of amyloid- β 42 production by fipronil and other pyrazole insecticides. »	92
II. Inhibition pharmacologique de DYRK1A, une protéine kinase impliquée dans la maladie d'Alzheimer	142

A. Inhibition, in vitro, de l'activité kinase de DYRK1A par les leucettines	142
1. Absence d'effet protecteur de la leucettine E1 contre la mort cellulaire induite par le glutamate.....	142
2. Mise en place d'un nouveau test cellulaire	144
3. Screening des leucettines : quelques exemples	147
B. Analyse de la capacité des RCZ à inhiber, in vitro, l'activité kinase de DYRK1A	148
C. Inhibition, in vitro, de l'activité kinase de DYRK1A par les polyandrocarpamines	151
Article : « Marine derived 2-aminoimidazolinone alkaloids. Leucettamine B - related polyandrocarpamines inhibit mammalian and protozoan DYRK & CLK kinases. »	151
III. Inhibition pharmacologique de CDK5, une protéine kinase impliquée dans les traumatismes crâniens, les AVC et la maladie d'Alzheimer.....	193
Conclusion & perspectives	198
I. Implication des pesticides dans la production de peptides amyloïdes.....	199
II. Inhibition pharmacologique de DYRK1A, une protéine kinase impliquée dans la maladie d'Alzheimer	200
III. Inhibition pharmacologique de CDK5, une protéine kinase impliquée dans les traumatismes crâniens, les AVC et la maladie d'Alzheimer.....	201
Matériels et méthodes	202
I. Culture cellulaire.....	203
II. Western blot	204
III. Capture ELISA	205
IV. Test de viabilité cellulaire	206
V. Analyse de spectrométrie de masse	207
Bibliographie	209
Revue scientifique	209
Sites internet.....	239
Annexes	240
Annexe 1 : Analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées dans les N2aAPP ₆₉₅ traitées à l'affin-5 par rapport au DMSO.	241
Annexe 2 : Analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées dans les N2aAPP ₆₉₅ traitées au dipropetryn par rapport au DMSO.	242

Annexe 3 : Analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées dans les N2aAPP ₆₉₅ traitées au terbutryn par rapport au DMSO.....	243
Annexe 4 : Analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées dans les N2aAPP ₆₉₅ traitées au fipronil sulfone par rapport au DMSO.....	244
Annexe 5 : Analyse protéomique et phosphoprotéomique de l'effet cellulaire du fipronil sulfone	245
Annexe 6 : Phosphoprotéines modifiées par le fipronil sulfone et sensibles au DAPT	246
Annexe 7 : Phosphoprotéines modifiées par le fipronil sulfone et insensibles au DAPT	247
Résumé.....	248
Résumé en anglais	248

Liste des figures

Figure 1 : Photographies d'Auguste Deter, première patiente décrite dans la MA, d'Alois Alzheimer et d'Emil Kraepelin, premiers médecins ayant décrit cette pathologie.....	14
Figure 2 : Estimation du nombre de patients vivant avec la maladie d'Alzheimer à travers le monde en 2015, et prévision pour les années 2030 et 2050	18
Figure 3 : Représentation schématique de l'APP	23
Figure 4 : Voies métaboliques d'APP	24
Figure 5 : Structure d'une ADAM typique	25
Figure 6 : Structure de BACE1.	26
Figure 7 : Sous-unités du complexe de la γ -sécrétase et leurs topologies membranaires	28
Figure 8 : La protéine Tau humaine est présente sous 6 isoformes dans le cerveau	32
Figure 9 : Arbre phylogénétique des différentes protéines kinases humaines existantes	40
Figure 10 : Structure de la protéine DYRK1A.....	42
Figure 11 : Structure chimique de l'EGCG.....	45
Figure 12 : Photographie de l'éponge marine <i>Leucetta microraphis</i> (Calcarea) et structure chimique de la leucettamine B.....	46
Figure 13 : Structure chimique de la leucettine L41.....	46
Figure 14 : Structure chimique de l'harmine	46
Figure 15 : Photographie de l'étoile de mer <i>Marthasterias glacialis</i> , et structure chimique de la roscovitine	50
Figure 16 : Structure du fipronil, de son métabolite majoritaire, le fipronil sulfone, et de son photoproduit principal, le fipronil desulfinyl.	54
Figure 17 : L'aftin-5, le dipropetryn et le terbutryn induisent l'augmentation de la production de peptides A β -42.....	88
Figure 18 : Le fipronil et certains de ses dérivés augmentent le ratio A β 42/A β 40	90
Figure 19 : L'inhibiteur de γ -sécrétase, DAPT, contrebalance l'effet du fipronil sulfone sur la production de peptides A β	91

Figure 20 : Inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par les leucettines L41 et E1	143
Figure 21 : Absence d'effet protecteur de la leucettine E1 contre la mort cellulaire induite par le glutamate	144
Figure 22 : Induction de DYRK1A, par la doxycycline, dans les cellules SH-SY5Y-D1A et SH-SY5Y-KD	145
Figure 23 : Inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par la leucettine L41 de manière dose-dépendante	146
Figure 24 : Détermination du temps optimal d'exposition à la doxycycline	146
Figure 25 : Détermination du temps optimal d'exposition aux leucettines	146
Figure 26 : Inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par quelques leucettines de manière dose-dépendante.....	147
Figure 27 : inhibition dose-dépendante de DYRK1A par la RCZ-2.....	149
Figure 28 : Toxicité de certaines RCZ	150
Figure 29 : Screening de certaines RCZ quant à leur inhibition de l'activité kinase de DYRK1A	150
Figure 30 : Cinétique de la down-régulation de la phosphorylation de Tau par 3 doses de roscovitine.....	194
Figure 31 : La down-régulation de la phosphorylation de Tau, de manière dose-dépendante, est induite par la roscovitine	194
Figure 32 : La phosphorylation de Tau n'est pas induite par des kinases autres que celles ciblées par la roscovitine ou le S-CR8.....	195
Figure 33 : La down-régulation de la phosphorylation de Tau, de manière dose-dépendante, est induite par les kinases inhibées par la roscovitine, le (S)-CR8 et le N-N1	196

Liste des abréviations

A β	peptide amyloïde beta
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i> (dose quotidienne acceptable)
ADN	Acide désoxyribonucléique
aftin	Amyloid β Forty-Two Inducers
AICD	<i>APP intracellular domain</i> (domaine intracellulaire d'APP)
Å	Ångström
aPK	<i>atypical protein kinase</i>
APOE	Apolipoprotéine E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Protéine précurseur d'amyloïde)
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accidents Vasculaires Cérébraux
BACE1	<i>β-site APP Cliving Enzyme 1</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinases</i> , ou, <i>Cell Division Kinases</i>
CLK	<i>CDK-like kinases</i>
CMGC	famille des CDK, MAPK, GSK & CLK
CNS	<i>Central Nervous System</i> (système nerveux central)
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i> (liquide cérébro-spinal)
CTF	<i>C-Terminal Fragment</i>
CYP	enzymes cytochromes hépatiques P450
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSK	<i>Dual-Specificity Kinases</i>
DYRK	<i>Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinases</i> , ou, <i>Dual-specificity yak-related kinases</i>

EFSA	<i>European Food and Safety Authority</i> (Autorité européenne de sécurité des aliments)
ePK	<i>eukaryotic protein kinase</i>
EOAD	<i>Early-Onset Alzheimer's Disease</i>
FAD	<i>Familial Alzheimer's Disease</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)
GABA	acide γ -aminobutyrique
GDS	<i>Global Deterioration Scale</i>
Glu	Acide glutamique
GSK	<i>Glycogen Synthase Kinases</i>
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
HCE	<i>Human Chemical Exposome</i>
IgG	Immunoglobuline G
Ile	Isoleucine
IRM	Résonance par Imagerie Magnétique
ISF	<i>Interstitial Fluid</i> (liquide interstitiel)
KPI	<i>Kunitz protease inhibitor</i>
LDH	Lactate Deshydrogénase
LOAD	<i>Late-Onset Alzheimer's Disease</i>
MA	Maladie d'Alzheimer
MADM	<i>Mammalian Desintegrin-Metalloproteinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MAPT	<i>Microtubule-Associated Protein-Tau</i>
MCI	<i>Mild Cognitive Impairment</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MMSE	<i>Mini-Mental Status Examination</i>
MoCA	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>

NEP	<i>Neprilysin</i>
NFT	<i>Neurofibrillary Tangles</i> (enchevêtrements neurofibrillaires)
NMDA	acide N-méthyl-D-aspartique
NOAEL	<i>No Observable Adverse Effect Level</i>
NTF	<i>N-Terminal Fragment</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PHF	<i>Paired Helical Filament</i>
PiB	<i>Pittsburgh Compound B</i>
PS	<i>Presenilin</i>
RE	Réticulum Endoplasmique
RfD	<i>Reference dose</i> (dose de référence aiguë)
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SAD	<i>Sporadic Alzheimer's Disease</i>
Ser / S	Sérine
STPK	Sérine/Thréonine Protéines Kinases
T21	Trisomie 21 (<i>Down syndrome</i>)
Thr / T	Thréonine
TPK	Tyrosines Protéines Kinases
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
Tyr / Y	Tyrosine
Val	Valine

Introduction

I. La Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative localisée, dans un premier temps, dans l'hippocampe, siège de la mémoire, et s'étendant progressivement aux autres zones du cerveau. Cette pathologie mène à la disparition progressive des capacités d'orientation dans le temps et dans l'espace, de reconnaissance des objets et des personnes, d'utilisation du langage, de raisonnement, de réflexion... Il s'agit de la forme de démence la plus commune.

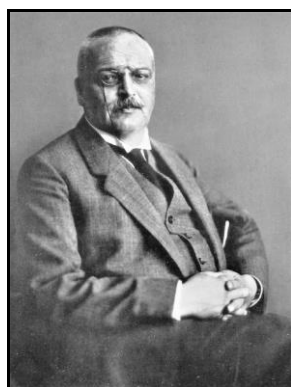
A. Découverte

Le docteur Alois Alzheimer (figure 1) évoque pour la première fois l'observation d'une nouvelle forme de démence, lors de la 37^{ème} conférence des psychiatres allemands du Sud-Ouest, à Tubingen, le 4 novembre 1906.¹ Il s'agit du cas d'Auguste Deter (figure 1), une patiente de 51 ans admise à l'hôpital de Frankfort le 26 Novembre 1901. Elle présentait une déficience cognitive progressive, des symptômes focaux liés à des fonctions corticales supérieures, des hallucinations, des illusions et une incompétence psychosociale marquée. Par ailleurs, son autopsie a révélé une atrophie cérébrale, des changements artérioscléreux, des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires. C'est seulement en 1907, un an après le décès de sa patiente, le 8 avril 1906, qu'Alzheimer publie ce cas dans l'article « *Über eigenartige Erkrankungen der Hirnrinde* ». ¹⁻³ En 1910, le docteur Emil Kraepelin (figure 1) baptise cette maladie en tant que nouvelle pathologie, séparée des autres formes de démence, d'après le nom du docteur Alzheimer. Ce dernier avait toujours évoqué sa « découverte » comme une forme atypique de psychose sénile et non une nouvelle pathologie.^{1,3}



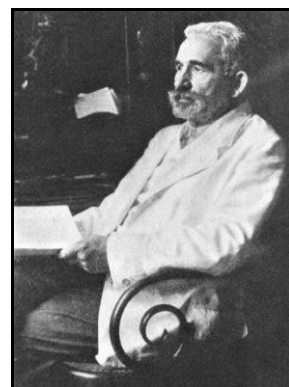
Auguste Deter (1902)²

(16 Mai 1850 – 8 Avril 1906)



Alois Alzheimer §¹

(14 Juin 1864 – 19 Décembre 1915)



Emil Kraepelin (1910)⁴

(15 Février 1856 – 7 Octobre 1926)

Figure 1 : Photographies d'Auguste Deter, première patiente décrite dans la MA, d'Alois Alzheimer et d'Emil Kraepelin, premiers médecins ayant décrit cette pathologie.

B. Caractérisation, symptômes et diagnostic

1. Les différents stades de la MA

La description des symptômes de la MA évolue au fur et à mesure des découvertes scientifiques et technologiques. Décrite sous trois phases dans le début des années 1980 (phase précoce d'oubli, phase intermédiaire de confusion et phase tardive de démence), le Docteur Reisberg crée en 1982 la « *Global Deterioration Scale* » (GDS) décrivant la MA sous sept stades.⁵ Puis, en 2010, un nouveau lexique de la MA a été proposé par « *the International Working Group for New Research Criteria for the Diagnosis of AD* ». ⁶ Ce nouveau lexique comporte trois phases :

- La phase préclinique commence plusieurs années, voire plusieurs dizaines d'années avant l'apparition de symptômes.⁷ Elle se compose elle-même de trois stades :
 - Le premier stade de cette phase débute avec une amyloïdose cérébrale asymptomatique. Les monomères d'Aβ commencent à s'agréger, à quitter leur réservoir dans le liquide cérébro-spinal (CSF) et à s'accumuler à la surface des neurones et dans les synapses. Ces changements ne sont pas détectables par les techniques actuelles.
 - Pendant le deuxième stade, certains biomarqueurs sont détectables, tels que l'augmentation de Tau dans le CSF, l'hyperactivation du cortex

cingulaire postérieur et l'amincissement cortical.⁸ Le patient ne présente aucun symptôme.

- Lors du troisième stade, le patient détecte des symptômes subtils et les biomarqueurs continuent à augmenter. Les performances du patient commencent à diminuer lors des tests cognitifs tels que le MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*) ou le MMSE (*Mini-Mental Status Examination*).⁹
- La phase de déficit cognitif léger (MCI, *Mild Cognitive Impairment*) se caractérise par la réduction des fonctions cognitives alors que le patient reste autonome et un membre actif de la société. Malgré les progrès de la science, le diagnostic de cette phase reste subjectif et requiert des tests cliniques cognitifs et fonctionnels.¹⁰ L'imagerie PET (*Positron Emission Tomography*) et la détection des biomarqueurs permettent néanmoins de différencier la pathologie des autres démences.
- La phase de démence est diagnostiquée lorsqu'au moins deux des domaines suivants sont altérés : la faculté à se souvenir de nouvelles informations, le raisonnement, la capacité à s'orienter dans l'espace, la fonction linguistique ou encore les troubles du comportement ou de la personnalité.¹¹

La MA ayant un début insidieux et une évolution lente et progressive, cette pathologie est difficile à diagnostiquer. Ce diagnostic reste dans le domaine du possible et du probable jusqu'à l'autopsie qui en donne la certitude.

Par ailleurs, certains patients développent la MCI et la démence de la MA sans avoir de dépôts amyloïdes, mais beaucoup plus lentement que les patients ayant cette caractéristique.¹²

2. Biomarqueurs

Un des biomarqueurs directs de la MA est la diminution du niveau d'A β dans le CSF, reflétant l'augmentation des dépôts A β .¹³ Cette mesure peut également être mise en évidence par les images de PET réalisées grâce à différents ligands spécifiques,^{10,11} comme l'augmentation de l'absorption du PiB (*Pittsburgh Compound B*).¹⁴ Il existe aussi des biomarqueurs directs de l'accumulation de Tau totale ou phosphorylée.¹⁰ Néanmoins, comme pour A β , l'augmentation de Tau dans le CSF n'est pas suffisant pour conclure à la MA. En effet, la phosphorylation de Tau est

aussi un marqueur d'autres pathologies telles que les maladies à prion ou le traumatisme crânien. Cette augmentation reflète fortement les dommages des neurones et des synapses, sans être spécifique à la MA.¹⁰ La diminution de Tau monomérique dans le liquide interstitiel, mesurable par microdialyse, corrèle avec l'agrégation de Tau.¹⁵

D'autres marqueurs sont représentatifs de la dégénérescence neuronale : la diminution de l'absorption de FDG (18-fluorodeoxyglucose) en PET dans le cortex temporo-pariétal, ainsi qu'une atrophie disproportionnée dans les lobes temporaux médian, basal et latéral et dans le cortex pariétal médian ont été observés chez des patients MCI.^{10,11}

La neuroinflammation peut être mesurée via le dosage de YKL-40 dans le CSF chez les patients MCI.¹³

La combinaison de la diminution d'A β et l'augmentation de Tau dans le CSF a une sensibilité comprise entre 90 et 95% et une spécificité de plus de 90 % dans le diagnostic de la MA.^{16,17} Cela combiné à la mesure du volume de l'hippocampe, a permis une amélioration du diagnostic de la MA.¹⁸

La recherche de biomarqueurs dans le CSF est une technique invasive et ne peut pas être utilisée en routine. En outre, de nombreux travaux ont été menés sur la recherche de biomarqueurs dans le plasma. Cependant, seule une équipe semble avoir trouvé un groupe de dix lipides issus du sang périphérique : entre autres, la sérotonine, la phénylalanine, la proline, la lysine, la taurine, la phosphatidylcholine et l'acylcarnitine. Toutes ces molécules sont diminuées dans la MA.¹⁹

3. Imagerie

La PET est une imagerie moléculaire permettant aux cliniciens et aux chercheurs de situer le stade de la MA avant le décès du patient. Depuis sa première démonstration, cette technique a révolutionné l'étude des dépôts amyloïdes.²⁰ Avec sa forte sensibilité, elle est capable de détecter des concentrations d'amyloïdes de l'ordre du picomolaire. Le traceur PiB a une affinité de l'ordre du nanomolaire avec les fibres amyloïdes. Il existe de nombreux traceurs ciblant A β . Quant à Tau, le traceur le plus utilisé est ¹¹C-PBB3 qui a en plus l'avantage de présenter moins de bruit de fond que ¹¹C-PiB.²¹

L'Imagerie par résonance magnétique (IRM) est un outil très précieux dans le diagnostic de la MA et le suivi des patients. L'IRM a une plus haute résolution des structures anatomiques et un contraste supérieur à la PET.²²

C. Epidémiologie

La MA est classée comme la 5^{ème} cause de mortalité en France, la 6^{ème} aux Etats-Unis et la 7^{ème} dans le monde. La plupart des décès causés par des maladies telles que les maladies cardiaques, les AVC (accidents vasculaires cérébraux) et les cancers, ont diminué grâce aux progrès de la médecine, alors que les décès causés par des pathologies comme la MA continuent de croître.²³

Le nombre de personnes âgées de plus de 65 ans augmente au sein de la population mondiale : estimé à 420 millions en 2000, il évoluerait à 1 billion en 2030.²³ L'incidence de la MA augmente de façon approximativement exponentielle jusqu'à l'âge de 85 ans.²⁴ Tous les ans, environ 5 à 7 millions de nouveaux cas seraient recensés,²⁴⁻²⁸ ce nombre a été comptabilisé à 9,9 millions en 2015²⁹ (figure 2). Néanmoins, un point de flexion est prévu à cette courbe de progression aux alentours des années 2030. En effet, à cette période, les personnes nées pendant le « baby-boom » (1946-1964) auront passé 65 ans, âge critique pour la détection de la MA.^{30,31}

La prévalence de la MA serait de 4,4% chez une population européenne de plus de 65 ans, en 2006.³⁰ Cependant, le risque de développer la MA tend à diminuer dans les pays développés, grâce à la prise de conscience des facteurs de risque, l'augmentation du niveau d'éducation et une meilleure hygiène de vie. En 2015, 58% des patients Alzheimer vivent dans des pays en voie de développement. Ce pourcentage est estimé à 36% en 2030 et à 68% en 2050.²⁹

Aussi, des études montrent que les femmes seraient plus susceptibles que les hommes de développer la MA. Ce facteur de risque lié au sexe est néanmoins remis en question par la différence d'éducation entre hommes et femmes encore présente au début XX^{ème} siècle. Il en est de même pour les études américaines montrant une prévalence à la MA plus forte chez les afro-américains et les hispaniques par rapport aux caucasiens. En effet, il existe des inégalités sociales non-négligeables entre les

personnes d'ethnies différentes aux Etats-Unis : entre autres, l'accès à l'éducation et aux soins médicaux, ainsi que les conditions de vie.³¹ En outre, il existe aussi un « biais de survie » entre les hommes et les femmes. En effet, les hommes ayant une espérance de vie plus faible que les femmes, seuls ceux étant en meilleure santé sont encore vivant à des âges avancés. Ces hommes présenteraient donc moins de risque de développer la MA.³¹

Par ailleurs, la MA coûte cher à la société : dans le monde, elle a coûté 818 milliards de dollars en 2015 et ce montant est estimé à 1 trillion pour 2018.²⁹ Cela fait donc de cette pathologie un enjeu sociétal majeur.

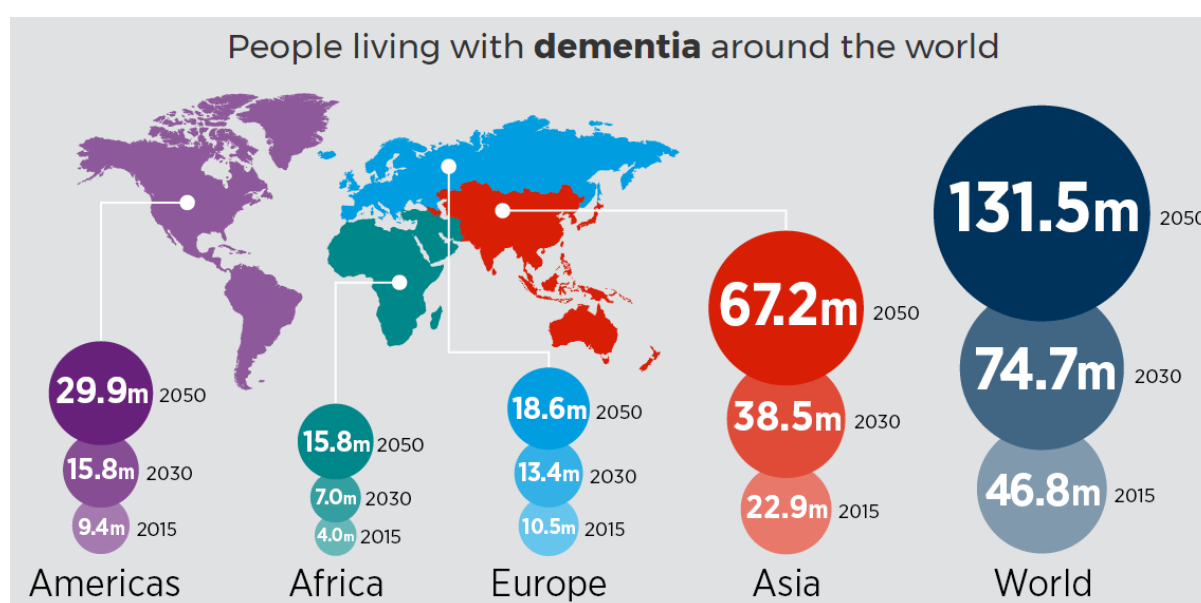


Figure 2 : Estimation du nombre de patients vivant avec une démence à travers le monde en 2015, et prévision pour les années 2030 et 2050. (Infographie issue de ^{§2})

D. Etiologie et mécanismes

1. Les facteurs de risque et de protection

Deux formes se distinguent dans la MA :

- La forme autosomique dominante, aussi appelée forme familiale (FAD) ou « *early-onset Alzheimer's disease (EOAD)* ».
- La forme sporadique (SAD), aussi appelée « *late-onset AD (LOAD)* ».

Trois gènes ont été identifiés dans la transmission autosomique dominante de la MA, causée par des mutations faux-sens. Ces gènes sont ceux codant la préséniline 1 (PS1) située sur le chromosome 14, la préséniline 2 (PS2) sur le chromosome 1 et APP sur le chromosome 21.^{32,33} Il existe 32 mutations d'APP, 179 de PS1 et 14 de PS2 pouvant causer la forme familiale de la MA.³⁴

La forme sporadique est, quant à elle, multifactorielle. Nous parlons donc de facteurs de risques pouvant aggraver ou accélérer l'évolution de la pathologie.

a. Facteurs de risques

De nombreux facteurs de risque ont été mis en évidence dans le développement de la MA, l'âge étant le facteur prépondérant.

Un tiers des cas de la MA serait la conséquence de l'un de ces sept facteurs de risque modifiables : diabète, hypertension artérielle, obésité, tabagisme, dépression, inactivité cognitive, faible niveau de scolarité.^{35,36} En effet, l'obésité est largement associée à l'augmentation des risques d'hypertension, d'AVC, d'inflammation et de troubles métaboliques tels que les diabètes.³⁷⁻³⁹ Le diabète de type 2 étant lui-même corrélé au risque de développer la MA et à la neurodégénérescence.^{40,41} La résistance à l'insuline serait associée à la réduction du taux métabolique du glucose lors des premiers stades de la MA, augmentant ainsi la production de peptides amyloïdes.⁴² Les régimes riches en sucres et en graisses saturées auraient également des effets néfastes sur la cognition.⁴³ Aussi, le stress aurait des effets nocif sur la MA, comme pour de nombreuses autres pathologies chroniques,^{44,45} probablement via son lien avec le système immunitaire.⁴⁶ En outre, la carence en vitamine D serait un facteur de risque important pour la MA.⁴⁷ En effet, cette déficience en vitamine D limiterait la stimulation des macrophages pour nettoyer les plaques amyloïdes. Il y aurait donc moins de protection contre la cytotoxicité induite par les amyloïdes, ainsi que le déclin de la fonction cérébrovasculaire.⁴⁸

Par ailleurs, de nombreux autres facteurs environnementaux sont considérés comme des facteurs de risque de la MA. Parmi ceux-ci, les métaux toxiques, tels que l'aluminium et le sélénium, les pesticides tels que le fipronil, les polluants industriels et commerciaux tels que le bisphénol A, les phtalates et le silicone, les antimicrobiens tels que les parabènes, les polluants aériens.⁴⁹ Les pesticides sont des facteurs environnementaux ayant une influence sur le développement de

nombreuses pathologies, dont la MA. En effet, plusieurs études ont montré que les personnes exposées à ces produits ont 1,4 à 2,4 fois plus de risques de développer la MA que des personnes exposées à aucun pesticides.⁵⁰⁻⁵³ Les pesticides sont responsable de divers mécanismes de toxicité dans la cellule. La neurotoxicité est le mécanisme le plus fréquent, juste après la cancérogénicité.⁵⁴ Trois pathologies ont particulièrement été reliées à l'incidence des pesticides : la MA, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique. Cela pourrait s'expliquer par le principal mécanisme de toxicité des insecticides, ciblant des composants du système nerveux.^{55,56} Parmi les insecticides, le fipronil, un phenylpyrazole neurologique, serait responsable de l'altération des voies locomotrices de la colonne vertébrale et provoquerait une neurodégénérescence chez le poisson-zèbre.⁵⁷ Il occasionnerait des effets légers et temporaires sur la santé, notamment des symptômes neurologiques chez l'humain,⁵⁸ mais pourrait aussi être responsable de remodelages des neurotransmissions GABAergiques,⁵⁹ suggérant alors qu'une exposition longue au fipronil serait un facteur de prédisposition à la MA.⁴⁹

Des facteurs de risques génétiques ont aussi été soulignés lors de plusieurs travaux, notamment au cours d'études de large association du génome (GWAS, *Genome Wide Association Studies*). Ces recherches ont permis l'identification d'une vingtaine de loci associés à la MA.²³ Depuis quelques années, 9 loci ont été significativement associés à la MA : *ABCA7*, *APOE*, *BIN1*, *CLU*, *CR1*, *CD2AP*, *EPHA1*, *MS4A6A-MS4A4E* et *PICALM*. Puis, une GWAS publiée en 2013 montre une association de 11 loci supplémentaires : *CASS4*, *CELF1*, *FERMT2*, *HLA-DRB5-DRB1*, *INPP5D*, *MEF2C*, *NME8*, *PTK2B*, *SLC24A4*, *SORL1* et *ZCWPW1*.⁶⁰

L'allèle *APOEε4* (Apolipoprotein E) est le plus grand facteur de risque génétique de la MA⁶⁰, particulièrement en comparaison avec *APOEε3*.²³ *APOE* jouerait un rôle dans le métabolisme et le dégagement des amyloïdes.⁶¹ Plusieurs GWAS ont associé *APOE* à *TOMM40* (*Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 40 homolog*) et à *APOC1*.²³ Le gène *CLU*, en particulier l'allèle *CLU-C*, a été identifié par plusieurs GWAS comme facteur de risque dans la MA.⁶² *SORL1*, *CASS4* et *INPP5D* sont impliqués dans la voie métabolique d'APP, et *CASS4* et *FERMT2* dans celle de Tau. Les loci *HLA-DRB5-DRB1*, *INPP5D* et *MEF2C* ont un rôle dans les fonctions immunitaires et inflammatoires, et *SORL1* dans le transport lipidique et l'endocytose. *FERMT2* est aussi un important médiateur de

l'angiogenèse. PTK2B serait un intermédiaire entre les neurotransmetteurs augmentant le flux de calcium et les signaux régulant l'activité neuronale, tels que la signalisation des MAPK. *SLC24A4* est lié au développement de l'iris et aux variations de couleur de la peau et des cheveux. Ce gène serait aussi impliqué dans le développement neural. *ZCWPW1* module la régulation épigénétique et *CELF1* régule l'épissage alternatif des pre-ARNm, tandis que *NME8* est responsable de la dyskinésie ciliaire primitive de type 6.

CD33, une protéine transmembranaire impliquée dans l'immunité innée, a été identifiée comme facteur de risque lors d'une GWAS.^{63,64} Une autre étude a montré que cette protéine inhibe l'absorption et le dégagement d'A β par les cellules microgliales *in vitro* et *in vivo*.⁶⁵ TREM2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) est associé à la forme récessive de l'EOAD,⁶⁶ notamment le variant R47H qui augmente significativement le risque de développer la MA en interférant avec le rôle anti-inflammatoire de la protéine dans le cerveau.⁶⁷ STEP (*Striatal-enriched phosphatase*) régule l'internalisation de NMDA et de ses ligands, incluant A β .⁶⁸ L'hyperphosphorylation de Tau est promue par la neuroinflammation. Les individus déficients en CX3CR1 (*microglial specific fractalkine receptor*) seraient plus susceptibles d'avoir une hyperphosphorylation de Tau.⁶⁹

L'autophagie est un mécanisme essentiel permettant la suppression des peptides s'agrégeant dans la cellule, particulièrement des peptides A β . PS1, une sous-unité de la γ -sécrétase, est indispensable pour la protéolyse dépendante du lysozyme, impliquée dans l'autophagie.⁷⁰ Cependant, les inhibiteurs de γ -sécrétase n'impactent pas l'autophagie, le rôle de PS1 dans l'autophagie est donc indépendant de son rôle dans le complexe de la γ -sécrétase.⁷¹

L'acétylation des histones déstabilise leur affinité électrostatique avec l'ADN. Cela permet un meilleur accès à la chromatine pour la transcription. Il s'agit d'un processus épigénétique critique pour l'apprentissage et la mémoire. Des travaux ont montré la présence d'histones phosphorylées⁷² et déacétylées, par (HDAC)-2,⁷³ dans les cerveaux de patients Alzheimer ou de modèles animaux, respectivement.

b. Facteurs protecteurs

Bien que la plupart des études démontrent que l'exercice physique régulier a un effet bénéfique sur le cerveau, notamment lorsque cet effort est combiné à des

taches cognitives, certaines d'entre elles ne démontrent en revanche aucun effet significatif.⁷⁴⁻⁷⁶ Marcher, par exemple, augmenterait le volume de matière grise, ce qui est un facteur protecteur contre le déficit cognitif.^{77,78} Un autre exemple : un entraînement régulier d'exercices d'aérobic pourrait inverser la perte du volume de l'hippocampe et donc améliorer les fonctions cognitives et retarder son déclin.⁷⁹ L'alimentation aurait également un rôle : les fruits de mer⁸⁰ et le régime crétois (riche en fruits, légumes, légumineuses, céréales, herbes aromatiques et huile d'olive),⁸¹ seraient protecteurs. Les activités exigeantes sur le plan mental auraient aussi un effet défensif : l'excès de connexions dendritiques fournirait une réserve, de sorte que la fonction exécutive serait toujours conservée avec l'atrophie cérébrale croissante.⁸²

D'un point de vue génétique, la mutation A673T d'APP adjacente au clivage de BACE1 réduirait la formation de peptides A β de 40%, protégeant ainsi contre la MA et les déficits cognitifs liés à l'âge.⁸³ Aussi, comme évoqué précédemment, l'allèle APOE ϵ 3 serait protecteur par rapport à l'allèle APOE ϵ 4.²³

Il a été observé, aussi bien chez les souris que chez les humains, que l'exercice et la stimulation intellectuelle réduisent la production de peptides A β en stimulant les processus synaptiques et les facteurs de croissance. Cette réduction est corrélée avec une diminution de la perte de mémoire.⁸⁴⁻⁸⁶

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

L'APP est une protéine transmembranaire de type 1 (intégrale) qui est à la fois impliquée dans les trafics cellulaires de sécrétion et d'endocytose.⁸⁷

a. Synthèse d'APP

Chez l'Homme, le gène codant APP est localisé sur le chromosome 21 et peut générer 11 isoformes selon l'épissage alternatif de son ARNm (305, 639, 677, 695, 696, 714, 733, 746, 751, 752 et 770 acides aminés).^{88,89} L'isoforme majoritaire dans les neurones est APP 695 tandis qu'APP 751 et APP 770 sont exprimées dans les cellules gliales.⁸⁸

La différence principale entre les isoformes d'APP est l'absence (APP 695) ou la présence (APP 751 et 770) du domaine KPI (*Kunitz protease inhibitor*) situé du

La majorité d'APP circule dans le réticulum endoplasmique (RE) tandis que seulement 10% arrivent à la membrane plasmique.⁸⁷



4) :

membrane. Le peptide CTF99 est ensuite clivé par la γ -sécrétase libérant alors le peptide A β de 4 kDa dans le milieu extracellulaire et le domaine intracellulaire d'APP « AICD » dans le cytoplasme.^{33,87} La β -sécrétase génère donc le côté N-terminal d'A β et la γ -sécrétase son côté C-terminal. Ce clivage est hétérogène et produit plusieurs formes d'A β dont la plus commune est A β_{40} . La forme A β_{42} , plus longue et plus hydrophobe, est plus enclin qu'A β_{40} à former des fibrilles.³³

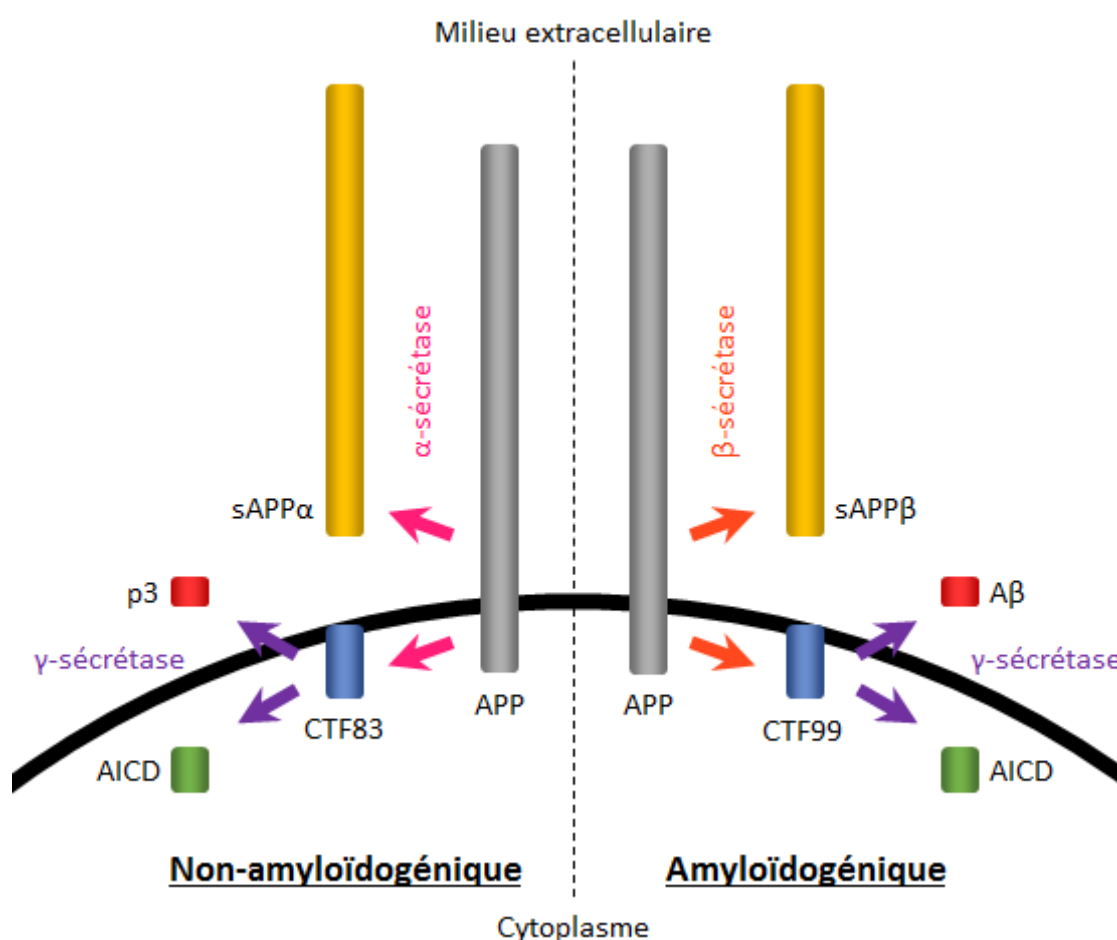


Figure 4 : Voies métaboliques d'APP. (Schéma inspiré de ⁸⁷)

L'endroit du processing d'APP n'est toujours pas clair : différents travaux rapportent un processing au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique, du réseau trans-Golgi, des vésicules d'endosomes, de la mitochondrie ou encore des radeaux lipidiques.⁸⁷

α -sécrétase

Seule une faible quantité d'APP est clivée par la β -sécrétase, elle est majoritairement clivée par l' α -sécrétase, dont l'activité est inductible par la protéine kinase C (PKC).³³ Le clivage initial d'APP par l' α -sécrétase se produit entre la lysine 16 et la leucine 17 de la séquence d'A β . Cette action est suivie par le clivage sélectif de la lysine 16 par une carboxypeptidase.⁹⁰

L' α -sécrétase est une métalloprotéinase de zinc liée à la membrane. Elle se compose des membres ADAM9, ADAM10 (aussi appelée MADM pour « *Mammalian Disintegrin-Metalloproteinase* »⁹¹), ADAM19 ou ADAM17 (aussi appelé TACE pour « *Tumor Necrosis Factor Converting Enzyme* ») de la famille ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*).⁸⁷ Les ADAM sont des protéines membranaires de type 1 de la famille des metzincin et requièrent un ion zinc pour leur activité protéolytique.⁹² ADAM10 est la forme dominante dans les neurones.⁸⁷ Elle mesure environ 750 acides aminés et se compose des domaines classiquement retrouvés chez les autres membres de la famille ADAM (figure 5) à l'exception de l'EGF (*epidermal growth factor-like domain*), absent d'ADAM10.⁹³

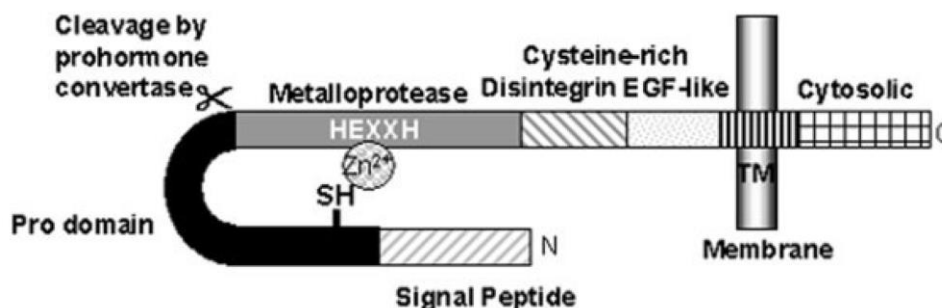


Figure 5 : Structure d'une ADAM typique. Ce sont des protéines membranaires intégrées de type 1 avec une structure multi-domaine consistant en : (1) un peptide signal N-terminal ; (2) un pro-domaine contenant un commutateur de cystéine (SH) suivi d'un site de clivage (RVKR2R) pour la sérine protéase furine ; (3) un domaine catalytique contenant le motif de liaison au zinc HEXGHXXGXXHD et un motif structural « methionine turn » dans le site de l'hélice active ; (4) un domaine riche en cystéine / désintégrine / EGF ; (5) un domaine transmembranaire hydrophobe (TM) ; et (6) un domaine cytoplasmique riche en proline et contenant parfois des sites potentiels de phosphorylation et des sites de liaison SH3. (Schéma issu de ⁹⁴)

L' α -sécrétase est la principale enzyme d'excrétion (ou « sheddase ») pour les protéines membranaires et est impliquée dans différents mécanismes physiologiques

et pathologiques, tels que le développement embryonnaire, l'adhésion cellulaire, la transduction du signal, le système immunitaire et la MA.

β -sécrétase

La β -sécrétase, aussi connue sous les noms de BACE1, memapsin et Asp2,^{95–99} est une protéase de 501 acides aminés, indispensable à la génération des peptides A β (figure 6). Elle est exprimée dans la majorité des types cellulaires,¹⁰⁰ avec une plus haute activité dans les tissus neuronaux.¹⁰¹ Le fait que la β -sécrétase ne clive que des substrats liés à la membrane suggère que l'enzyme est elle-même liée à la membrane ou associée à une protéine membranaire.¹⁰² Par ailleurs, son activité est optimale dans un milieu au pH acide,^{87,103–106} ce qui suggère que la β -sécrétase a son site d'action dans la lumière des compartiments intracellulaires acides tels que le réseau trans-Golgi et les endosomes.^{107,108}

Le clivage par la β -sécrétase est hautement spécifique et a principalement lieu au niveau de l'Asp+1 de l'A β .¹⁰⁹ Néanmoins, quelques espèces mineures d'A β commencent à Ile-6, Val-3 ou Glu+11.¹⁰⁰ Notons cependant que des travaux suggèrent que les peptides clivés à Ile-6 et Val-3 peuvent aussi être générés par une autre protéase.¹¹⁰ Par ailleurs, une faible augmentation de l'expression de BACE1 résulte en une nette augmentation de la production d'A β , et l'activité de BACE1 augmente avec l'âge.¹¹¹

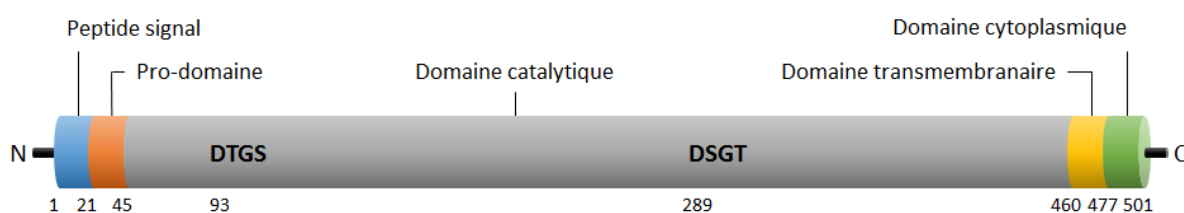


Figure 6 : Structure de BACE1. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type 1 composée de cinq domaines majeurs¹¹¹ : (1) un peptide signal situé du côté N-terminal et (2) un pro-domaine éliminés après la traduction, ainsi la protéine mature démarre à la Glu46 ; (3) un domaine catalytique comprenant deux motifs aspartiques (DTGS et DSGT) indispensables à son activité ; (4) un domaine transmembranaire ; et (5) une queue cytoplasmique palmitylée.

En outre, les sécrétases α et β sont en compétition pour le clivage d'APP. Le clivage par l' α -sécrétase se déroule au niveau de la membrane plasmique mais peut

aussi avoir lieu dans le réseau trans-Golgi.^{112,113} Celui de la β -sécrétase est principalement réalisé dans les endosomes, et en petite quantité dans le réseau trans-Golgi.^{97,107} Cette compétition entre les deux sécrétases peut s'expliquer dans le cas d'une surexpression de BACE1, qui cliverait alors APP dans les premiers compartiments de la voie sécrétoire. Aussi, chez les mutants « Swedish APP », APP semble avoir plus d'affinité pour la β -sécrétase qui clive la protéine avant qu'elle ne rencontre l' α -sécrétase.⁹³

γ -sécrétase

Le terme « γ -sécrétase » a été utilisé pour la première fois en 1993 pour décrire l'activité protéolytique de clivage d'APP.¹¹⁴ Il s'agit d'une aspartyl-protéase composée de quatre sous-unités (figure 7) : un domaine catalytique, préséniline, formé par PS1 ou PS2 (*Presenilin 1* ou *Presenilin 2*) ; un récepteur de substrat, nicastrine ; un stabilisateur, APh-1 (*Anterior Pharynx Defective*) ; et un pivot, PEN2 (*Presenilin Enhancer-2*). Les deux protéines homologues PS1, codée sur le chromosome 14q24.3, et PS2, sur le chromosome 1q42.2, partagent 67% d'identité.^{114,115} Elles sont synthétisées comme précurseurs protéiques de 50 kDa contenant neuf domaines transmembranaires,^{114,116,117} puis clivées en un fragment N-terminal de 30 kDa et un fragment C-terminal de 20 kDa pendant leur phase de maturation.¹¹⁸ PS1 et PS2 font partie des protéines de clivage intermembranaires, aussi appelées « i-clip ». Elles sont cependant à part dans leur famille : pour avoir une activité optimale, elles ont besoin de trois autres sous-unités protéiques. La nicastrine est une protéine membranaire intégrale de type 1 mesurant 130 kDa.¹⁰³ L'Aph-1 est une protéine de 30 kDa possédant 7 domaines transmembranaires. Et Pen-2 une protéine « hairpinlike » de 12 kDa possédant 2 domaines transmembranaires.¹¹⁹ Les quatre protéines sont nécessaires et suffisantes pour le processing d'APP par la γ -sécrétase. Etant donné qu'il y a deux gènes codant la préséniline et deux gènes codant Aph-1, et que chacun de ces gènes est soumis à l'épissage alternatif, il existe de nombreuses combinaisons possibles formant le complexe de la γ -sécrétase.¹¹⁴

La grande majorité de la γ -sécrétase est présente à 95% entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, alors qu'une faible portion de 5% réside à la membrane plasmique et dans les compartiments des endosomes.¹¹⁵ La nicastrine et Aph-1

forment un premier sous-complexe dans le réticulum endoplasmique,¹²⁰ qui interagit par la suite avec le second sous-complexe formé par PS et Pen-2.¹²¹ Aph-1 interagirait également avec la région C-terminale de PS.¹²² La purification de la γ -sécrétase montre la présence d'une poche intérieure cylindrique d'une longueur comprise entre 20 et 40 Å correspondant au site protéolytique.

Les présénilines auraient également un rôle dans le transport cellulaire et agiraient aussi en tant que canaux à calcium.¹¹⁴

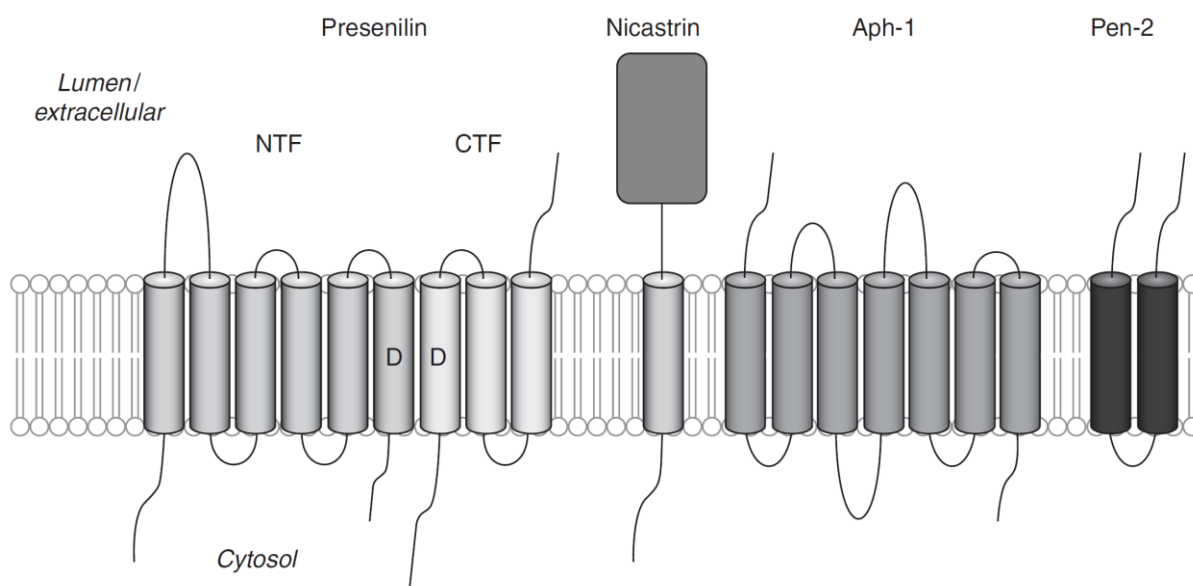


Figure 7 : Sous-unités du complexe de la γ -sécrétase et leurs topologies membranaires. La préséniline est séparée en deux fragments lors de la maturation du complexe, un fragment amino-terminal (NTF) et un fragment carboxy-terminal (CTF). Les deux résidus d'acide aspartique catalytiques transmembranaires, un dans le NTF et un dans le CTF sont indiqués par D. La nicastrine possède un grand domaine extracellulaire fortement glycosylé et strictement replié pendant la maturation. Les autres sous-unités sont APH-1 et PEN-2 (Schéma issu de ¹¹⁴).

Le clivage d'APP par la γ -sécrétase s'effectue à trois sites différents, séparés de trois acides aminés : ϵ , γ et ζ .⁸⁷ Le CTF99 d'APP est clivé, par la γ -sécrétase, dans son domaine transmembranaire. Ce clivage s'effectue d'abord au site ϵ situé à l'interface intracellulaire, générant deux AICD différents de 50 ou 51 acides aminés. La γ -sécrétase divise ensuite ce domaine transmembranaire, au niveau de sites ϵ , à chaque tour d'hélice α (correspondant à 3-4 acides aminés), libérant ainsi plusieurs longueurs de peptides A β . Les peptides β se forment donc selon deux lignes de production à partir du premier clivage : la voie AICD51/A β 48 (A β 48 \rightarrow A β 45 \rightarrow A β 42 \rightarrow A β 38) et la voie AICD50/A β 49 (A β 49 \rightarrow A β 46 \rightarrow A β 43 \rightarrow A β 40).¹²³

c. Dégradation des peptides A β

La production de peptides A β est normalement contrebalancée par différents processus, tels que la dégradation protéolytique, la clairance médiée par la cellule, le transport actif en dehors du cerveau et la déposition en agrégats insolubles. La dégradation protéolytique jouerait un rôle particulièrement important sur le niveau de peptides A β cérébral. Par extension, ce mécanisme serait important dans les pathologies associées au peptide A β . Ainsi, les protéases de dégradation d'A β , à savoir, la neprilysine, les « endothelin converting enzymes », l'enzyme de dégradation de l'insuline, la plasmine et d'autres enzymes, jouerait un rôle important dans la MA.¹²⁴

La neprilysine (NEP) est la peptidase d'A β la plus efficace. Il s'agit d'une métallo-endopeptidase dépendante du zinc de 93 kDa. Elle est classée dans les glycoprotéines membranaires de type 2. Son site actif se situe dans l'espace extracellulaire ou intra-luminal. Elle est également retrouvée au début du Golgi, dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans les autres compartiments subcellulaires.¹²⁴

L'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) est une métallo-endopeptidase dépendante du zinc de 110 kDa. Certaines études la considèrent comme la peptidase majeure d'A β . De plus, elle affecterait également ce peptide de manière indirecte. En effet, elle affecterait les niveaux d'AICD, qui seraient impliqués dans la régulation transcriptionnelle d'APP¹²⁵ et dans l'expression de NEP.^{126,127}

Les « endothelin converting enzymes » 1 et 2 (ECE1 et ECE2) sont des métalloprotéinases dépendantes du zinc et liées à la membrane, de la même famille que NEP (famille M13).¹²⁴

La plasmine est une sérine-protéase ayant la capacité de dégrader et de réduire la toxicité des monomères ainsi que des fibrilles d'A β .^{128–131}

D'autres enzymes telles que les métalloprotéases de matrice MMP2 et MMP9, l'« angiotensin-converting enzyme », une métalloprotéase, et la cathepsine D, une aspartyl-protéase, pourraient jouer un rôle dans la dégradation des peptides A β .¹²⁴

d. Toxicité des peptides A β

Le peptide A β a été découvert en 1984 et identifié comme le principal composant des dépôts amyloïdes. Glenner et Wong ont purifié la protéine à partir de

cerveaux de patients atteints de démence et ont émis l'hypothèse de la cascade amyloïde dans le début des années 1990.^{132,133} Certains peptides A β , notamment les formes longues, seraient les composés les plus pathogènes de la MA.²³ Il est issu du clivage de la protéine APP exprimée dans les cellules gliales, endothéliales, épithéliales et du foie. Le rôle de cette protéine n'est pas encore clair, mais il semblerait qu'elle agisse sur la prolifération et l'adhésion cellulaire, la régulation intracellulaire du calcium, l'homéostasie des ions métalliques et la liaison au cholestérol.^{134–137}

Les peptides A β sont sécrétés dans le liquide interstitiel (ISF).¹³⁸ Chez les personnes saines, l'excès de peptides A β est dégradé par plusieurs enzymes, mais chez les patients Alzheimer, ces peptides ont une mauvaise conformation, s'agrègent et deviennent neurotoxiques.¹³⁹ Souvent, les domaines d'hélice α deviennent des feuillets β à cause d'une mauvaise conformation, résultant ainsi en une agrégation et une toxicité des peptides amyloïdes. Ce processus de mauvaise conformation, l'amyloïdose,¹⁴⁰ est présente dans une cinquantaine de pathologies différentes, dont la MA.¹⁴¹ Les peptides A β se retrouvent sous différentes structures moléculaires : monomères, fibrilles et oligomères insolubles. La forme la plus présente dans les cerveaux de patients Alzheimer sont les fibrilles,¹⁴² mais la plus toxique semble être les oligomères intermédiaires.¹⁴³ En effet, des études ont montré que les formes A β oligomériques sont plus toxiques que les fibrilles et sont responsables de l'effondrement synaptique et de la perte de l'épine dendritique. Les peptides A β peuvent s'agréger sous différentes formes : les trimères sont 3 fois plus toxiques que les monomères et les tétramères le sont 13 fois plus. La puissance de toxicité des structures de peptides A β est donc la suivante : tétramères > trimères > dimères > fibrilles > monomères.¹⁴⁴

Lorsque le peptide A β possède deux cystéines, les agrégats sont 50 fois plus toxiques, cette mutation leur donne de la stabilité.¹⁴⁵ La structure des fibrilles d'A β peut différer entre les patients Alzheimer ayant une histoire clinique différente. Lu *et al.* suggèrent que la MA pourrait se propager à partir d'un seul site initial dans le cerveau, qui serait en amont de la cascade amyloïde.¹⁴²

Le clivage anormal d'A β déplace le ratio de peptides A β 40, isoforme la plus abondante, vers la forme A β 42, isoforme la plus toxique. Aussi, le ratio A β 42/A β 40 est plus élevé chez les patients Alzheimer que chez les personnes saines. A β 43 est

plus toxique que A β 42.¹⁴⁶ Le peptide A β 43 est ensuite clivé en A β 40 alors que A β 42 est indépendamment clivé à partir de A β 48.¹⁴⁷

La neurotoxicité des amyloïdes peut être causée par de nombreux facteurs, tels que les réactions inflammatoires avec la membrane cellulaire,¹⁴⁸ le stress oxydatif causé par les dérivés réactifs de l'oxygène¹⁴⁹ ou par la coordination A β -métal,^{150–154} la compétitivité de liaison avec les récepteurs membranaires,¹⁵⁵ la formation de canaux ioniques,^{143,156} la perméabilité et l'amincissement de la membrane cellulaire,^{157,158} la surexcitation du récepteur NMDA¹⁵⁹ et la modification de la structure de l'ADN via l'interaction avec les peptides A β .¹⁶⁰ De plus, il a récemment été montré, une possible interaction entre A β et la mitochondrie : certaines formes d'A β réduiraient l'activité enzymatique du complexe IV de la chaîne respiratoire, diminuant ainsi la consommation en oxygène, le métabolisme du glucose dans le cerveau et la quantité d'ATP.¹⁶¹ Les interactions entre les peptides A β et les cellules mèneraient, néanmoins, à des propriétés bactéricides.¹⁶²

Par ailleurs, la relation entre les peptides amyloïdes et les prions ont été très étudiées ces dernières années. En effet, A β présente plusieurs propriétés ressemblant aux prions, notamment la tendance à une mauvaise conformation et à se transmettre entre les humains via la dure-mère d'un donneur au receveur ou via les instruments chirurgicaux. Ces peptides resteraient cependant non infectieux.^{163,164}

3. La protéine Tau

La protéine Tau a été découverte en 1975 lors de travaux sur l'assemblage des microtubules.^{165,166} Chez l'humain, son gène *MAPT* (*Microtubule-Associated Protein-Tau*) est situé sur le chromosome 17 et occupe une région de 100 kb comprenant 16 exons. La protéine est principalement localisée dans le cerveau et 6 isoformes ont été détectées dans le système nerveux central. Ces six isoformes peuvent être classées en deux groupes : celui dont la protéine comprend trois répétitions (3R) et celui avec quatre répétitions (4R, Figure 8).

Tau est abondamment et principalement présente dans les axones des neurones¹⁶⁷ et elle adopterait une structure ressemblant à un trombone.¹⁶⁸ Sa première fonction est de promouvoir l'assemblage et la stabilité des microtubules en

formant des structures appariées hélicoïdales, permettant ainsi le transport cellulaire de macromolécules.¹⁶⁹ Tau est facilement phosphorylée, ce qui permet sa mobilité à travers le neurone. Quand Tau est phosphorylée au niveau des régions riches en proline, la protéine est adressée aux compartiments somatodendritiques. Lorsque qu'elle est phosphorylée dans sa région C-terminale, elle est localisée dans la partie distale des axones.^{170–172} Les sites de phosphorylation de Tau peuvent être classés en 2 groupes : ceux modifiés par des sérine/thréonine kinase dirigées vers des prolines (telles que CDK5, GSK3, MAPK, JNK) et ceux modifiés par des kinases non dirigées vers des prolines (telles que MARK, PKA, PKC, CaMKII).^{169,172–175} La protéine Tau possède 79 sites potentiels de phosphorylation. Dans les conditions normales, Tau est active avec environ 30 sites phosphorylés.¹⁷⁶ Cependant, lorsqu'elle est hyperphosphorylée, elle devient insoluble, tend à s'agréger et perd son affinité pour les microtubules.

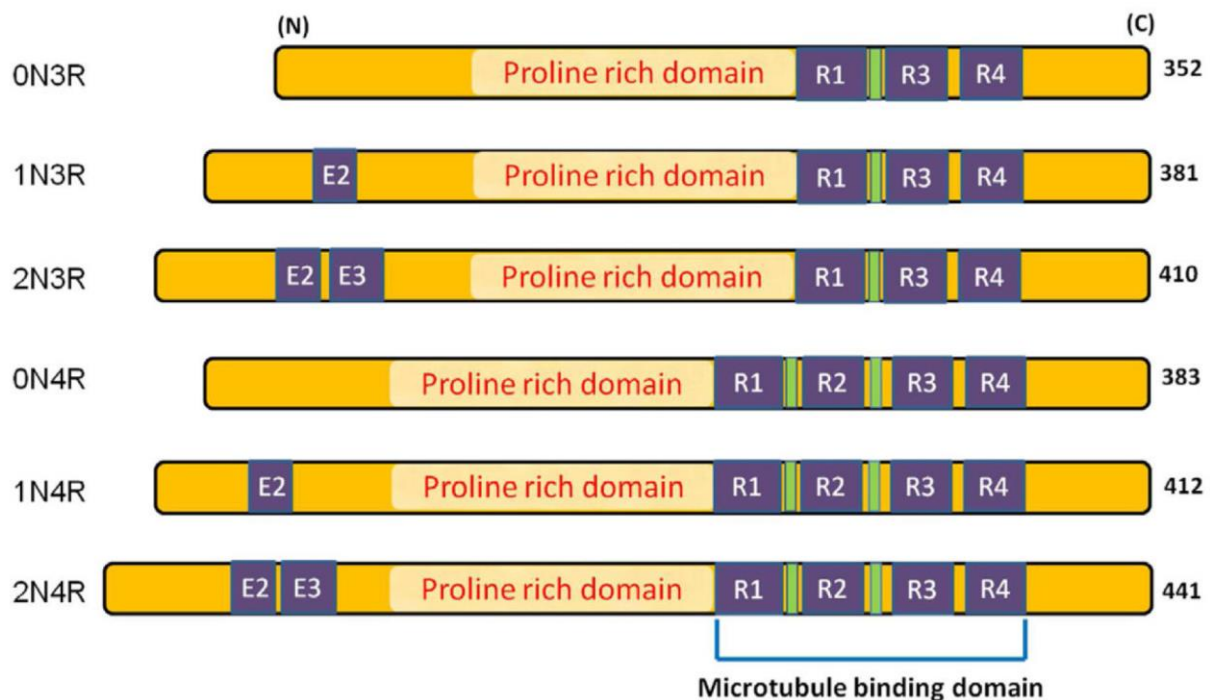


Figure 8 : La protéine Tau humaine est présente sous 6 isoformes dans le cerveau. L'absence des exons 2 et 3 (E2, E3) à l'extrémité N-terminale de tau est caractéristique des isoformes 0N, la présence d'E2 des isoformes 1N et celle de E2 et E3 des isoformes 2N. La présence ou l'absence de répétitions R1-R4 dans le domaine de liaison aux microtubules distingue les isoformes 3R ou 4R. La plupart des sites de phosphorylation se trouvent dans le domaine riche en proline, présent dans les six isoformes. (Figure issue de ³⁴)

La protéine Tau est impliquée dans la MA, mais également dans de nombreuses autres maladies, telles que l'encéphalopathie traumatique chronique, la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence corticobasale, la maladie des grains argyrophiles, la démence fronto-temporale et le parkinsonisme lié au chromosome 17. Ces pathologies sont dues à des inclusion de Tau dans les neurones,¹⁷⁷ parfois dans la glie,¹⁷⁸ ou plus rarement dans l'espace intracellulaire.¹⁶⁷ Certains patients présentent des agrégats de Tau dans le cerveau sans pour autant montrer de déficit cognitif, on parle alors de tauopathie primaire liée à l'âge.¹⁷⁹ Les mutations dans le gène *MAPT* sont responsables de la mauvaise conformation de Tau et mènent à la démence fronto-temporale, aussi appelée maladie de Pick, différente de la MA par son absence de plaque A β .¹⁷⁸ Tout comme pour A β , la voie pathologique de Tau passe par de nombreux intermédiaires avant d'arriver à leur structure finale sous forme de PHF (*Paired Helical Filament*)¹⁸⁰ ou de NFT (*Neurofibrillary Tangles*).¹⁶⁷ Les formes intermédiaires des agrégats de Tau causent une cytotoxicité et une déficience cognitive,^{181–183} et la formation, en grande quantité, de NFT est associée au stress oxydatif.^{184,185}

Contrairement aux lésions d'A β qui commencent dans le néocortex et se diffusent dans l'hippocampe, les lésions de Tau apparaissent, en premier lieu, dans le locus coeruleus et dans le cortex entorhinal avant de s'étendre dans l'hippocampe et le néocortex.¹⁷⁸ Les symptômes de la MA sont généralement visibles lorsque les inclusions de Tau et les dépôts A β sont tous deux retrouvés dans le néocortex.¹⁸⁶ Tout comme pour A β , quelques agrégats de Tau peuvent promouvoir leur agrégation à plus grande échelle dans les neurones.¹⁸⁷ Il a aussi été montré que l'agrégation de Tau se propage de neurone en neurone le long du circuit neuronal, commençant dans le cortex entorhinal.¹⁸⁸ Il semblerait que l'agrégation de Tau entraîne l'accélération de son acétylation,¹⁸⁹ alors que son hyperphosphorylation entraîne son agrégation¹⁹⁰ quoique insuffisante à elle seule.¹⁷⁸

La toxicité et le rôle de Tau dans la MA semblent liés à sa relation avec A β . De nombreux mécanismes de toxicité ont été mis en évidence, tels que l'altération de la stabilité des microtubules,¹⁹¹ la régulation de l'activité neuronale¹⁵⁹ et l'interaction de Tau avec Fyn.¹⁶¹ Il semblerait que, comme pour A β , les structures oligomériques de Tau soient les plus toxiques^{192–194} alors que les NFT seraient inertes. Tau est principalement trouvée dans les axones et semble avoir une fonction dans les

dendrites. La perturbation de Tau mènerait alors à une dysfonction dendritique.¹⁹⁵ Il a été montré que seule la forme pro-agrégée de Tau cause la perte synaptique et l'hyperphosphorylation¹⁹⁶ et que cette perte synaptique causée par la toxicité de Tau serait réversible. Par ailleurs, l'interaction avec Tau est nécessaire pour la toxicité d'A β .^{159,161,197–199} En absence de Tau, les neurones sont protégés de la toxicité d'A β .¹⁹¹ Cela pose donc la question de la place de Tau dans la cascade amyloïde. Roberson *et al.* suggèrent que l'absence de Tau n'est pas neuroprotectrice mais détériore le mécanisme liant A β et Fyn.^{159,161} Une autre hypothèse est que Tau hyperphosphorylée a une grande affinité pour Fyn, sensibilisant ainsi les récepteurs NMDA et les rendant plus sensibles à la toxicité d'A β .¹⁴² D'autres travaux suggèrent que l'interaction entre Tau et A β réduit la formation de fibrilles, résultant ainsi à une plus grande quantité d'agrégats oligomériques et donc plus toxiques.²⁰⁰

En outre, contrairement aux mutations d'*APP*, celles de *MAPT* ne sont pas responsables de l'EOAD. Mais les patients présentant des plaques A β sans NFT, ne semblent pas développer la MA.^{178,201}

E. Traitements

A ce jour, il n'existe aucun traitement permettant de guérir ou de stopper l'évolution de la MA. Cependant quelques médicaments permettent de ralentir son évolution.

1. Traitements commercialisés

L'acétylcholine est l'un des plus importants neuromédiateurs au niveau des régions impliquées dans la mémorisation. Dans le cas de la MA, une diminution des transmissions cholinergiques est observée suite à la perte des neurones correspondants.²⁰² Les cholinestérases sont les enzymes hydrolysant l'acétylcholine au niveau du cerveau.²⁰³ Bloquer leur action permet donc d'augmenter les concentrations d'acétylcholine au niveau synaptique et ainsi d'améliorer les fonctions cognitives par l'augmentation des transmissions.²⁰⁴ Actuellement, il existe trois molécules inhibitrices de ces cholinestérases sur le marché : le donepezil, la rivastigmine et la galantamine.

D'autre part, la libération excessive de glutamate suractive le récepteur du canal NMDA, engendrant alors une augmentation de l'entrée d'ions calcium et une toxicité cellulaire.²⁰⁵ Dans des conditions pathologiques, ce canal reste ouvert durant un laps de temps trop important. Ainsi, bloquer son entrée permettrait d'améliorer la fonction synaptique et la mémoire, et de ralentir la dégénérescence cognitive.^{206,207} A l'heure d'aujourd'hui, une seule molécule antagoniste du NMDA est présente sur le marché : la mémantine.

2. Nouvelles approches

De nombreuses nouvelles approches ont été étudiées ces dernières années.

L'inhibition de la γ -sécrétase prévient la formation des monomères $A\beta$, mais augmente la quantité de fragments β -C-terminal d' $A\beta$ PP. Les modulateurs de γ -sécrétase ne provoquent pas cette augmentation. Par ailleurs, des travaux ont montré qu'un dosage subchronique des inhibiteurs de γ -sécrétase altère les fonctions cognitives normales. Ainsi, la modulation de la γ -sécrétase serait préférable à son inhibition.²⁰⁸ De même, l'inhibition de la β -sécrétase réduit la production d' $A\beta$. Les tests cliniques d'un inhibiteur de BACE1, montrant une réduction d' $A\beta$ dans le CSF chez les modèles animaux et chez des humains sains volontaires, ont néanmoins dû être arrêtés en raison de la toxicité du produit. Cette toxicité était, cependant, non liée à l'inhibition de BACE1.²⁰⁹ En outre, des travaux sur des anticorps ont montrés une réduction de l'activité de BACE1 et donc de la production d'APP dans les cultures de lignées cellulaires et dans les cultures primaires de neurones, ainsi qu'une diminution d' $A\beta$ périphérique chez les souris et les primates non-humains.²¹⁰ D'autres anticorps ont également été testés. Des anticorps anti-Tau retardent le début du déclin fonctionnel,²¹¹ tandis que des anticorps IgG1 anti- $A\beta$ ont provoqué des réponses immunitaires néfastes.^{212,213} Les groupes Genentech et Lilly pharmaceuticals testent actuellement le crenezumab, aussi connu sous le nom de MABT, en phase II/III.²¹⁴ Il s'agit d'un anticorps IgG4 anti- $A\beta$ humanisé provoquant une réponse immunitaire modérée par rapport aux IgG1²¹⁵ et réduisant la toxicité liée à $A\beta$.²¹⁴ Une thérapie anti- $A\beta$, CAD106, induit les anticorps sans la réponse des cellules T. La phase I est favorable à la sécurité et à la tolérance d'un tel traitement.²¹⁶ Aussi, l'aducanumab, un anticorps monoclonal humain, réduisant la progression du dépôt de plaques $A\beta$ et du déficit cognitif, a des résultats

encourageants en phase Ib : le score MMSE des patients n'a réduit que de 0,5 en un an, comparé à 3 pour le groupe contrôle.²¹⁷

Parmi les petites molécules, la thioflavin T limite le taux d'agrégation des peptides A β en s'y fixant, ce qui aide aussi à la régulation du taux de mauvaise conformation d'A β .²¹⁸ Les peptides DP-TAT-Mito (*Decoy Peptide modified with TAT cell penetration peptide and mitochondrial targeting peptide*) préviennent la formation du complexe ABAD-A β (A β peptide binding alcohol dehydrogenase – A β), le stress oxydatif, les dysfonctions mitochondriales et améliorent la mémoire et l'apprentissage spatial.²¹⁹

Les antioxydants MitoQ et SS31 agissent 100 fois plus sur la mitochondrie que les antioxydants classiques et l'agent anti-âge resveratrol réduit les dysfonctions mitochondriales. Ces trois agents réduisent les dommages de la mitochondrie causés par A β . Contrairement au resveratrol, MitoQ et SS31 augmentent les connexions synaptiques. Ces trois composés réduisent la formation de pores dans la mitochondrie.²²⁰ Cependant des précédents tests cliniques avec des antioxydants (vitamine E, vitamine C, acide α -lipoïque, coenzyme Q) n'ont pas prouvés le bénéfice d'un tel traitement pour les patients dans les premiers stades de la MA.²²¹

Le liraglutide, utilisé dans le traitement du diabète de type II (facteur de risque pour la MA), est un peptide analogue à GLP1 (*Glucagon-like peptide-1*), une hormone impliquée dans la régulation de l'insuline. Ce composé a montré, chez des souris, sa capacité à restaurer la faculté à reconnaître un objet, à améliorer l'apprentissage, à corriger le potentiel à long terme de l'hippocampe, à réduire la quantité de plaques amyloïdes dans le cortex, à réduire l'inflammation et à augmenter la formation de jeunes neurones dans le gyrus denté.²²² Aussi, un traitement intranasal à l'insuline a montré une diminution du retard de la mémoire ainsi qu'une amélioration des fonctions cognitives générales.²²³

Le JM6, un inhibiteur de KMO (Kynurenine 3-monooxygenase) prévient la perte synaptique et améliore la mémoire spatiale, mais n'a pas d'effet sur l'apprentissage spatial ni sur les tests cognitifs ou sur la quantité de plaques.²²⁴

La rapamycin, un inhibiteur de mTOR, retarde le vieillissement et augmente l'espérance de vie. Cette molécule réduit le métabolisme oxydatif et augmente l'autophagie. Elle réduit les grandes quantités d'A β pathologiques sans réduire l'A β endogène, prévient de la perte de mémoire spatiale et améliore l'apprentissage et la rétention.²²⁵

Les agonistes au récepteur cannabinoïde permettent d'augmenter le dégagement des A β intracellulaires et la diminution des cytokines pro-inflammatoires.²²⁶

Le levetiracetam, un anti-épileptique, améliore les fonctions cognitives chez les patients MCI amnésiques.²²⁷

D'autre part, la stimulation des circuits neuronaux responsables de la mémoire par DBS (*Deep Brain Stimulation*) au niveau du fornix/hypothalamus a été évalué en phase I et a montré au bout d'un mois une réduction possible du taux de déficit cognitif. Cependant, il s'agit d'une méthode très invasive, nécessitant l'implantation profonde d'électrodes dans le cerveau.²²⁸

Une autre approche envisagée est une intervention permettant d'enlever les dépôts A β . Cela implique un traitement par scan à ultrasons qui perturberait de manière transitoire les jonctions de la barrière hémato-encéphalique la rendant perméable par endroit. Les expériences sur les souris n'ont montré aucun œdème, neurodégénérescence ou dommage ischémique. Ces travaux ont montré que ce traitement réduit significativement les plaques A β , ainsi que les formes oligomériques et trimériques d'A β , les fonctions de mémoire spatiale ont été restaurées, et l'apprentissage spatial dépendant de l'hippocampe et la mémoire à court terme ont été améliorés. Le traitement par scan à ultrasons induit l'activation de la microglie et l'absorption d'A β par les lysosomes.²²⁹

Par ailleurs, de nombreux produits ont échoué quant au traitement de la MA. Les tests cliniques d'un vaccin anti-A β ont été rapidement arrêtés en raison de l'occurrence de méningo-encéphalites.²¹³ Une immunothérapie passive a fait l'objet de tests cliniques de phase III en 2014 avec le bapineuzumab, qui n'avait montré aucune amélioration des fonctions cognitives, mais des œdèmes vasogéniques.²³⁰ Le solanezumab, un autre anticorps monoclonal se liant préférentiellement à l'A β soluble, a aussi été évalué en phase III à trois reprises. Les résultats ne montrent pas d'effet significatif sur la cognition ou les fonctions journalières.²³¹ Cependant les patients traités au stade léger montrent une diminution des déficits cognitifs et fonctionnels plus tard dans l'étude.²³²

II. Les protéines kinases

A. Généralités sur les protéines kinases

Les protéines kinases sont des enzymes catalysant les phosphorylations. Il s'agit du transfert d'un groupement γ -phosphate d'un ATP sur son substrat. Celui-ci est généralement une autre protéine, ou elle-même, possédant un groupement hydroxyle libre. Ces groupements sont majoritairement présents sur les résidus sérine (Ser, S), thréonine (Thr, T) et tyrosine (Tyr, Y). Une analyse globale des sites de phosphorylation a montré la répartition suivante : 79.3% de sérines, 16.3% de thréonines et 3.8% de tyrosines.^{233,234}

Ce mécanisme de phosphorylation et déphosphorylation est l'un des plus courant dans la cellule et a été décrit pour la première fois dans les années 1950 par les Docteurs Krebs et Fischer.²³⁵ Il affecte chaque processus cellulaire basique et environ 30% des protéines cellulaires subiraient une telle modification sur au moins l'un de leurs résidus.²³⁴

Les protéines kinases classiques partagent un repliement commun, qui diffère cependant en termes de charge et d'hydrophobicité à la surface des résidus. Elles possèdent chacune un domaine catalytique canonique d'environ 250 acides aminés constitué de deux lobes : l'un sous forme de feuillets β en N-terminal et l'autre sous forme d'hélices α en C-terminal.

Le premier niveau de spécificité d'une kinase pour son substrat se base sur les caractéristiques structurales : les acides aminés encadrant le site de phosphorylation ont un rôle majeur dans la reconnaissance kinase-substrat. Le second niveau relève des interactions entre le motif d'ancrage du substrat et le domaine d'interaction de la kinase. Ce mécanisme a pour rôle d'accroître le taux de phosphorylation de substrats en augmentant leur concentration proche du site catalytique de la kinase, ainsi qu'en alignant correctement le site de phosphorylation des substrats avec le domaine catalytique de la kinase.²³⁴

La majorité des kinases désavantagent les substrats présentant une proline en position P+1 de leur site de phosphorylation. En effet, cet acide aminé est un très mauvais partenaire pour une liaison hydrogène, caractéristique recherchée par la

plupart des kinases. Cependant, environ un quart des sites de phosphorylation sont suivis par une proline. Les kinases dirigées vers des prolines réguleraient donc un plus grand nombre de substrats que les autres kinases. Contrairement à ces dernières, les kinases dirigées vers les prolines créent une poche apolaire qui ne satisfait pas aux exigences de liaison hydrogène de l'azote amide présent dans les autres résidus.²³⁴

Il existe diverses méthodes de classification des kinases. La principale, se basant sur l'homologie entre les kinases, a été établie en 1995 par les Docteurs Hanks et Hunter lors de la découverte de ces premières protéines.²³⁶ Sont ainsi distingués deux groupes majoritaires : les protéines kinases eucaryotiques (ePK), codées par 478 gènes, et les protéines kinases atypiques (aPK), codées par 40 gènes.^{236,237} La différence entre ces deux superfamilles réside au niveau de la séquence du domaine catalytique : les ePK présentent une séquence similaire, tandis que les aPK présentent chacune une séquence atypique. Les ePK sont elles-mêmes subdivisées en plusieurs groupes (figure 9) parmi lesquels est présent celui des CMGC, dont DYRK1A et CDK5 font partie.^{234,237}

La seconde classification repose sur la spécificité entre les kinases et leurs substrats. Les kinases sont ainsi séparées en trois groupes nommés d'après les résidus qu'elles phosphorylent au sein de leurs substrats :

- Les sérine/thréonine kinases (STPK) regroupent 80% des protéines kinases.²³⁴
- Les tyrosines kinases (TPK) se divisent encore en deux familles : les kinases cytoplasmiques et nucléaires, et les kinases transmembranaires, aussi appelées récepteur tyrosine kinase (RTK).
- Les tyrosine-sérine/thréonine kinases, correspondant à la minorité des protéines kinases, ont une double spécificité et sont souvent appelées « dual-specificity kinases » (DSK).^{234,238,239}

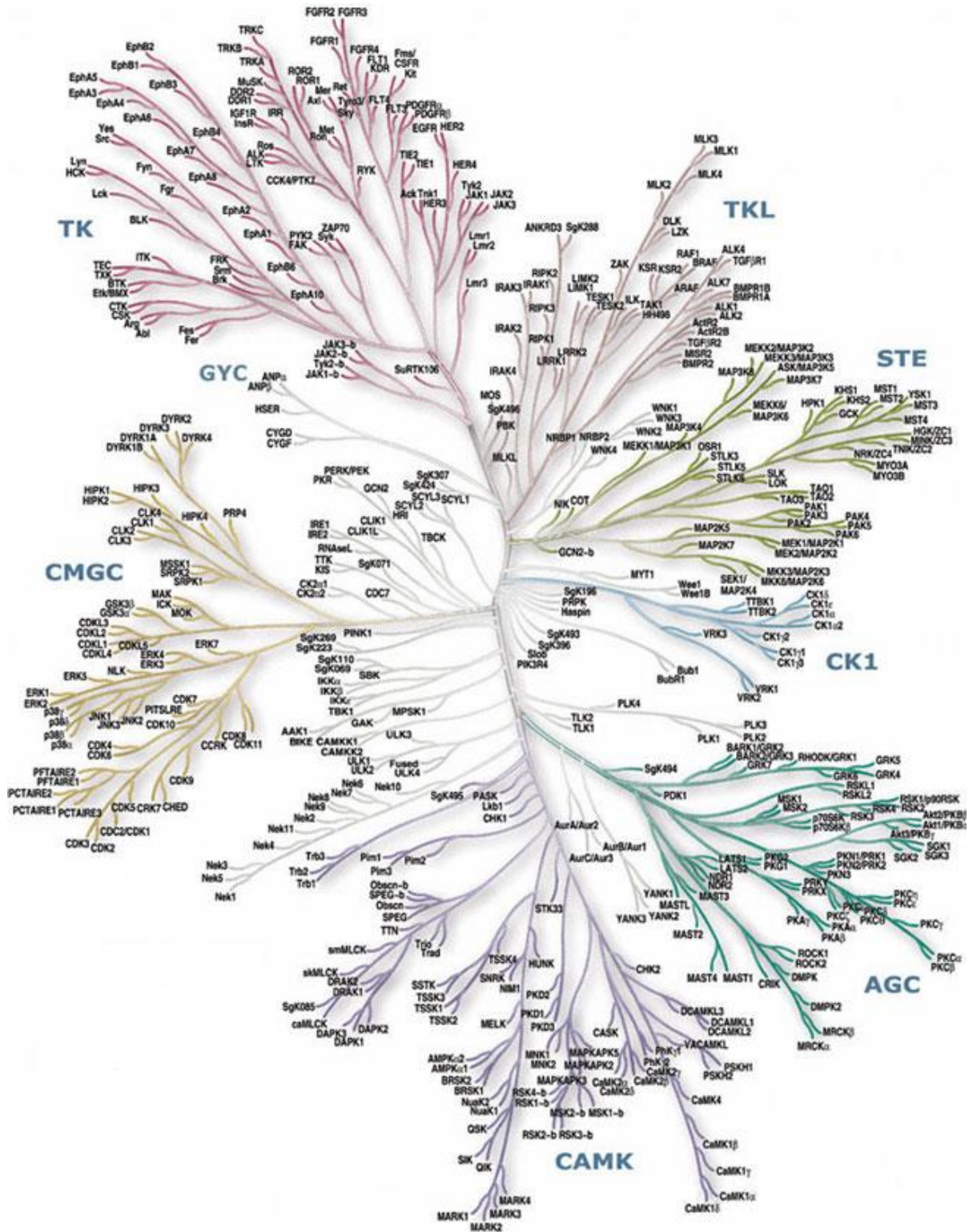


Figure 9 : Arbre phylogénétique des différentes protéines kinases humaines existantes (figure issue de ⁵³).

B. La protéine DYRK1A

Découverte en 1996,^{240,241} la protéine kinase DYRK1A présente un grand intérêt pour la recherche. Elle aurait un rôle clé dans la trisomie 21 (T21) et ses activités suggèrent un rôle important dans les maladies neurodégénératives telles que la MA, ainsi que dans de nombreuses autres pathologies telles que des cancers ou le syndrome de déficience intellectuelle lié à DYRK1A.

1. Famille de la kinase

DYRK1A est une sérine-thréonine protéine kinase dirigée vers les prolines et arginines, appartenant à la superfamille des CMGC.²⁴²

Ce groupe est nommé d'après les initiales de quatre familles de kinases qui le compose : « cyclin dependent kinases » (CDK), « mitogen-activated protein kinases » (MAPK), « glycogen synthase kinases » (GSK) et « CDK-like kinases » (CLK). Ce groupe contient aussi les « dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinases » (ou « dual-specificity yak-related kinases », DYRK), « casein kinase 2 » (CK2), RCK et « serine/arginine protein kinases » (SRPK).

La famille des DYRK présentent un fort taux de conservation à travers les espèces et se décompose en trois sous-familles : les DYRK, les « homeodomain-interacting protein kinases » (HIPK) et les « pre-mRNA processing protein 4 kinases » (PRP4K). Chez les mammifères, la sous-famille DYRK est composée de cinq membres : DYRK1A, DYRK1B (ou Mirk), DYRK2 ; DYRK3 (ou REDK) et DYRK4.^{243,244}

2. Structure génétique et protéique de DYRK1A

Pendant les années 1990, de nombreuses études ont porté sur la protéine « minibrain » (MNB) chez la drosophile. Ce n'est que quelques années plus tard que ses orthologues DYRK1 chez le rat puis DYRK1A chez l'humain ont été découverts.

En dehors du domaine catalytique, il y a peu d'homologie entre la séquence des DYRK et les autres familles de kinases. Cependant, cette séquence est hautement conservée à travers les espèces.²⁴³

Chez l'humain, le gène *DYRK1A* est situé sur le chromosome 21, et fait partie des 33 gènes identifiés de la région critique de la T21 (DSCR : Down syndrome critical region, 21q22.2). Il a été identifié comme gène candidat responsable de la T21, pour la déficience intellectuelle, la microcéphalie et la neurodégénérescence associée à l'âge.^{242,245} Le gène *DYRK1A* mesure 149,5 kb et comporte 17 exons. Suite à l'épissage alternatif, plusieurs isoformes de la protéine DYRK1A sont produits, la plus abondante étant constituée de 763 acides aminés et pesant 85,6 kDa.²⁴⁶

La protéine DYRK1A est constituée de 5 régions principales : le signal de localisation nucléaire bipartite est situé à l'extrémité N-terminale, suivi du domaine d'homologie des DYRK, et du domaine kinase, se trouve ensuite le domaine PEST riche en prolines, acides glutamiques, sérines et thréonines, une séquence de répétition d'histidine constitutive, et un domaine riche en sérines et thréonines (figure 10).²⁴²

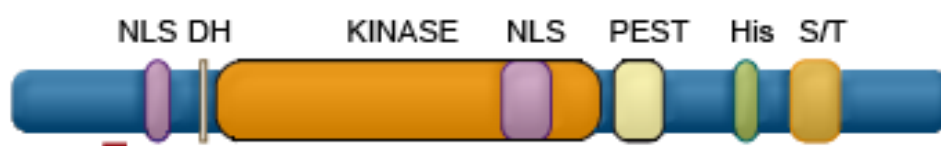


Figure 10 : Structure de la protéine DYRK1A. La région N-terminale est constituée des 158 premiers acides aminés. Elle contient la première séquence de localisation nucléaire (NLS1) et le domaine d'homologie (DH) commun à l'ensemble des DYRK. Le domaine catalytique, contenant le domaine kinase et la seconde séquence de localisation nucléaire (NLS2), correspond aux acides aminés 159 à 479 présentant un fort taux de conservation à travers les espèces. Cette région renferme des séquences consensus et des résidus communs aux ePK, participant à la fixation de l'ATP. La région C-terminale contient le domaine PEST, la séquence d'histidines et la séquence riche en sérine et thréonines. NLS : nuclear localization signal. DH : DYRK-homology box. PEST : Pest motif. His : polyhistidine stretch. S/T : serine and threonine-rich region. La ligne rouge montre l'épissage alternatif d'un fragment de 9 acides aminés (schéma issu de §4).

3. Activité et régulation normale et pathologique

DYRK1A est exprimée de manière ubiquitaire. Cependant, elle est plus fortement exprimée dans le cervelet, le bulbe olfactif et l'hippocampe. Son expression est sur-régulée pendant les premiers stades du développement, puis diminue graduellement jusqu'à des niveaux bas, pendant les derniers stades.^{247,248}

Dans le cerveau, au niveau de la cellule, DYRK1A est associée à 80% avec le cytosquelette et les 20% restant sont présents dans les fractions cytosolique et nucléaire.²⁴⁸ La localisation subcellulaire de DYRK1A est conditionnelle de son état de phosphorylation.²⁴⁹ De manière réciproque, la phosphorylation de DYRK1A modifiant sa localisation subcellulaire et sa stabilité, certaines kinases peuvent jouer un rôle sur son activité en lui permettant d'être en contact avec différents substrats.

DYRK1A s'active en s'autophosphorylant au niveau de sa tyrosine 321, puis agit sur plus d'une vingtaine de substrats.²⁴² Elle est impliquée dans la régulation des protéines du cytosquelette tels que la tubuline, l'actine et la protéine Tau. Elle contribue à la régulation dynamique de l'actine et à la synaptogénèse. Sa surexpression prolonge la cascade des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et induit la croissance des neurites. Cependant, cela cause aussi la réduction de la formation d'épine dendritique dans des neurones d'hippocampe en culture.²⁴⁵

Pendant le développement, DYRK1A serait responsable de la prolifération neuronale et de la neurogénèse entraînant alors la croissance du cerveau.²⁵⁰ Par ailleurs, les mutant DYRK1A^{-/-} ne survivent pas à la moitié de la gestation, prouvant ainsi que cette kinase est indispensable au développement. En outre, les mutants hétérozygotes DYRK1A^{+/-} voient une diminution de leur viabilité néonatale, de la taille de leur corps, du nombre et de la taille de leurs neurones dans certaines régions du cerveau, et de la taille de leur cerveau. Ces individus sont aussi caractérisés par une altération des fonctions motrices et une déficience des capacités d'apprentissage.^{251–}

255

La protéine DYRK1A joue donc un rôle important dans la neurogénèse et serait une protéine clé dans le développement de la T21. Cette pathologie, décrite pour la première fois en 1866 par le Dr. John Langdon Haydon Down,²⁵⁶ et dont la cause n'a été démontrée qu'en 1959, est la maladie chromosomique et la cause d'invalidité intellectuelle la plus commune, touchant environ une personne sur 1000.²⁵⁷ Il y aurait un lien entre le dosage génétique de DYRK1A et les malformations développementales de la T21.²⁵⁸ L'un des principaux signes neuropathologiques de la T21 est l'apparition précoce de symptômes de type MA, caractérisés par la formation de plaques amyloïdes séniles et de NFT.²⁴⁵ Une augmentation du taux de DYRK1A a aussi été rapportée dans différentes zones du cerveau de patients

Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives, tels que les maladies de Parkinson, de Huntington et de Pick.²⁴²

DYRK1A est aussi impliquée dans les deux principaux processus dégénératifs de la MA : la formation de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires (NFT). Cette kinase phosphoryle le facteur d'épissage alternatif (ASF) au niveau de trois sérines (227, 234 et 238), empêchant la régulation de l'épissage de Tau et conduisant donc à la formation de NFT.²⁵⁹ Elle phosphoryle également SRp55 (*serine/arginine-rich protein 55*) qui régule l'exon 10 de Tau, codant le deuxième domaine de répétition de liaison avec les microtubules.²⁶⁰ Par ailleurs, DYRK1A phosphoryle directement Tau à 11 sites constitués d'une sérine ou d'une thréonine : T181, S199, S202, T205, T212, T217, T231, S396, S400, S404 et S422.^{245,261–264} En outre, certaines de ces phosphorylations induisent la phosphorylation de Tau par GSK3 β . L'ensemble de ces phosphorylations résultent en la formation de NFT.²⁶⁵ De surcroît, le régulateur de calcineurine-1 (RCAN1) est un autre substrat de DYRK1A. Lorsqu'il est phosphorylé au niveau de sa Thr192, sa dégradation est ralentie et son interaction avec la calcineurine augmentée, inhibant alors l'activité phosphatase de cette dernière sur Tau et provoquant l'accumulation de Tau phosphorylée.^{247,266} En outre, la phosphorylation d'APP au niveau de sa Thr668 serait importante dans son clivage²⁶⁷ et celle de presenilin 1 (PS1) au niveau de sa Thr354 améliore son activité protéolytique.²⁶⁸ Ces deux phosphorylations, médiées par DYRK1A, augmentent la production de peptides A β neurotoxiques. Par ailleurs, DYRK1A serait aussi responsable de la diminution de l'activité de la neprilysine, principale enzyme de dégradation d'A β .²⁶⁹ Par conséquent, cette kinase agirait en tant que triple modulateur dans la MA en affectant la production et la dégradation d'APP, ainsi que la phosphorylation de Tau.

De plus, DYRK1A phosphoryle la cycline D1 au niveau de sa Thr286, perturbant alors son trafic et sa dégradation. La diminution du niveau de cycline D1 est corrélée avec l'allongement des phases G1 et S, modifiant alors la progression du cycle cellulaire et la neurogénèse.^{258,270}

4. Inhibiteurs de Dyrk1A

La protéine DYRK1A est une kinase très étudiée et de nombreux inhibiteurs ont été extraits d'organismes naturels ou synthétisés.

a. Inhibiteurs naturels

L'EGCG (*epigallocatechin gallate*) est un polyphénol de la famille des catéchines présent dans le *Camelia sinensis*, plus communément appelée thé vert (figure 11). Ce composé, faisant actuellement l'objet de plusieurs essais cliniques en phase 2, possède de nombreuses vertus, telles que des effets antibactériens, antiviraux, antifongiques et antitoxines.²⁴² Son activité inhibitrice est spécifique à DYRK1A et PRAK (*p38-regulated/activated protein kinase*).^{271,272} Aussi, l'EGCG améliorerait la plasticité synaptique, la structure du cerveau et les fonctions cognitives de souris surexprimant DYRK1A,²⁷³ et augmenterait, *in vivo*, l'expression et l'activité d'enzymes antioxydantes, diminuant alors l'agrégation des peptides A β .^{274,275}

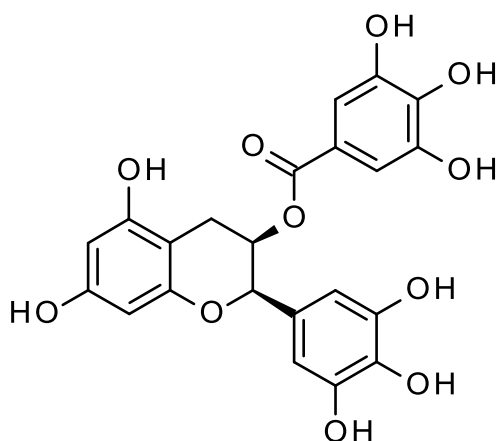


Figure 11 : Structure chimique de l'EGCG.

La leucettamine B est un alcaloïde isolé de l'éponge calcaire marine *Leucetta microraphis* pour la première fois en 1993 (figure 12).²⁷⁶ Ce composé inhibe DYRK1A, DYRK2, CLK1 et CLK3 à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Il est en revanche inactif pour GSK3 α/β , CK1 δ/ϵ , CDK5/p25 et Pim1.²⁷⁷ Suite à la découverte de l'activité de la leucettamine B sur les kinases impliquées dans la MA et la T21, de nombreux analogues, les leucettines, ont été synthétisés et évalués par le Dr. Meijer, le Pr. Bazureau, le Dr. Carreaux et leur équipe respective. Parmi celles-ci, la leucettine L41 (figure 13) est efficace sur DYRK1A avec une concentration de l'ordre du nanomolaire. Elle n'est, cependant, pas tout à fait sélective et montre une activité pour DYRK1B, DYRK2, CLK1 et GSK3 α/β , et à plus forte dose, pour CLK3 et Pim1.²⁷⁸ Cette molécule a la capacité de réduire la mort cellulaire induite par APP et

de protéger contre celle induite par le glutamate,²⁷⁸ ainsi que d'induire l'autophagie médiée par la voie mTOR/PI3K.²⁷⁹ Elle prévient aussi la neurotoxicité et les déficits de mémoire induits par les peptides oligomériques A β .²⁸⁰

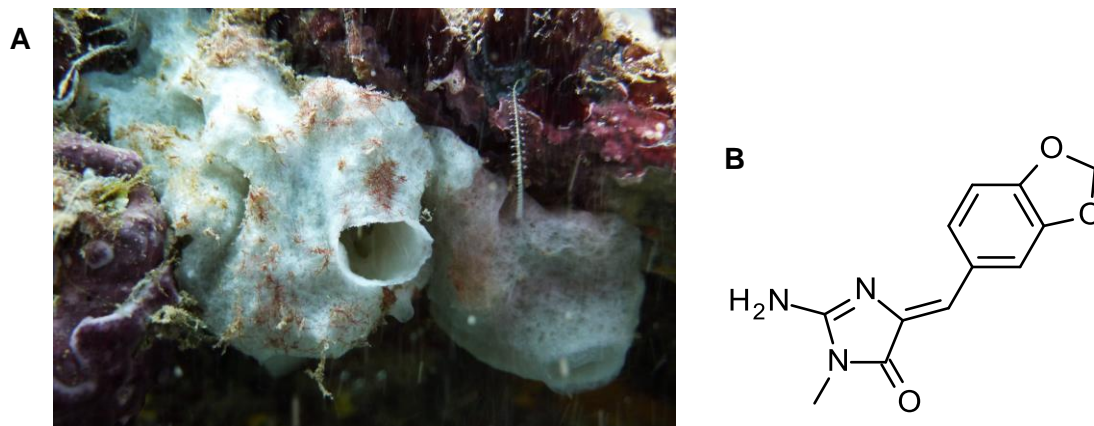


Figure 12 : Photographie de l'éponge marine *Leucetta microraphis* (Calcarea)²⁷⁸ (A) et structure chimique de la leucettamine B (B). (Crédit photo : Dr. Cécile Debitus, IRD)

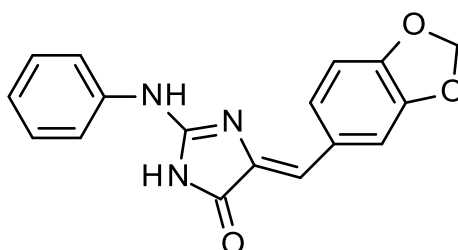


Figure 13 : Structure chimique de la leucettine L41.

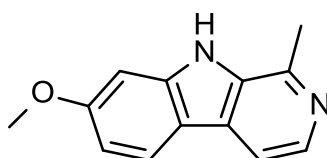


Figure 14 : Structure chimique de l'harmine.

L'harmine (figure 14) est un alcaloïde appartenant à la famille des β -Carbolines, présent dans une large variété d'organismes.²⁴² Elle inhibe DYRK1A de façon plus puissante que les autres membres de la famille DYRK.²⁸¹ Cependant, elle est connue pour sa toxicité^{282,283} et ses propriétés hallucinogènes.^{284–286}

La staurosporine, un indolecarbazole extrait de la bactérie *Streptomyces staurosporeus*, est efficace quant à l'inhibition de DYRK1A, mais extrêmement peu sélectif.²⁴²

Moins connus, les acanimols A et B, des catéchines isolées d'*Acacia nilotica*, une plante de la famille des légumineuses, montrent une inhibition modérée de DYRK1A. Les flavonoïdes sont des polyphénols produits par les plantes en tant que métabolites secondaires. Le dNBC, un dérivé du NBC ayant perdu sa spécificité pour CK2, favorise l'inhibition de DYRK1A. La chlorospermine B et l'atalaphyllidine ont un effet modéré sur l'inhibition de DYRK1A, tandis que l'acrifoline a un effet plus fort mais une sélectivité modérée.²⁸⁷ Les analogues de la D-luciferine ont un fort effet inhibiteur sur DYRK2, DYRK1A et DYRK3, et ceux de la granulatimine présentent également une bonne inhibition de DYRK1A. Certaines lamellarines ayant perdu leur effet inhibiteur de la topoisomerase I, sont des inhibiteurs forts et sélectifs de DYRK1A. Les meridianines sont 45 fois plus sélectives pour DYRK1A que pour les autres kinases, mais sont connues pour leur forte cytotoxicité.²⁴²

b. Inhibiteurs synthétiques

L'INDY (*inhibitor of DYRK1A*), un benzothiazole analogue de TG003, est trois fois plus puissant que ce dernier quant à l'inhibition de DYRK1A. Une prodrogue de INDY, proINDY, a été développée afin de faciliter la pénétration cellulaire. Un autre dérivé, BINDY, a démontré une inhibition importante et sélective envers la famille DYRK. Les DANDY sont issus du screening des analogues de l'harmine et ont une inhibition modérée de DYRK1A. Lors de recherches sur l'inhibition de CK2, des modifications apportées à TBB ont donné naissance à DMAT, inhibant alors DYRK1A et DYRK2 en plus de CK2. Certaines pyrazolidine-3,5-diones présentent une forte inhibition de DYRK1A et une sélectivité par rapport à DYRK2. Des 6-arylquinazolin-4-amines ont été développées pour leur solubilité en milieu aqueux. Mais malgré une bonne perméabilité membranaire passive et une haute stabilité, ces composés n'ont finalement qu'une solubilité modérée dans l'eau et n'ont montré qu'une inhibition modérée de DYRK1A. Les 6,6,5-tri-cyclic thiazolo[5,4-f]quinazolines présentent une inhibition de DYRK1A et DYRK1B de l'ordre du nanomolaire et une sélectivité contre CK1, CDK5 et GSK3. Par ailleurs, de

nombreuses molécules se basant sur la structure des pyrimidines et des thiophènes ont également été développées dans le cadre de l'inhibition de DYRK1A.²⁴²

C. La protéine Kinase CDK5

1. Caractéristiques de CDK5

Chez l'Homme, la famille des kinases dépendantes des cyclines (CDK) regroupe 13 protéines impliquées dans la régulation de l'ADN et la division cellulaire.²⁸⁸ Leur fonction est régulée par leur liaison aux cyclines qui les activent, stimulant alors la phosphorylation de leurs cibles au niveau des sérines ou thréonines précédant une proline. Cependant, malgré 60% d'homologie avec CDK2 et contrairement aux autres membres de cette famille, CDK5 n'est presque pas impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et n'est pas régulée par les cyclines, mais par les activateurs p35 et p39.²⁸⁹

CDK5 est hautement conservée à travers les espèces et son expression, détectée dans plusieurs organes, est prédominante dans le CNS de cerveaux en développement ou adultes.²⁸⁹ Cette kinase est essentielle au développement neuronal et est responsable de multiples actions dans la survie neuronale, la phosphorylation des protéines du cytosquelette, la plasticité synaptique et l'apoptose.²⁸⁹⁻²⁹²

Ses activateurs, p35 et p39, sont fortement exprimés dans le cerveau. Ils n'ont qu'une très faible homologie avec les cyclines mais leur structure repliée y est relativement similaire. Par ailleurs, p35 et p39 n'ont que 57% d'homologie entre eux et ont une expression spatio-temporelle différente dans les neurones. Néanmoins, la présence d'un des deux activateurs pourrait compenser l'absence du second.²⁸⁹ Lors de processus normaux, les complexes CDK5/p35 et CDK5/p39 régulent la fonction de leurs substrats, tels que Tau. Au moment de son activation, CDK5 phosphoryle son activateur induisant ainsi la dégradation du complexe par le protéasome. Ce mécanisme permet de réguler la durée d'activation de la kinase. Cependant, dans le cadre de processus pathologiques, tels que la MA, p35 et p39 peuvent être clivées par la calpain, générant ainsi les protéines p25 et p29. Ces dernières sont beaucoup

plus stables que les protéines parentes et activent alors CDK5 de manière prolongée.^{289,293,294}

La protéine p35, constituée de 307 acides aminés avec une masse de 35 kDa, est l'activateur qui a été le plus étudié.³⁴ La partie N-terminale, résultant en la forme clivée p10 de 98 acides aminés, comprend une région myristoylée de localisation membranaire²⁹⁵ et un signal de dégradation par la voie ubiquitine-protéasome.²⁹³ La partie C-terminale, résultant en la forme clivée p25 de 209 acides aminés, est riche en proline et contient les domaines de liaison et d'activation de CDK5.²⁹⁴

La calpain est une protéase dépendante du calcium.²⁸⁹ Aussi, ce minéral joue un rôle important dans l'hyperactivation de CDK5. Certains mécanismes cellulaires mènent à l'augmentation du calcium intracellulaire : les dommages ischémiques au cerveau, le stress oxydatif, les dysfonctions mitochondriales, l'excitotoxicité, l'exposition aux peptides A β , la dyshomeostase de calcium et l'inflammation.^{290,291,296–298} De manière réciproque, le déséquilibre de l'activité de CDK5 favorise le stress oxydatif et les dysfonctions mitochondriales,²⁹⁹ inhibant alors le transport axonal des neurofilaments suite à leur phosphorylation.³⁰⁰

L'hyperactivation de CDK5 peut mener à l'hyperphosphorylation de plusieurs substrats, dont la protéine Tau, conduisant à la formation de PHF et de NFT, ainsi qu'à la perturbation du cytosquelette et du transport intracellulaire, induisant alors une neurodégénérescence. Parmi de nombreux facteurs responsables de l'hyperphosphorylation aberrante de Tau, CDK5 est l'acteur majoritaire.³⁴ Certains sites de phosphorylation de Tau par CDK5 sont connus pour être importants dans la formation de PHF, tels que Thr181, Ser199, Ser202, Thr205, Thr212, Ser214, Thr217, Thr231, Ser235, Ser396, et Ser404.²⁸⁹

2. La roscovitine, un inhibiteur des CDK

Il existe de nombreux inhibiteurs de CDK. Cependant, malgré la capacité de certains à inhiber des formes de CDK plus que d'autres, aucun n'est réellement sélectif. Ce manque de spécificité s'explique par la conservation de la séquence peptidique des CDK dans leur domaine de liaison à l'ATP.³⁰¹

La roscovitine est un inhibiteur de CDK découvert dans les années 1990 (figure 15).³⁰² Cette purine inhibe l'activité kinase par compétition avec l'ATP, en interagissant avec le site de liaison de l'ATP au niveau du domaine catalytique des CDKs.³⁰³ La roscovitine inhibe fortement l'activité de CDK1, CDK2, CDK5, CDK7,

CDK9 et plus faiblement celle de CDK4, CDK6 et CDK8. À plus forte dose, elle peut également inhiber l'activité d'autres kinases telles que CK1, DYRK1A, ERK1/2 ou encore FAK.^{271,304}

La roscovitine pourrait être un inhibiteur efficace dans la limitation de la neurodégénérescence liée à la maladie d'Alzheimer, aux traumatismes crâniens et aux AVC. En effet, cette molécule s'est avérée efficace pour inhiber l'hyperphosphorylation de Tau dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer,³⁰⁵ pour diminuer de plus de 30% le volume de l'infarctus chez un modèle murin d'AVC,³⁰⁶ ainsi que pour réduire le volume des lésions cérébrales, diminuer la mort neuronale et récupérer plus efficacement les capacités motrices et cognitives dans un modèle de traumatisme crânien chez le rat.³⁰⁷

Notons que nous utilisons le terme roscovitine pour faire référence à la (R)-roscovitine, par opposition à son isomère, la (S)-roscovitine, moins active.



Figure 15 : Photographie de l'étoile de mer *Marthasterias glacialis* (A), et structure chimique de la roscovitine (B). (Crédit photo : Sébastien Thorin^{S5})

III. Le fipronil

Le fipronil est un insecticide et acaricide à large spectre, de la famille des phenylpyrazoles, largement utilisé à travers le monde d'un point de vue phytosanitaire et vétérinaire. Il appartient à la seconde génération d'insecticides agissant sur le récepteur GABA (acide γ -aminobutyrique) des canaux chlorure. Depuis le milieu des années 1990, le fipronil est considéré relativement sans danger pour les mammifères, au vue de sa haute affinité pour les récepteurs GABA des

insectes comparés à ceux des mammifères.³⁰⁸ Cependant, de récentes études remettent en cause cette sécurité pour ces derniers.

A. Découverte

Le fipronil a été découvert et développé dans les années 1985 à 1987 par Rhône-Poulenc, une société chimique et pharmaceutique française fondée en 1928. Aujourd'hui, cette entreprise a été rachetée par Sanofi pour les opérations pharmaceutiques, et partagée entre le groupe Solvay et Bayer Crop Science pour les divisions chimiques.³⁰⁹

Le fipronil est un pesticide neurotoxique de seconde génération développé dans deux buts. D'une part, afin de créer un nouveau groupe d'insecticides, plus sûr et respectueux de l'environnement que les anciens pesticides. Et d'autre part, pour pallier aux résistances des insectes développées contre les organophosphates, les carbamates et pyrethroïdes, constituant les différentes classes de pesticides présentes sur le marché dans les années 1980.³¹⁰

Le fipronil a été mis sur le marché en 1993 pour les applications agricoles, puis en 1995 pour l'usage vétérinaire, à savoir le contrôle des puces et des tiques sur les animaux de compagnie ainsi que sur le bétail.³⁰⁹

B. Utilisation

1. Applications

Le fipronil est utilisé pour la protection des cultures et des plantes ornementales contre les insectes et les acariens herbivores, pour le contrôle des organismes nuisibles urbains, tels que les cafards, les fourmis, les termites, les guêpes et les mouches, pour les applications vétérinaires afin de protéger les animaux de compagnie et le bétail contre les puces et les tiques, entre autres, et pour la pisciculture.³¹¹

En Europe, le fipronil a été interdit, à partir de 2014, pour l'usage agricole en raison de ses effets sur les insectes pollinisateurs. Cette interdiction momentanée avait pour but de laisser le temps à l'EFSA de finaliser la réévaluation complète des

risques liés aux pesticides concernés. L'interdiction définitive ou son abolition sera décidée en automne 2017. Cependant, étant donné que l'approbation pour la commercialisation du fipronil par BASF expire cette année, et compte tenu des coûts engendrés par la réhomologation de ce produit, l'entreprise abandonnera certainement la distribution du fipronil.^{§6}

Ce produit étant également commercialisé pour le contrôle des insectes nuisibles dans les maisons et sur les animaux de compagnie, il est très utilisé par les particuliers. La concentration de fipronil total (fipronil + desulfinyl + sulfure) dans les poussières à l'intérieur des habitations serait, en moyenne, 15 fois supérieure par rapport à l'extérieur. Les composés du fipronil sont omniprésents dans la poussière domestique, même dans les résidences sans utilisation connue du pesticide.³¹² En 2015, Cochran *et al.* ont conduit la première étude examinant l'exposition aux résidus de surface secondaire générés par les activités des animaux domestiques dans la maison. Ils ont considéré les expositions cutanées et orales (en raison du contact main-bouche), et ont conclu qu'il n'y avait aucun risque important pour les adultes et les enfants.³¹³

2. Intoxication chez l'Homme

Certains cas d'intoxication par le fipronil ont été signalés en Asie et en Europe. L'empoisonnement par le fipronil se caractérise par des maux de tête, des vertiges, des faiblesses, des vomissements, de l'agitation et des convulsions.³¹⁴⁻³¹⁶ Il a récemment été rapporté que certaines personnes, soumises à une intoxication professionnelle par le fipronil, présentaient des symptômes généralement associés au blocage de la fonction du récepteur GABAergique (nausées, maux de tête et convulsions), et ont également présenté un certain déficit de mémoire.³¹⁷ Il a également été suggéré que le fipronil et le fipronil sulfone ont un effet inhibiteur central sur la sécrétion d'hormone stimulant la thyroïde (TSH) chez l'homme. Les cellules réceptrices de TSH possèdent des récepteurs GABA_A et le système GABA est connu pour sa sensibilité aux hormones thyroïdiennes.³¹⁸

Par ailleurs, les données obtenues à partir des observations faites sur l'auto-empoisonnement aiguë, chez les humains, indiquent que le fipronil se transforme en fipronil sulfone et que ce composé parent disparaît rapidement du sang au cours des 15 à 20 premières heures après l'ingestion.³¹⁴

C. Propriétés chimiques et biochimiques

Le fipronil est une molécule peu soluble dans l'eau, stable pendant une heure à température ambiante mais instable en présence d'ions de métaux, et dégradé par la lumière. Ce pesticide est un perturbateur très puissant du CNS des insectes : il provoque une activité incontrôlée du CNS, provoquant alors la mort, en interférant avec le passage des ions chlorure à travers le canal GABA. Le fipronil est néanmoins plus spécifique au récepteur GABA des insectes que de celui des humains.^{309,319} Néanmoins, cette sensibilité et cette sélectivité peuvent varier en fonction de la composition de la sous-unité du récepteur GABA_A humain. Les dérivés du fipronil présentent une affinité plus élevée pour les récepteurs que le fipronil lui-même.³²⁰

Grâce à ses propriétés physico-chimiques, le fipronil est capable d'entrer dans les tissus végétaux et de se répandre dans toutes les parties de la plante.³²¹ Cela augmente la surface d'exposition au fipronil pour les insectes, mais il pourrait également être dangereux pour les animaux herbivores.

Par ailleurs, le fipronil et ses métabolites sont des résidus solubles dans la graisse, dans laquelle ils ont tendance à se stocker.³²²

D. Métabolisme

La dégradation du fipronil par la lumière du soleil produit plusieurs métabolites. Le principal est le fipronil desulfinyl (figure 16), extrêmement stable et plus toxique que le fipronil.³⁰⁹

Des études, chez le rat, ont montré que le métabolisme du fipronil est identique chez les mâles et les femelles.³²³ Il est facilement métabolisé en fipronil sulfone (figure 16) chez plusieurs espèces de mammifères telles que les rats, les humains, le bétail et les chiens.^{314,323} Cette principale voie métabolique du fipronil est médiée par des enzymes hépatiques du cytochrome P450 (CYP).^{324,325} Des données chez les rats et les moutons suggèrent que le fipronil sulfone persiste beaucoup plus longtemps dans l'organisme que le fipronil lui-même. Par exemple, chez les rats, les temps demi-vies ont été estimées à 208 et 8,5 h pour le fipronil sulfone et le fipronil, respectivement.³¹⁴

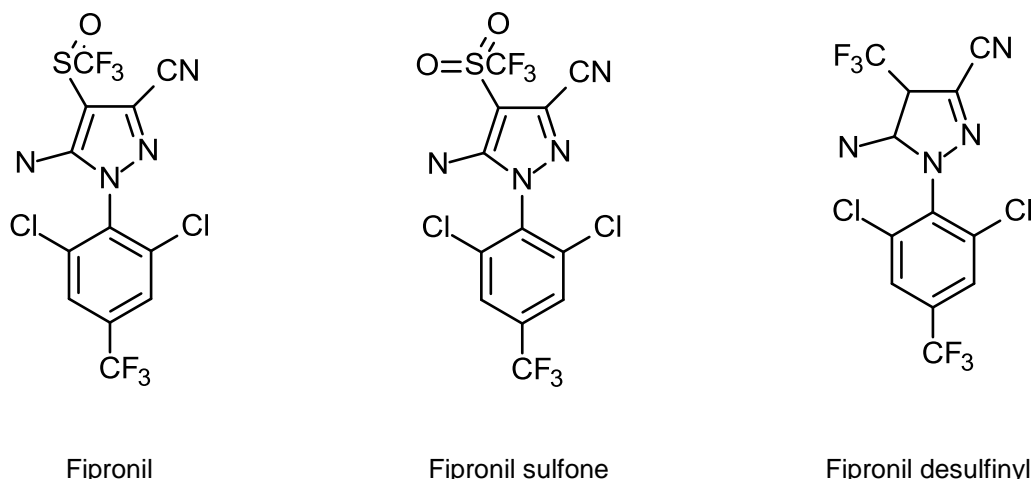


Figure 16 : Structure du fipronil, de son métabolite majoritaire, le fipronil sulfone, et de son photoproduit principal, le fipronil desulfinyl.

La concentration des pesticides et de leurs métabolites dans les cheveux et/ou les poils est représentative du niveau d'exposition. Ces concentrations sont plus fortes ou comparables à celles dans l'urine et le plasma. Cependant, cette technique développée chez le rat, visant à déterminer l'apport en pesticide, n'est pas transposable à l'homme, en particulier en raison des différences interespèces.³²⁶

Le fipronil sulfone est le métabolite majoritaire dans tous les tissus, les excréments et le sang. Vasylieva *et al.* ont développé une méthode simple et rapide pour la synthèse d'hydroxy-fipronil, un autre métabolite d'urine de fipronil. Ce composé synthétique a été utilisé en tant que standard afin de développer une méthode analytique de LC-MS/MS, permettant la quantification de ce métabolite. Ce produit a également été utilisé dans la mise au point d'un dosage immunologique afin de déterminer la présence et le niveau d'hydroxy-fipronil dans l'urine des animaux traités.³²⁷

E. Effets sur les mammifères

1. Evaluations toxicologiques

Une dose quotidienne acceptable (ADI) pour le fipronil et ses métabolites a été établie à 0-0,0002 mg/kg, basée sur une dose sans effet nocif observable (NOAEL pour « No Observable Adverse Effect Level ») de 0,025 mg/kg par jour, avec un

facteur de sécurité de 100 pour le fipronil-desulfinyl, le dérivé le plus toxique du fipronil examiné dans cette étude.³²⁸

Certains signes neurotoxiques ont été observés chez des rats à partir de 5 mg/kg de fipronil, tels qu'une diminution de la mobilité des pattes arrière chez les mâles, une hyperactivité, une irritabilité et une diminution du toilettage chez les femelles. Une diminution du gain de poids corporel et de la consommation d'aliments ont été observés chez les animaux des deux sexes. La dose maximale tolérée pour une étude à long terme a été évaluée entre 2,4 et 6,5 mg/kg par jour.³²⁸

Plusieurs tests ont également été effectués avec le fipronil desulfinyl sur des rats et des souris. Après leur réévaluation, l'assemblée conjointe du FAO et de l'OMS a conclu que la NOAEL du fipronil desulfinyl serait comprise entre 0,025 et 0,18 mg/kg par jour selon différentes expériences. Par ailleurs, aucune tumeur thyroïdienne, ni homéostasie thyroïdienne n'ont été retrouvées, contrairement aux études avec le fipronil. Il en est de même pour la génotoxicité. Des expériences sur le fipronil sulfide amide et l'acide carboxylique de fipronil ont montré une DL50 supérieure à 2000 mg/kg après une administration orale. D'autres tests sur le fipronil destrifluorométhyl sulfonate ont rapporté une augmentation de la concentration de triglycérides chez les femelles et l'activité de la phosphatase alcaline chez les mâles et les femelles pour une concentration de 460 mg/kg par jour pendant 28 jours. De plus, l'assemblée conjointe du FAO et de l'OMS de 2000 a conclu à une dose de référence aiguë (RfD) de 0,003 mg/kg pour le fipronil et le fipronil-desulfinyl seuls ou en combinaison.³²⁸ Toujours selon cette assemblée, quatre composés sont toxicologiquement significatifs : le fipronil, le fipronil desulfinyl, le fipronil sulfone et le fipronil thiether. Le fipronil, lentement absorbé après une ingestion, est largement distribué dans les tissus et possède un temps de demi-vie relativement long (183-195h). Il s'accumule fortement dans la graisse, et a une bioaccumulation potentielle, suggérée par les ratios plasmatiques. Pour une exposition à court terme, la NOAEL par voie orale est de 0,08 mg/kg par jour. Cette dose est évaluée à 0,025 mg/kg par jour pour une exposition à long terme.³²⁸

2. Mort cellulaire

Le fipronil sulfone est plus toxique que le fipronil : 54 fois plus puissant en termes de toxicité cellulaire et 37 fois plus puissant en termes de fuite de LDH. Cette

cytotoxicité (100 μM pour le fipronil et 3 μM pour le fipronil sulfone) pourrait passer par le stress oxydatif, une cause majeure de dommages cellulaires neurotoxiques. Cette oxydation pourrait être médiée par la libération de radicaux libres et la peroxydation lipidique.³²⁹

Le fipronil induit également des voies apoptotiques de toxicité cellulaire dans lesquelles Akt et GSK3 β sont impliquées. En effet, le fipronil semble inactiver GSK3 β et Akt en diminuant les phosphorylations au niveau de la Ser9 et de la Ser473 respectivement.³³⁰

3. Thyroïde

Plusieurs études ont démontré la capacité du fipronil à agir comme un perturbateur de la thyroïde chez les rats et les humains.^{323,325}

La principale voie métabolique du fipronil, menant au fipronil sulfone, est médiée par des enzymes hépatiques du cytochrome P450 (CYP). Le fipronil, tout comme d'autres xénobiotiques, peut conduire à une augmentation de l'expression et de l'activité de CYP.^{324,325}

La perturbation de la thyroïde est associée à une forte concentration plasmatique de fipronil sulfone, et à une très faible concentration de fipronil plasmatique. Le fipronil sulfone semble donc être responsable de la perturbation de la thyroïde induite par le fipronil plutôt que du fipronil lui-même.³²⁵ Cette perturbation induite par le fipronil est beaucoup plus limitée chez les moutons. Chez cette espèce, le traitement au fipronil entraîne une concentration plasmatique de fipronil sulfone beaucoup moins élevée, associée à une concentration plasmatique de fipronil beaucoup plus élevée que chez le rat.^{325,331}

Le fipronil semble aussi augmenter le métabolisme hépatique et l'excrétion de l'hormone thyroïdienne : il induit une hypertrophie cellulaire, augmente le poids de la thyroïde et la TSH (hormone stimulant la thyroïde), diminue l'hormone T4 (thyroxine) dans le sérum, mais ne crée pas d'hyperplasie thyroïdienne. De plus, chez les rats, le fipronil augmente la consommation d'iodure et l'activité peroxydase de la thyroïde. Après un traitement de 50 semaines et une récupération de 11 semaines, une diminution de l'hormone T4 et une augmentation de l'hormone TSH ont été observées.³³²

4. Système nerveux central

Le fipronil induit la neurotoxicité par le biais du stress oxydatif et affecte le récepteur GABA_A de ces cellules.³²⁹ Par ailleurs, même à une concentration non cytotoxique (25 µM), le fipronil induit une réduction significative des longueurs de croissance des neurites des cellules humaines de neuroblastome SH-SY5Y. Le fipronil induit une apoptose médiatrice de la caspase-6 à forte concentration (78 µM correspondant à 50% de viabilité à 48h), qui est un marqueur apoptotique spécifique pour la dégénérescence neuronale. Le fipronil induit l'autophagie à une concentration moyenne (43 µM), ce qui pourrait être un mécanisme de protection contre la toxicité du fipronil. En effet, il a été rapporté que la rapamycine, un inducteur autophagique, protège les cellules SH-SY5Y de l'apoptose induite par le fipronil. De plus, le fipronil augmente le niveau d'expression de la vimentine et modifie l'expression de ses isoformes. Cela traduit très probablement des changements dans les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la glycosylation. La vimentine est un filament intermédiaire de type III impliqué dans la structure cellulaire au stade précoce des neurones immatures et joue un rôle crucial dans la croissance des projections de neurites. La vimentine peut être ré-exprimée en réponse à un endommagement dendritique et à une neuro-dégénérescence. En outre, le fipronil modifie la localisation de la vimentine : habituellement détectée dans le soma, elle devient plus localisée dans les excroissances neuronales. Le traitement au fipronil provoque une perte de la fibrillisation de vimentine.³³³

Il a aussi été démontré, dans les cellules souches neurales embryonnaires de rat, qu'un traitement de 6 jours avec 30 µM de fipronil réduit le nombre de cellules dans le CNS, en particulier une baisse du rapport glie/neurones.³³⁴

Le fipronil et ses métabolites sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique. Cravedi *et al.* n'ont pas détecté de fipronil dans les tissus (tissu adipeux, surrénales, foie, rein, testicule et cerveau) et ont suggéré une biotransformation importante de ce composé. Le fipronil est lentement métabolisé et excrété chez le rat, et ce composé ne se trouve que dans les excréments. Son principal métabolite, le fipronil sulfone, est un composé lipophile et persistant reconnu comme un agent neurotoxique et un perturbateur endocrinien.³³⁵

Des expériences chez le rat ont montré que le fipronil provoque, entre autres, des réponses exagérées de douleur chez les mâles et des réactions d'effarouchement exagérées chez les mâles et les femelles.³⁰⁹ Des rats traités de manière aigüe avec une dose élevée de fipronil (100 mg/kg) ont montré certains effets neurotoxiques, tels que l'augmentation de l'excitabilité. Cependant, ces effets sur le CNS des mammifères restent généralement légers et temporaires.³³⁶ Le fipronil induit également les réponses inflammatoires dans le cerveau.³³⁷ Par ailleurs, des études ont prouvé que le fipronil peut avoir des interactions toxiques avec le CNS des mammifères et entraîner une altération de la mémoire en modulant le système GABAergique. En effet, les rats exposés au fipronil (30 mg/kg, par jour, par gavage pendant 15 jours) ont présenté des troubles de la mémoire à court terme comme à long terme, et une réduction du gain de poids.³¹⁷

5. Autres fonctions métaboliques

Badgujar *et al.* ont rapporté une absence de changement de poids corporel par le traitement au fipronil (5 et 10 mg/kg, par jour, par gavage, pendant 28 jours), mais une diminution du poids absolu et relatif du rein et du cerveau. Ils ont également observé une augmentation significative de l'azote uréique sérique et de la créatinine sérique, qui sont des signes de lésions rénales. De plus, ils signalent une augmentation de la peroxydation lipidique (LPO) dans les reins et le cerveau. En outre, ils ont observé une diminution du glutathion (GSH), du thiol, de la superoxyde dismutase (SOD) et de l'activité catalase dans les deux organes, tous restaurés par un prétraitement à la vitamine E et à la vitamine C. Par conséquent, l'exposition au fipronil semble induire des dommages oxydatifs aux reins et au cerveau.³³⁸

L'exposition orale répétée de fipronil (à 30 mg/kg, par jour, par gavage, pendant 15 jours) suggère une responsabilité dans l'hypertension, via l'augmentation du niveau d'endothéline-1, et de l'élévation de la pression artérielle systolique, via réduction de la capacité antioxydante. Cependant, aucun changement dans les fonctions hépatique, biliaire ou rénale n'a été montré.³³⁹

Le fipronil induit des enzymes hépatiques CYP de phase I chez le rat. Il n'y aurait aucun effet indésirable causé par une dose orale de 1 mg/kg de fipronil pendant 6 jours. Cependant le fipronil pourrait perturber l'oxydation de la testostérone par l'augmentation des enzymes CYP3A1/2.³⁴⁰ En outre, le fipronil est

responsable d'effets négatifs sur le système reproductif masculin, tels que la réduction de la motilité, la morphologie anormale et la diminution de la viabilité du sperme. Ces effets sont causés par le stress oxydatif, les dommages de l'ADN et l'apoptose. En effet, chez les mammifères, le sperme est particulièrement sensible au stress oxydatif en raison de sa très haute concentration en acides gras poly-insaturés, de leur incapacité à réparer leur membrane et de leur forte habilité à générer des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).³⁴¹ Le fipronil, ainsi que le fipronil sulfone et le fipronil desulfinyl, modifient le système bioénergétique des mitochondries issues du foie.³⁴²

Le fipronil serait aussi impliqué dans la détérioration de l'adipogénèse, en augmentant la différenciation des adipocytes et l'accumulation de la graisse dans ces derniers.³⁴³

A priori, le fipronil n'induirait aucune mutation génétique ou une aberration chromosomique.³³²

F. Environnement

Dans le contexte agricole, le fipronil s'accumule dans le sol (90% du produit sont retrouvés dans les premiers 30 cm), dans lequel il subit une lente dégradation biotique. A la surface, la photolyse s'ajoute aux moyens de dégradation. Le temps de demi-vie du fipronil lors de sa photodégradation est de 34 jours dans le sol et de 3,63 heures dans l'eau. La dégradation microbienne prend plus de temps : la demi-vie du fipronil est alors comprise entre 116 et 130 jours. Lorsque que le composé se retrouve dans l'eau, il peut aussi être hydrolysé, ainsi sa demi-vie est de 28 jours. Au total, le temps de demi-vie pour les surfaces traitées au fipronil est estimé entre 3 à 7 mois.³⁰⁹

Au niveau de l'utilisation domestique, il a été démontré que le fipronil est rapidement dégradé. Après 1 semaine de traitement, il y a plus de fipronil desulfinyl que de fipronil dans les eaux de ruissellement.³⁴⁴ De plus, l'eau de pluie est le mécanisme principal de dispersion des pesticides. Elle a pour effet de diminuer le niveau de pesticides à l'endroit du traitement, mais implique leur accumulation sur les surfaces urbaines. Ce mécanisme contribue également fortement à la contamination des eaux de surfaces.³⁴⁵ Aux Etats-Unis, des études ont montré la

présence de fipronil dans les eaux déjà épurées, à des concentrations plus hautes que celles conseillées par les organismes réglementaires. Cette quantité en fipronil viendrait, en partie de l'eau utilisée pour le lavage d'animaux de compagnie traités par des soins anti-tiques et anti-puces. Ces traitements en « spot-on » sont aussi directement transférés dans l'eau lors des baignades de ces animaux.³⁴⁶

Le fipronil est donc largement répandu dans l'écosystème et contamine les sols agricoles, les sources d'eau, les zones humides, la végétation non ciblée, ainsi que les systèmes marins côtiers et estuariens. Par conséquent, en dehors des humains, des animaux domestiques, du bétail et des poissons d'élevages, le fipronil affecte également les animaux sauvages, tels que les mammifères, les oiseaux, les poissons, les invertébrés aquatiques et terrestres, les amphibiens et les reptiles.^{347,348} Le fipronil est connu pour ses effets sur les poissons.³⁴⁹ Il est notamment responsable de l'augmentation de la vitesse de nage chez les larves de poisson-zèbre. Ce comportement anxieux peut s'expliquer par l'augmentation de neurotransmetteurs excitateurs et la diminution de neurotransmetteurs inhibiteurs. De plus, la production d'acide gras serait augmentée afin de compenser l'énergie demandée par de tels déplacements.³⁵⁰ Le fipronil affecterait également les invertébrés marins, tels que les crabes, en altérant leur croissance et en inhibant leur reproduction.³⁵¹

Le fipronil impacte aussi fortement les insectes non ciblés par le pesticide, notamment les pollinisateurs. De nombreuses études sur les abeilles ont démontré des affections négatives sur divers mécanismes tels que la navigation individuelle, l'apprentissage, la collection de nourriture, la longévité, la fécondité et la résistance aux maladies.³⁵²

La pollution due aux pesticides est encore plus importante dans les pays en voie de développement, subissant une urbanisation et des activités agricoles intensives.³⁵³

Résultats & discussion

I. Implication des pesticides dans la production de peptides amyloïdes

En 2007, dans le cadre de leurs recherches visant à isoler des composés inhibant la production d'A β via l'inhibition de CK1,^{354,355} les Dr. Meijer et Flajolet, avec l'aide de leur équipe respective, ont identifié un composé de faible poids moléculaire modifiant la production d'A β dans des cellules N2aAPP₆₉₅ (cellules de neuroblastome de souris exprimant de façon stable l'APP₆₉₅ humaine). Cette purine induit une production massive d'A β 42, influençant ainsi le rapport A β 40/A β 42. Par la suite, des travaux menés à ManRos Therapeutics sous la direction du Dr. Meijer ont conduit à la caractérisation de la famille des aftins (Amyloid β Forty-Two Inducers).³⁵⁶ Cette famille de composés, notamment l'aftin-5, apporte de nouveaux outils pharmacologiques pour décrypter les mécanismes menant à l'altération du rapport des différentes formes d'amyloïdes, une des caractéristiques de la MA. De plus, la mise en évidence de familles de molécules ayant de telles propriétés pharmacologiques^{356,357} suggère l'existence possible de composés alzheimerigènes dans le « Human Chemical Exposome » (HCE), c'est-à-dire de composés présents dans l'ensemble des produits auxquels nous sommes exposés et induisant la production de longues formes de peptides A β . Il se pose alors la question d'identifier ces molécules et de les réglementer.

A travers cette thèse, nous nous sommes intéressés à la détection de produits alzheimerigènes parmi les nombreux polluants organiques et chimiques auxquels nous sommes exposés, tel que les pesticides. De nombreux produits naturels et synthétiques ont été testés ; seuls quelques-uns seront présentés.

A. Les herbicides triazines

Lors du screening de nombreux produits synthétiques et naturels réalisé par Emilie Durieu, la famille des herbicides triazines est ressortie par rapport à sa capacité à induire la production de peptides A β 42. Des études plus poussées ont donc été réalisées sur cette famille, principalement sur deux membres, le dipropetryn et le terbutryn. Un article publié en septembre 2016 présente ces résultats, dont les

recherches ont débuté avant mon arrivée à ManRos Therapeutics. Ma contribution a été de : (1) analyser des modifications protéomiques induites par l'exposition de cellules N2aAPP₆₉₅ à l'aftin-5, au dipropetryn ou au terbutryn. Cette analyse n'a pas permis de dégager un effet net de ces composés sur l'expression différentielle de protéines liées soit à la production d'amyloïdes soit aux conséquences de cette production. (2) mener des expériences de purification des cibles des triazines par chromatographie d'affinité sur billes de triazines immobilisées. Ces expériences préliminaires n'ont pas permis de purifier des cibles potentielles de façon sélective.

1. Article : « Specific triazine herbicides induce amyloid- β 42 production. »

Specific Triazine Herbicides Induce Amyloid- β_{42} Production

Erik Portelius^a, Emilie Durieu^b, Marion Bodin^b, Morgane Cam^b, Josef Pannee^a, Charlotte Leuxe^c, Aloïse Mabondzo^c, Nassima Oumata^b, Hervé Galons^{b,d}, Jung Yeol Lee^e, Young-Tae Chang^e, Kathrin Stüber^f, Philipp Koch^f, Gaëlle Fontaine^g, Marie-Claude Potier^g, Antigoni Manousopoulou^h, Spiros D. Garbis^h, Adrian Covaciⁱ, Debby Van Dam^{j,k}, Peter De Deyn^{j,k}, Frank Karg^l, Marc Flajolet^m, Chiori Omoriⁿ, Saori Hataⁿ, Toshiharu Suzukiⁿ, Kaj Blennow^a, Henrik Zetterberg^{a,o} and Laurent Meijer^{b,*}

^aClinical Neurochemical Laboratory, Institute of Neuroscience & Physiology, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden

^bManRos Therapeutics, Centre de Perharidy, Roscoff, France

^cService de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, IBITECS, CEA, Université Paris-Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

^dLaboratoire de Pharmacochimie, INSERM U1022, Université Paris-Descartes, Paris, France

^eDepartment of Chemistry, National University of Singapore, Laboratory of Bioimaging Probe Development, Biopolis, Singapore

^fInstitute of Reconstructive Neurobiology, University of Bonn, Bonn, Germany

^gSorbonne Universités, UPMC Université Paris 06 UMR S1127, Inserm U1127, CNRS UMR7225, ICM, Paris, France

^hCenter for Proteomic Research, Institute for Life Sciences, Cancer and Clinical Experimental Science Units, School of Medicine, University of Southampton, Southampton, UK

ⁱToxicological Center, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium

^jLaboratory of Neurochemistry & Behaviour, Department of Biomedical Sciences, Institute Born-Bunge, Wilrijk, Belgium

^kUniversity of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Neurology & Alzheimer Research Center, Groningen, The Netherlands

^lHPC INTERNATIONAL SAS, Noyal-Châtillon sur Seiche, Saint-Erblon, France

^mLaboratory of Molecular & Cellular Neuroscience, The Rockefeller University, New York, NY, USA

ⁿLaboratory of Neuroscience, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan

^oUCL Institute of Neurology, London, UK

Accepted 15 July 2016

Abstract. Proteolytic cleavage of the amyloid- β protein precursor (A β PP) by secretases leads to extracellular release of amyloid- β (A β) peptides. Increased production of A β_{42} over A β_{40} and aggregation into oligomers and plaques constitute an Alzheimer's disease (AD) hallmark. Identifying products of the 'human chemical exposome' (HCE) able to induce A β_{42} production may be a key to understanding some of the initiating causes of AD and to generate non-genetic, chemically-induced AD animal models. A cell model was used to screen HCE libraries for A β_{42} inducers. Out of 3500+ compounds, six triazine herbicides were found that induced a β - and γ -secretases-dependent, 2–10 fold increase in the production of extracellular A β_{42} in various cell lines, primary neuronal cells, and neurons differentiated from human-induced pluripotent stem cells

*Correspondence to: Laurent Meijer, ManRos Therapeutics, 29680 Roscoff, France. Tel.: +33 6 08 60 58 34; E-mail: meijer@manros-therapeutics.com.

(iPSCs). Immunoprecipitation/mass spectrometry analyses show enhanced production of A β peptides cleaved at positions 42/43, and reduced production of peptides cleaved at positions 38 and lower, a characteristic of AD. Neurons derived from iPSCs obtained from a familial AD (FAD) patient (A β PP K724N) produced more A β ₄₂ versus A β ₄₀ than neurons derived from healthy controls iPSCs (A β PP WT). Triazines enhanced A β ₄₂ production in both control and AD iPSCs-derived neurons. Triazines also shifted the cleavage pattern of alcadein α , another γ -secretase substrate, suggesting a direct effect of triazines on γ -secretase activity. In conclusion, several widely used triazines enhance the production of toxic, aggregation prone A β ₄₂/A β ₄₃ amyloids, suggesting the possible existence of environmental “Alzheimerogens” which may contribute to the initiation and propagation of the amyloidogenic process in late-onset AD.

Keywords: Alzheimer’s disease, alzheimerogen, amyloid- β , amyloid- β protein precursor, A β ₄₂/A β ₄₀ ratio, herbicides, human chemical exposome, triazines

INTRODUCTION

Proteolytic processing of amyloid- β protein precursor (A β PP) by β - and γ -secretases leads to the production of various A β peptides, including the 42-amino acid form (A β ₄₂) which plays a crucial role in AD [1–3]. The action of β -secretase first leads to a soluble fragment (sA β PP) and a membrane-bound fragment (β CTF, β -carboxyl-terminal fragment). γ -Secretase then cleaves the β CTF, leading to the generation of A β peptides of various lengths. A β peptides tend to aggregate as extracellular oligomers and ultimately as plaques, one of the clinical hallmarks of AD.

A β ₄₀ is the most abundantly produced A β peptide. Considerable data indicates that generation of the aggregation-prone A β ₄₂ strongly correlates with the onset and development of AD. In early-onset AD (EOAD) (<1% of all cases), mutations in A β PP, or the γ -secretase subunits PSEN1 & PSEN2 (reviewed in [4]), all lead to enhanced A β ₄₂ production and/or increased A β ₄₂/A β ₄₀ ratio, a critical factor in AD pathology initiation [5]. Increased A β ₄₂/A β ₄₀ ratio is also found in brain tissue in late-onset AD (LOAD) (>99% of AD cases). A β ₄₂ is more toxic than A β ₄₀, a consequence of its higher stability and strong tendency to oligomerize and to aggregate in plaques [6–8]. A β ₄₃ is also enriched in the brain of AD patients and has been reported as a toxic, aggregation-prone amyloid, inducing strong AD phenotypes in mice [9–12].

We recently reported that some tri-substituted purines, the aftins (Amyloid β Forty-Two Inducers), trigger a robust, secretases-dependent increase in extracellular A β ₄₂ production in cultured cells [13, 14]. Under these conditions A β ₃₈ levels dropped while A β ₄₀ remained relatively stable. These results suggest that (1) such molecules might constitute new pharmacological tools to investigate the mechanisms underlying the increased A β ₄₂/A β ₄₀ ratio observed

in AD, (2) these molecules might contribute to generate a chemically induced animal model of AD [15] and (3) some simple, low molecular weight (LMW) products in our environment might shift the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio similarly to what is seen in AD patients and might thus contribute to the development, acceleration or even initiation of LOAD.

We therefore screened for potential A β ₄₂-inducing molecules in libraries of HCE products [16–21]. We here report that a subset of the widely used triazine herbicides is able to shift A β production towards longer, aggregation-prone amyloid peptides (A β ₄₂/A β ₄₃) at the expense of shorter variants (A β ₃₇, A β ₃₈, A β ₄₀). In addition, production of the shorter A β _{1–16} and A β _{1–17} peptides, the generation of which is dependent on β - and γ -secretase activities [22, 23], was also enhanced. This effect is observed in various cell lines, primary neuron cultures and neurons differentiated from iPSCs obtained from healthy controls or AD patients. Triazines shift the cleavage pattern of alcadein α , another γ -secretase substrate [24–28], in a way similar to the A β PP cleavage shift, suggesting a direct effect on γ -secretase rather than on its substrates. Altogether these data support our hypothesis that the HCE contains products able to modulate γ -secretase activity towards the production of high MW, aggregation-prone, AD-associated amyloids. Such products could be qualified as potential “Alzheimerogens” (name by analogy with “carcinogens”). Their identification and regulation of human exposure might constitute a key step in AD prevention.

MATERIAL AND METHODS

Material and methods are described in full in the Supplementary Material. They include: 1) Triazines and other reagents; 2) Cell cultures: cell lines, primary neuron cultures, human iPSCs-derived neurons, and HEK293-alcadein α cells; 3) Transient transfection

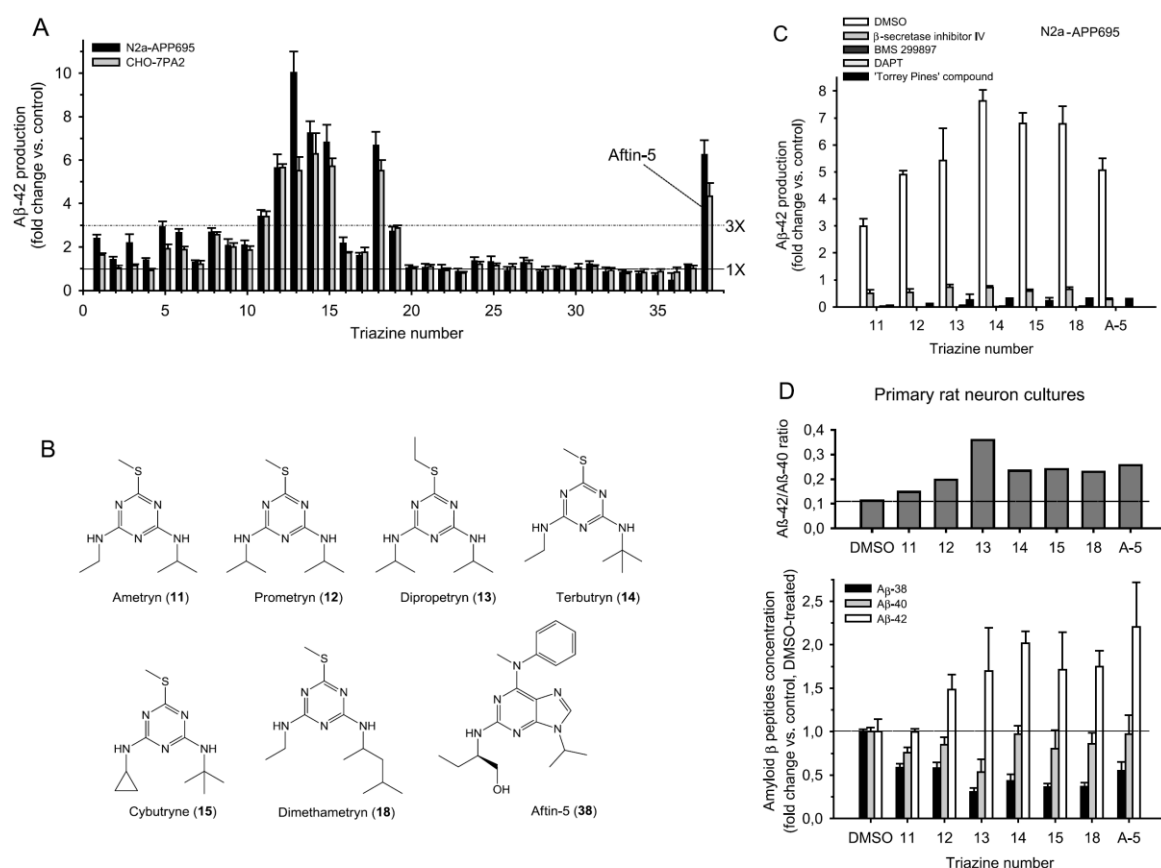


Fig. 1. Some triazines trigger β - and γ -secretase dependent production of extracellular A β ₄₂. A) Effect of 37 triazines on extracellular A β ₄₂ production by N2a-APP695 and CHO-7PA2-APPsw cells. Cells were treated with 100 μ M of each compound for 18 h and cell supernatants were collected for A β ₄₂ levels measurement by ELISA. Aftin-5 was used as a positive control and the corresponding volume of DMSO as a negative control. Levels are expressed as fold change, average \pm SEM of triplicate values, of A β ₄₂ levels over those of control, vehicle-treated cells (representative of four independent experiments). Horizontal dotted lines indicate levels for 1 and 3 fold changes in A β ₄₂ concentration. B) Structure of the six active triazines and of aftin-5. C) Extracellular A β ₄₂ production induced by triazines is inhibited by β -secretase inhibitor IV, γ -secretase inhibitors DAPT & BMS 299897 and γ -secretase modulator 'Torrey Pines' compound. N2a-APP695 cells were exposed to 10 μ M of each inhibitor. 1.5 h later, cells were treated with 100 μ M of each active triazine or 50 μ M aftin-5. Extracellular A β ₄₂ levels were measured after 18 h. Average \pm SEM of triplicate values (representative of two independent experiments). D) Triazines trigger A β ₄₂ production in primary rat neuron cultures. Cells were exposed to DMSO, 100 μ M of each triazine or aftin-5 for 18 h. Cell supernatants were collected and the levels of A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂ (bottom panel) were determined by ELISA assays (average \pm SEM of triplicate values). The A β ₄₂/A β ₄₀ ratios are shown in the top panel. The horizontal dotted line refers to the basal ratio in control cells.

tions with A β PP truncation mutants; 4) Amyloids assays: ELISA capture assays, absolute quantification of amyloids by tandem mass spectrometry (MS/MS), amyloids profile analysis by immunoprecipitation/mass spectrometry (IP-MS); 5) Cell viability assay.

RESULTS

Screening the HCE reveals triazines as A β ₄₂ inducers

A library of 3500+ LMW (<1000 daltons) products representative of the HCE was assembled. All

compounds were tested for their ability to trigger extracellular A β ₄₂ production by N2a cells stably expressing A β PP695 (N2a-APP695), at 1, 10 and 100 μ M (data not shown. A dose-dependent effect was often seen with the active compounds). In parallel, cell viability assays were run to assess cell survival at these concentrations. The vast majority of products were unable to induce A β ₄₂ production. Among the few active products, we identified several triazines, a class of products which are widely used as herbicides, anti-fouling agents or flame retardants (reviewed in [29]). We next tested a library of 37 triazines representing the most produced triazines worldwide (1–37, Supplementary Table 1), along

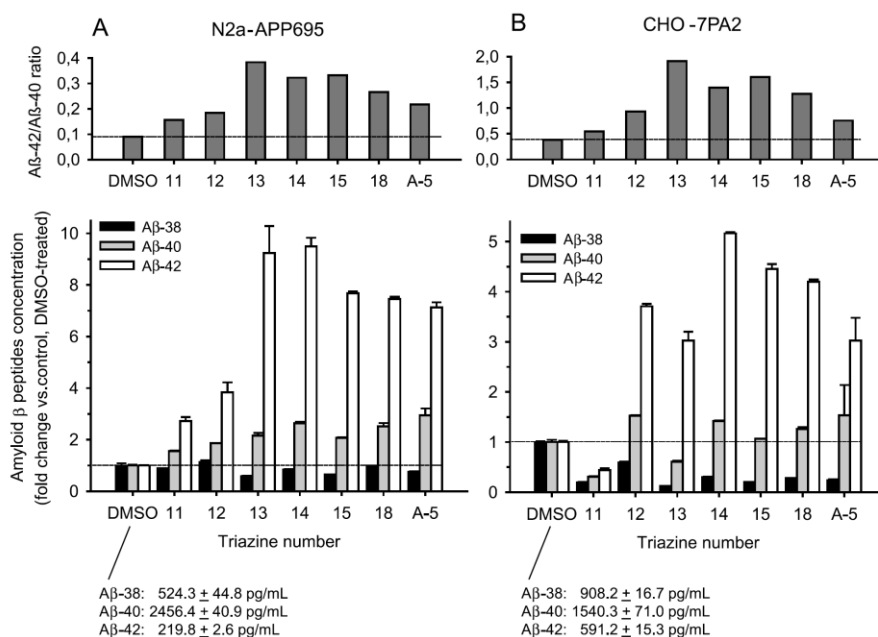


Fig. 2. Absolute quantification of A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂ using LC-MS/MS. Levels of the three amyloid peptides were determined by mass spectrometry in supernatants of N2a-APP695 (A) and CHO-7PA2-APPsw (B) cells following 18 h treatment with DMSO, 100 μ M of each triazine or aftin-5. Amyloid levels are expressed as percentage of levels in vehicle-treated cells (bottom panels; average \pm SEM of triplicate values; absolute values in control cell supernatants are indicated under the bottom panels). A β ₄₂/A β ₄₀ ratios are shown in the top panels (horizontal dotted lines refer to the basal ratios in control cells).

with aftin-5 (**38**) as a positive control, on both N2a-APP695 and CHO-7PA2 cells stably expressing A β PP751 (CHO-7PA2-APP751), for their ability to trigger A β ₄₂ production at 1, 10, and 100 μ M (Supplementary Table 2) (Fig. 1A).

Six triazines were found to induce more than a 3-fold change in A β ₄₂ levels (Fig. 1A, B): ametryn, prometryn, dipropetryn, terbutryn, cybutryne, and dimethametryn. As observed with aftins [13, 14], A β ₄₂ production was strongly inhibited by β - (inhibitor IV) and γ -secretases (BMS 299897, DAPT) inhibitors and by a γ -secretase modulator ('Torrey Pines' compound) (the latter induces a dose-dependent increase in A β ₃₈ and a decrease in A β ₄₂ and A β ₄₀) [30, 31] (Fig. 1C). Similarly, A β ₃₈ production was strongly reduced, while A β ₄₀ levels were only modestly affected as measured by ELISA (data not shown) and by mass spectrometry (Fig. 2). Most of the triazines are metabolized in the environment and by organisms. We thus tested some of the cybutryne/terbutryn metabolites (**39–44**) (Supplementary Figure 1) for their ability to trigger A β ₄₂ production in N2a-APP695 and CHO-7PA2 cells. None of the tested metabolites was active as an inducer of A β ₄₂ production (data not

shown). We next tested a library of 236 triazines that had been synthesized as affinity chromatography reagents, for their ability to induce A β ₄₂ production [32, 33]. Twenty-one of these (**45–65**) showed significant enhancement of A β ₄₂ production (Supplementary Table 3), showing that A β ₄₂ induction is an intrinsic property of some triazines. Affinity chromatography attempts with immobilized triazines did not allow us to purify specific targets, probably because of unselective hydrophobic interactions and low-level expression of the specific targets (data not shown).

Results were confirmed with HEK293 stably expressing A β PPsw (data not shown) and neurons derived from human iPSCs (see below). We also analyzed the effects of triazines on primary neuronal cultures prepared from E18 OFA rat embryo brains. Neurons were exposed to 100 μ M of each triazine for 18 h, and the supernatants were collected for A β determination by ELISA assays. The triazines also induce an increase in A β ₄₂ production by primary neurons and in the A β ₄₂/A β ₄₀ ratios (Fig. 1D). A β ₄₀ production remained relatively stable, while that of A β ₃₈ was reduced by all triazines (Fig. 1D).

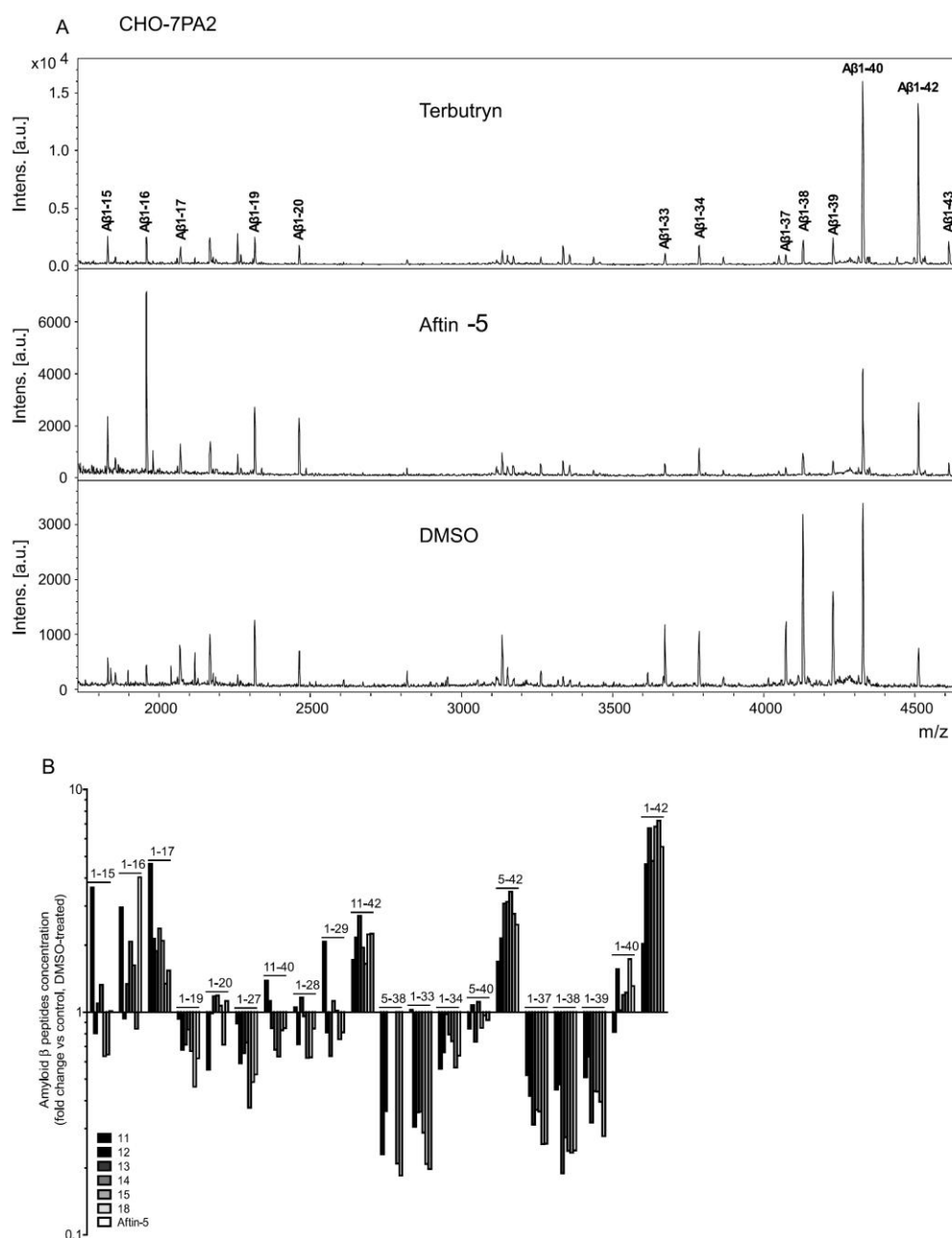


Fig. 3. Pattern of amyloid peptides produced by CHO-7PA2-APPsw cells exposed to triazines. Cells were treated for 18 h with DMSO, 100 μ M of each triazine or aftin-5. Cell supernatants were collected and analyzed as described. A) Example spectra of supernatants amyloid profiles from CHO-7PA2-APPsw cells exposed to DMSO, aftin-5 or terbutryn. B) Quantification of all amyloid peptides in CHO-7PA2-APPsw cell supernatants (Log of fold change in triazine or aftin-5 treated cells over control, DMSO-treated cells).

Mass spectrometric quantification and profile analysis of induced amyloids

A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂ were quantified in the supernatants of N2a-APP695 (Fig. 2A) and CHO-7PA2-APP751 (Fig. 2B) using LC-MS/MS [34, 35]. Like Aftins [13, 14], triazines induced a reduction

in A β ₃₈ levels, a slight increase or modest decrease in A β ₄₀ levels and a strong increase in A β ₄₂ levels (Fig. 2, bottom). A β ₄₂/A β ₄₀ ratios were strongly increased (Fig. 2, top).

We next analyzed, by IP-MS, the range of A β peptides produced by both cell lines exposed to each of the six triazines and aftin-5. Cell supernatants were

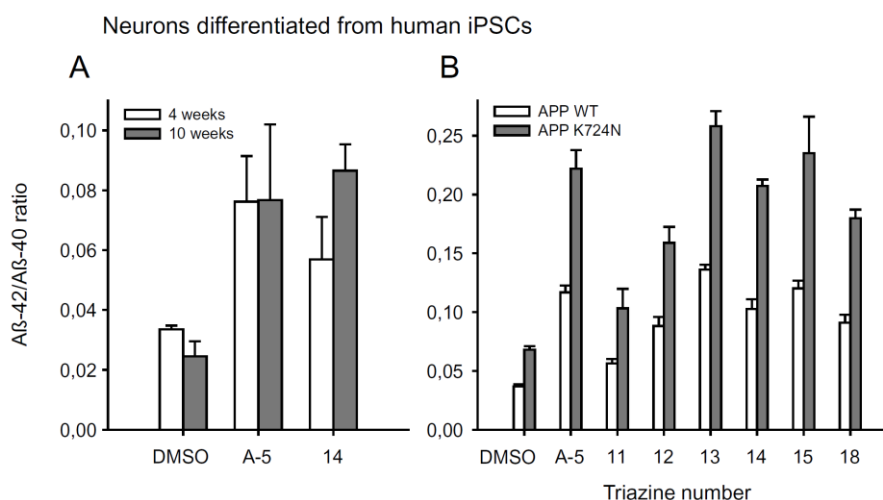


Fig. 4. Triazines trigger enhanced production of A β ₄₂ versus A β ₄₀ in neurons differentiated from human iPSCs. A) iPSCs-derived neurons were differentiated for 4 or 10 weeks and then exposed to DMSO or 100 μ M afin-5 or terbutryn (**14**) for 24 h. B) Neurons were derived from iPSCs obtained from a healthy donor (A β PP WT) or from an AD patient (A β PP K724N mutation). They were exposed for 24 h to DMSO, 100 μ M afin-5 or the six triazines. In both experiments cell supernatants were collected for extracellular A β levels measurement. Levels are expressed as A β ₄₂/A β ₄₀ ratios \pm SEM of triplicate values.

collected and A β peptides were immunoprecipitated and analyzed using MALDI TOF/TOF [36]. Examples of spectra for cells exposed to terbutryn, afin-5 and DMSO are provided in Fig. 3 and Supplementary Figure 2. Exposure to triazines increased the production of A β ₁₋₁₇, A β ₁₁₋₄₂, A β ₅₋₄₂, and A β ₁₋₄₂, while the production of A β ₁₋₁₉, A β ₁₋₂₇, A β ₁₋₃₃, A β ₁₋₃₈, and A β ₁₋₃₉ was reduced (Fig. 3). Other amyloid peptides (including A β ₁₋₄₀) showed only modest changes. A β ₁₋₄₃, a highly neurotoxic amyloid [9–12], was undetectable in supernatants of control cells, but strongly induced in afin-5 and triazine-treated cells.

Neurons differentiated from human iPSCs of AD patient and healthy control

We next tested the effects of afin-5 and the active triazines on neurons differentiated from human iPSCs derived from a healthy individual (A β PP WT, wild-type) or from a patient with familial AD (A β PP K724N mutation) [37, 38] (Fig. 4). Neurons from the healthy control were first differentiated for either 4 or 10 weeks before 24 h exposure to 100 μ M afin-5 or terbutryn (Fig. 4A). Treatment resulted in a 2–3-fold increase in A β ₄₂ levels compared to neurons exposed to DMSO. A β ₄₀ levels remained essentially unchanged. All six triazines were next tested on neurons derived from the control and the AD patient differentiated for 4 weeks [38, 39] (Fig. 4B). A β PP

K724N neurons produced more A β ₄₂ versus A β ₄₀ compared to A β PP WT neurons. Addition of afin-5 or any of the six active triazines resulted in further increase in A β ₄₂ production, in both A β PP WT and A β PP K724N neurons.

A β PP sequence requirements for A β ₄₂ induction by triazines

To investigate the molecular mechanisms and possible ϵ cleavage sites requirement for the induced A β ₄₂ production, we generated six A β PP truncations (T1–T6) and expressed them transiently in N2a cells (Fig. 5A). Cells expressing these truncations were then exposed to 100 μ M afin-5 and A β ₄₂ production was measured (Fig. 5B). Full-length (FL) A β PP and the first three truncations displayed enhanced A β ₄₂ production (Fig. 5B). In contrast, the three remaining truncations did not allow enhanced A β ₄₂ production when cells were exposed to afin-5. Cells expressing FL A β PP and truncations T1, T3, T4 were next exposed to 100 μ M of each triazine (Fig. 5C). Although T3 allowed stimulation of A β ₄₂ production, T4 did not. These results reveal a strong A β PP structural requirement for enhanced A β ₄₂ production induced by afin-5 and triazines, which seems to correspond to the ϵ cleavage sites of A β PP by γ -secretase. At least 10 residues downstream of the A β ₄₂ cleavage site are required for the full effect of afin-5 and triazines.

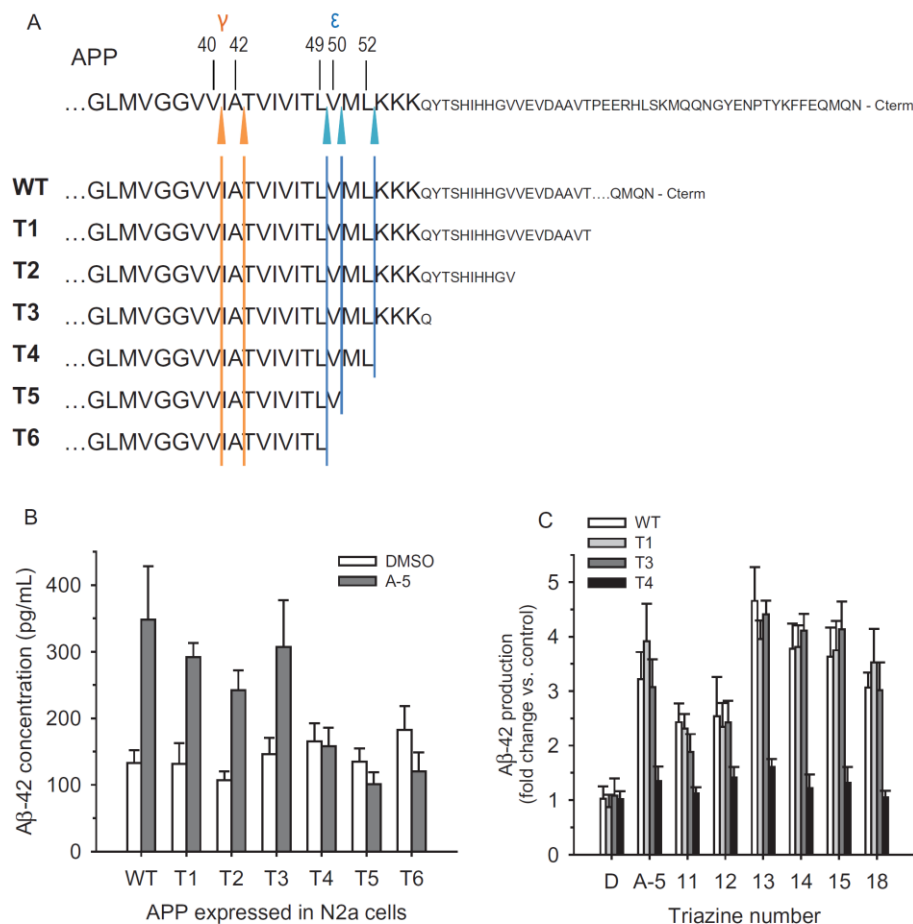


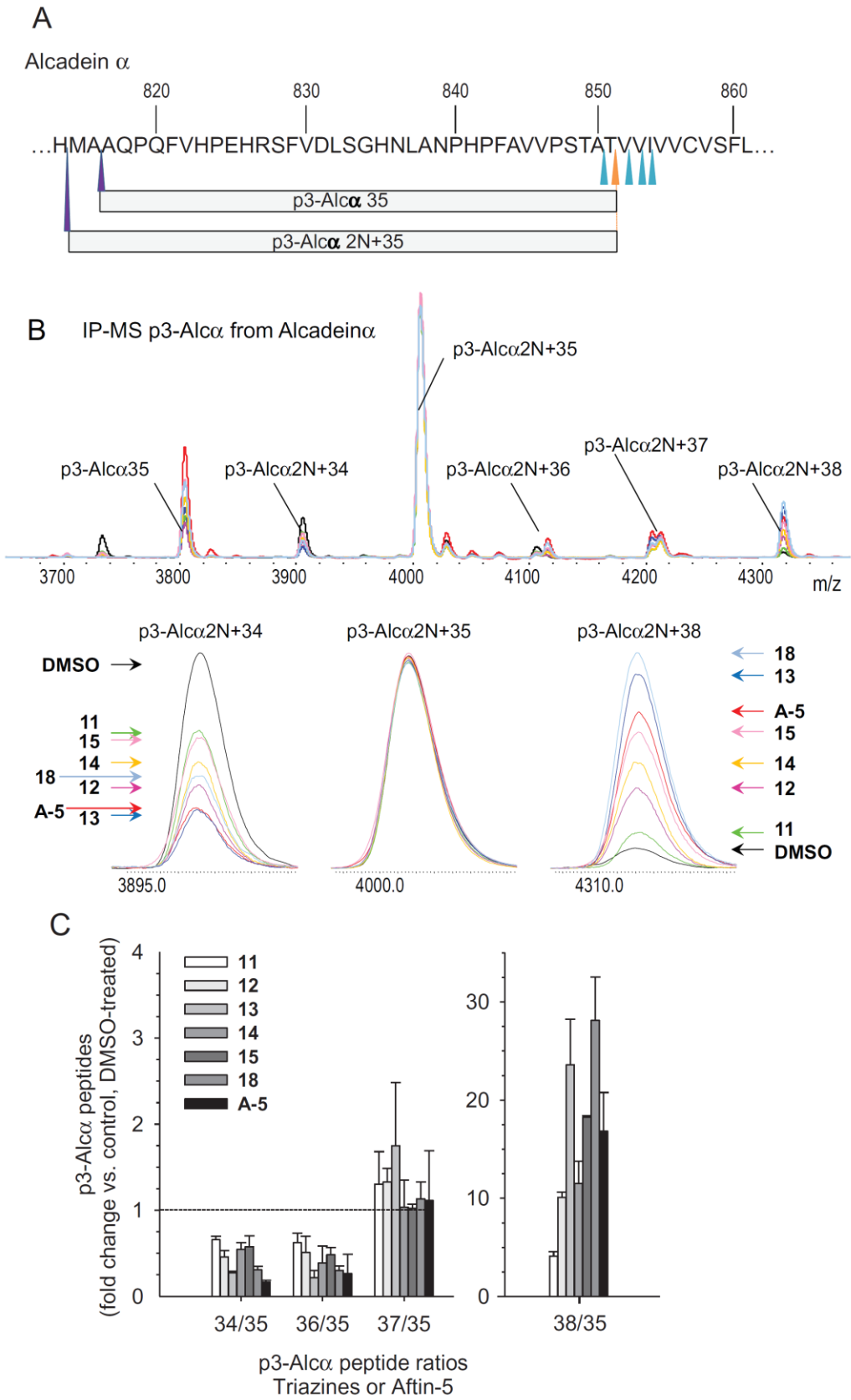
Fig. 5. Effect of A β PP C-terminal truncations on triazines' efficacy. A) Only the C-terminal aa sequences of A β PP full length (WT) and C-terminal truncations mutants (T1–T6) are shown. The γ and ϵ cleavage sites are indicated in orange (left arrows) and blue (right arrows) respectively. Numbers indicate the position of the residues involved in those cleavages and refer to the α cleavage site. B) Mutants T1 to T6 were expressed transiently in N2a cells which were exposed to DMSO or afatin-5 (100 μ M) for 24 h and the levels of released A β ₄₂ was measured by ELISA (average \pm SEM of triplicate values). C) Mutants T1, T3, and T4 expressing N2a cells were exposed for 24 h to DMSO (D), afatin-5 or the six triazines (100 μ M). A β ₄₂ level were measured and are expressed as fold-increase versus untreated cells (average \pm SEM of triplicate values).

Triazines and Afatin-5 shift the cleavage pattern of the γ -secretase substrates alcadeins

Like A β PP, alcadeins/calsyntenins are sequentially cleaved by secretases, first by α -secretase, leading to N- and C-terminal fragments, the latter being then cleaved by γ -secretase to an intracellular domain and the p3-Alc α peptide, in a way similar to A β PP [25, 27] (Fig. 6A, Supplementary Figure 3). We used HEK293 cells stably expressing full-length alcadein α to investigate the effects of triazines on alcadein cleavage. Alcadein α is first cleaved on the N-terminal side (two possible sites) followed by cleavage by γ -secretase leading to p3-Alc α 35 and p3-Alc α 2N+35, the latter representing the major peptide in cultured cells (Fig. 6A). Cleavage at nearby sites

(blue arrows) leads to other less abundant peptides. HEK293-alcadein α cells were grown till 60% confluence and treated with 100 μ M afatin-5 or triazines for 24 h. The secreted p3-Alc α peptides were recovered and analyzed by MALDI TOF MS (Fig. 6B).

Quantification of p3-Alc α peptide showed that, compared to the p3-Alc α peptide profile in vehicle treated cells, concentrations of the main alcadein α peptide (p3-Alc α 2N+35) and p3-Alc α 2N+37 peptide remained stable. In contrast, both p3-Alc α 2N+34 and p3-Alc α 2N+36 concentrations dropped by \sim 50% and p3-Alc α 2N+38 peptide concentration increased massively (up to 28.1 fold for dimethametryn; 16.8 fold for afatin-5) (Fig. 6C). These results show that, like for A β PP, triazines and afatins induce a shift in the cleavage pattern of Alcadein α , another



γ -secretase substrate, suggesting that these products are more likely to interact with γ -secretase rather than with its substrates.

DISCUSSION

Induction of A β ₄₂ production, increase in A β ₄₂/A β ₄₀ ratio

Various drugs (fenofibrate, celecoxib, indomethacin, isoprenoids) [40], DAPT under certain conditions [41, 42], steroids [43], ceramide analogs [44], and SIN-1 (a peroxynitrite donor) [45] have been shown to increase the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio, mostly by increasing A β ₄₂ production, though never to the high level seen with *afins* [13, 14]. We here show that some, but not all, widely used (though mostly banned nowadays) triazine herbicides induce a massive production of the AD-associated A β ₄₂ peptide in a variety of cell types. Consequently, the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio is increased, as observed in both familial EOAD (genetic origin) and LOAD (environmental, epigenetic origin). Detailed analysis of a variety of A β peptides reveals a pattern clearly associated with AD onset, such as increased A β _{1–16/17} [22, 23], A β _{1/5/11–42}, and A β _{1–43} [9–12], and decreased A β _{1–33/37/38}, which have been shown previously to be affected in EOAD subjects [46, 47]. While the underlying molecular mechanisms for the observed chemically-induced shift of A β PP cleavage pattern remain unclear, several remarks can be made:

- (1) there is a clear structure/activity relationship within triazines, as also observed with *afins*: not all products of the chemical class are active. This suggests specific molecular interactions rather than unspecific effects such as detergent, hydrophobic, membrane or protein structure disrupting actions.
- (2) the mechanism of action is more likely to involve an effect on γ -secretase and/or its

micro-environment rather than an interaction with its substrates, as shown by the fact that *afins* and triazines also induce a shift in the cleavage pattern of *alcadeins*, another γ -secretase substrate. The A β PP truncation experiments clearly suggest a very specific molecular requirement rather than a global, non-selective effect.

- (3) despite extensive proteomics analyses using the isobaric stable isotope labeling quantitative analysis approach over the reported exposure time (data not shown), we were unable to detect major/significant modifications in protein expression that might be linked to the A β PP cleavage shift induced by triazines, suggesting that RNA or protein synthesis alterations are unlikely involved in the induction of A β ₄₂ production. We were also unable to identify a specific target of triazines through affinity chromatography/proteomics approaches, suggesting that either the lipid raft comprising the γ -secretase or rather hydrophobic domains of γ -secretase might constitute the real targets of triazines (and *afins*).

“Alzheimerogens” in the HCE?

The Chemical Abstracts Service (CAS) registry, the world’s largest chemical database, contains more than 101 million organic and non-organic substances. About 15,000 novel substances are registered every day (on average one new substance every 2.5 min for the last 50 years!) (www.cas.org). The US EPA Toxic Substances Control Act lists over 84,000 chemicals that are manufactured or imported at levels >10 tons per year, not including pesticides, cosmetics, food stuffs and food additives which are covered by other legislations (www.epa.gov). It is estimated that man is exposed to over 85,000 products. The European REACH initiative aims at regulating all products which are produced/imported at >100 tons/year (>1

Fig. 6. Triazines alter the cleavage pattern of *Alcadein* α , leading to increased p3-Alc α 38 production. A) Schematic representation of the production of p3-Alc α peptides from *Alcadein* α . The full length protein is cleaved primarily by α -secretase at His814 or Ala816 (purple, 2 left arrows). It is then cleaved by γ -secretase at Thr851 (orange arrow) leading to the two main *Alcadein* α peptides p3-Alc α 35 and p3-Alc α 2N+35 (‘2N’ denotes the two additional, N-terminal amino acids). Alternative cleavage sites (blue, right arrows) generate additional p3-Alc α peptides of different sizes. B) Immunoprecipitation/mass spectrometry spectra of p3-Alc α peptides produced by HEK-*Alcadein* α cells exposed to various triazines, *afin*-5, or DMSO. Cells were treated for 24 h with 100 μ M of each reagent and p3-Alc peptides were analyzed by MALDI-TOF/MS. Representative profiles for each product (top) and zoom on the p3-Alc α 2N+34, p3-Alc α 2N+35, and p3-Alc α 2N+38 peaks (bottom). C) Relative quantification of p3-Alc α peptides produced by cells exposed to all triazines and *afin*-5. Levels of each peptide are presented as fold change of ratios over p3-Alc α 2N+35 versus corresponding peptide ratios for DMSO-treated cells (average \pm SEM of triplicate values). Horizontal dotted lines indicate levels for 1-fold change in p3-Alc α /p3-Alc α 35 ratio in treated versus control cell supernatant. Note the change of scale for p3-Alc α 2N+38/p3-Alc α 2N+35 treated/control ratio.

ton/year by May 2018). All these products, along with all natural substances to which we are exposed from conception to death, constitute the HCE [17, 18, 48, 49].

The impact of environment on health has been known since antiquity. It is therefore no surprise that a small number of products may enter the human body, cross the blood-brain barrier (BBB), alter specific molecular pathways in some of the human brain 10¹¹ neurons and 10¹² glia cells and thereby induce or contribute to specific diseases affecting the central nervous system. Identification of environmental factors involved in neurodegeneration and neurodegenerative diseases is surprisingly still in its infancy (reviews in [50–54]). The nervous system may be exposed to neurotoxic agents acutely (hours, days) or chronically (weeks, years, decades) before disease symptoms appear. Epidemiology studies are particularly difficult for neurodegenerative diseases since causes and effects are often separated by decades. These studies have, therefore, provided only few examples of environmental agents linked to the onset of neurodegenerative diseases. Pesticides, organic solvents, metals and some natural toxins (cyanobacteria) constitute the most frequently proposed neurotoxic agents. Two recently published books [55, 56] review the impact of early age and even *in utero* exposure to environmental chemical entities on brain development and cognitive abilities.

AD is one of the most prevalent and worrisome neurodegenerative diseases [57]. EOAD is clearly a genetic disease due to specific A β PP or PSEN1/2 mutations leading to overproduction of A β ₄₂ over A β ₄₀. The origin of LOAD (sporadic AD) (>99% of all AD cases) remains a mystery which epidemiological or genome-wide association studies have not solved, the latter having only revealed a few low impact genetic risk factors [58]. The most prominent risk alleles, ApoE ϵ 4 and clusterin/ApoI, link AD to lipid metabolism, and aging, together with several environmental factors, also impose an increased risk. Exposure to numerous industrial and agricultural chemicals correlates with neurotoxicity [50–54, 59, 60]. Elevated serum pesticides levels, in particular DDE, the major DDT metabolite, are associated with increased risk for AD [61]. DDT increases A β levels [62]. There are epidemiological links between exposure to pesticides and AD [63].

Continuous subcutaneous injection of aflin-5 in mice triggers robust dose-dependent increase in brain A β ₄₂ levels (unpublished data). Similar results were obtained with aflin-4 [15] and celecoxib or FT-1 [40].

Although orally administered triazines readily cross the BBB, their short half-life in mice prevented any accumulation *in vivo* (data not shown).

Based on results obtained with products belonging to various chemical classes, we can suspect the presence, in the HCE, of products able to increase the production of the AD-associated A β ₄₂/A β ₄₃ peptides. Such products might be classified as potential “Alzheimerogens” if long-term exposure, slow turnover, low elimination, and/or metabolism into stable A β ₄₂ inducers and BBB permeability allow accumulation in the brain and long-term action on brain cells. It is difficult to predict whether long-term, daily exposures of humans to the widely used triazines described here might have resulted in sustained increase in A β ₄₂ production. We are now investigating other A β ₄₂ inducers which have a longer half-life both in the environment and in man, which accumulate in adipose tissues and which cross the BBB. We believe that such products may contribute to the onset, development and acceleration of sporadic LOAD. It is intriguing that both aflin-5 and triazines were able to stimulate A β ₄₂ production in human cells displaying a pathological A β PP mutation and already showing enhanced A β ₄₂ production. This suggests that environmental factors may synergize with genetic/epigenetic factors in enhancing A β ₄₂ production and triggering AD. Identification of such potential “Alzheimerogens” in the HCE and regulation of human exposure to them should open the way to innovative AD prevention strategies. In addition, some of these products might be turned into pharmacological tools to develop a chemically-induced animal model of AD, with a fundamental and applied potential similar to the MPTP-induced Parkinsonism model [64].

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by ‘Fonds Unique Interministériel’ PHARMASEA/TRIAD projects (LM, HG), Fondation Jérôme Lejeune, ANSES (LM, HG) and CRITT-Santé Bretagne/FEDER (LM) and the Alzheimer’s Foundation, Sweden (EP, JP, KB, HZ). This research was also partly supported by an FP7-KBBE-2012 grant (BlueGenics) to LM. MC is CIFRE recipient. KB is a Torsten Söderberg Professor. HZ is a Wallenberg Academy Fellow. SDG & AM’s work was supported by the Deanship of Scientific Research, Prolific Research Group Program (PRG-1436-15), Vice-Rectorate for Graduate Stud-

ies and Scientific Research and the Visiting Professor Program of King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia. This work was supported in part by Grant-in-aid for Scientific Research 26293010 (TS) and 24790062 (SH) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan.

Authors' disclosures available online (<http://j-alz.com/manuscript-disclosures/16-0310r2>).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material is available in the electronic version of this article: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-160310>.

REFERENCES

- [1] Huang Y, Mucke L (2012) Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* **148**, 1204-1222.
- [2] Selkoe DJ, Mandelkow E, Holtzman DM (Ed.) (2012) *The biology of Alzheimer disease*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 511.
- [3] Vinters HV (2015) Emerging concepts in Alzheimer's disease. *Annu Rev Pathol* **10**, 291-319.
- [4] Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, Salloway S, Sperling RA, Windisch M, Xiong C (2011) Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **3**, 1.
- [5] Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, Vandersteen A, Segers-Nolten I, Van Der Werf K, Subramaniam V, Braeken D, Callewaert G, Bartic C, D'Hooze R, Martins IC, Rousseau F, Schymkowitz J, De Strooper B (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β ₄₂ to A β ₄₀ ratio. *EMBO J* **29**, 3408-3420.
- [6] McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, Skipper L, Murphy MP, Beard J, Das P, Jansen K, Delucia M, Lin WL, Dolios G, Wang R, Eckman CB, Dickson DW, Hutton M, Hardy J, Golde T (2005) Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* **47**, 191-199.
- [7] Findeis MA (2007) The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* **116**, 266-286.
- [8] Gouras GK, Olsson TT, Hansson O (2014) β -amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **12**, 3-11.
- [9] Welander H, Frånberg J, Graff C, Sundström E, Winblad B, Tjernberg LO (2009) Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J Neurochem* **110**, 697-706.
- [10] Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Sleegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC (2011) Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β ₄₃. *Nat Neurosci* **14**, 1023-1032.
- [11] Sandebring A, Welander H, Winblad B, Graff C, Tjernberg LO (2013) The pathogenic a β ₄₃ is enriched in familial and sporadic Alzheimer disease. *PLoS One* **8**, e55847.
- [12] Conicella AE, Fawzi NL (2014) The C-terminal threonine of A β ₄₃ nucleates toxic aggregation via structural and dynamical changes in monomers and protofibrils. *Biochemistry* **53**, 3095-3105.
- [13] Bettayeb K, Oumata N, Zhang Y, Luo W, Bustos V, Galons H, Greengard P, Meijer L, Flajolet M (2012) Small molecule inducers of A β ₄₂ peptide production share a common mechanism of action. *FASEB J* **26**, 5115-5123.
- [14] Hochard A, Oumata N, Bettayeb K, Gloulou O, Fant X, Durieu E, Buron N, Porceddu M, Borgne-Sanchez A, Galons H, Flajolet M, Meijer L (2013) Aftins increase amyloid- β ₄₂, lower amyloid- β ₃₈ and do not alter amyloid- β ₄₀ extracellular production *in vitro*: Toward a chemical model of Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* **35**, 107-120.
- [15] Meunier J, Borjini N, Gillis C, Villard V, Maurice T (2015) Brain toxicity and inflammation induced *in vivo* in mice by the amyloid- β forty-two inducer aftin-4, a roscovitine derivative. *J Alzheimers Dis* **44**, 507-524.
- [16] Rappaport SM (2011) Implications of the exposome for exposure science. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **21**, 5-9.
- [17] Wild CP (2005) Complementing the genome with an "exposome", the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1847-1850.
- [18] Wild CP (2012) The exposome from concept to utility. *Int J Epidemiol* **41**, 24-32.
- [19] Juarez PD, Matthews-Juarez P, Hood DB, Im W, Levine RS, Kilbourne BJ, Langston MA, Al-Hamdan MZ, Crosson WL, Estes MG, Estes SM, Agboto VK, Robinson P, Wilson S, Lichtveld MY (2014) The public health exposome: a population-based, exposure science approach to health disparities research. *Int J Environ Res Public Health* **11**, 12866-12895.
- [20] Vrijheid M, Slama R, Robinson O, Chatzi L, Coen M, van den Hazel P, Thomsen C, Wright J, Athersuch TJ, Avellana N, Basagaña X, Brochot C, Buchhini L, Bustamante M, Carracedo A, Casas M, Estivill X, Fairley L, van Gent D, Gonzalez JR, Granum B, Gražulevičienė R, Gutzkow KB, Julvez J, Keun HC, Kogevinas M, McEachan RR, Meltzer HM, Sabido E, Schwarze PE, Siroux V, Sunyer J, Want EJ, Zeman F, Nieuwenhuijsen MJ (2014) The human early-life exposome (HELIX), project rationale and design. *Environ Health Perspect* **122**, 535-544.
- [21] Wishart D, Arndt D, Pon A, Sajed T, Guo AC, Djoumbou Y, Knox C, Wilson M, Liang Y, Grant J, Liu Y, Goldansaz SA, Rappaport SM (2015) T3DB the toxic exposome database. *Nucleic Acids Res* **43**, D928-D934.
- [22] Portelius E, Price E, Brinkmalm G, Stiteler M, Olsson M, Persson R, Westman-Brinkmalm A, Zetterberg H, Simon AJ, Blennow K (2011) A novel pathway for amyloid precursor protein processing. *Neurobiol Aging* **32**, 1090-1098.
- [23] Pérez-Grijalva V, Pesini P, Allué JA, Sarasa L, Montañés M, Lacosta AM, Casabona D, San-José I, Boada M, Tárraga L, Ruiz A, Sarasa M (2015) A β ₁₋₁₇ is a major amyloid- β fragment isoform in cerebrospinal fluid and blood with possible diagnostic value in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **43**, 47-56.
- [24] Araki Y, Kawano T, Taru H, Saito Y, Wada S, Miyamoto K, Kobayashi H, Ishikawa HO, Ohsugi Y, Yamamoto T, Matsuno K, Kinjo M, Suzuki T (2007) The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *EMBO J* **26**, 1475-1486.
- [25] Hata S, Fujishige S, Araki Y, Kato N, Araseki M, Nishimura M, Hartmann D, Saftig P, Fahrenholz F, Taniguchi M,

- Urakami K, Akatsu H, Martins RN, Yamamoto K, Maeda M, Yamamoto T, Nakaya T, Gandy S, Suzuki T (2009) Alcadein cleavages by amyloid beta-precursor protein (APP) alpha- and gamma-secretases generate small peptides, p3-Alcs, indicating Alzheimer disease-related gamma-secretase dysfunction. *J Biol Chem* **284**, 36024-36033.
- [26] Kamogawa K, Kohara K, Tabara Y, Takita R, Miki T, Konno T, Hata S, Suzuki T (2012) Potential utility of soluble p3-alcadein α plasma levels as a biomarker for sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **31**, 421-428.
- [27] Piao Y, Kimura A, Urano S, Saito Y, Taru H, Yamamoto T, Hata S, Suzuki T (2013) Mechanism of intramembrane cleavage of alcadeins by γ -secretase. *PLoS One* **8**, e62431.
- [28] Omori C, Kaneko M, Nakajima E, Akatsu H, Waragai M, Maeda M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Nakaya T, Taru H, Yamamoto T, Asada T, Hata S, Suzuki T; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2014) Increased levels of plasma p3- α 35, a major fragment of Alcadein α by γ -secretase cleavage, in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **39**, 861-870.
- [29] Lebaron HM, McFarland JE, Burnside OC (2008) *The triazine herbicides*, Elsevier, Amsterdam.
- [30] Kounnas MZ, Danks AM, Cheng S, Tyree C, Ackerman E, Zhang X, Ahn K, Nguyen P, Comer D, Mao L, Yu C, Pleyner D, Digregorio PJ, Velicelebi G, Stauderman KA, Comer WT, Mobley WC, Li YM, Sisodia SS, Tanzi RE, Wagner SL (2010) Modulation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* **67**, 769-780.
- [31] Kretner B, Fukumori A, Gutsmedl A, Page RM, Luebbbers T, Galley G, Baumann K, Haass C, Steiner H (2011) Attenuated A β 42 responses to low potency gamma-secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds. *J Biol Chem* **286**, 15240-15251.
- [32] Ahn YH, Chang YT (2007) Tagged small molecule library approach for facilitated chemical genetics. *Acc Chem Res* **40**, 1025-1033.
- [33] Lee JW, Bork JT, Ha HH, Samanta A, Chang YT (2009) Novel orthogonal synthesis of a tagged combinatorial triazine library via Grignard reaction. *Aust J Chem* **62**, 1000-1006.
- [34] Leinenbach A, Pannee J, Düllföer T, Huber A, Bittner T, Andreasson U, Gobom J, Zetterberg H, Kobold U, Portelius E, Blennow K; IFCC Scientific Division Working Group on CSF proteins (2014) Mass spectrometry-based candidate reference measurement procedure for quantification of amyloid- β in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* **60**, 987-994.
- [35] Pannee J, Portelius E, Oppermann M, Atkins A, Hornshaw M, Zegers I, Höjrup P, Minthon L, Hansson O, Zetterberg H, Blennow K, Gobom J (2013) A selected reaction monitoring (SRM)-based method for absolute quantification of A β -38, A β -40, and A β 42 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients and healthy controls. *J Alzheimers Dis* **33**, 1021-1032.
- [36] Portelius E, Olsson M, Brinkmalm G, Rüetschi U, Mattsson N, Andreasson U, Gobom J, Brinkmalm A, Hölttä M, Blennow K, Zetterberg H (2013) Mass spectrometric characterization of amyloid- β species in the 7PA2 cell model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **33**, 85-93.
- [37] Mertens J, Stüber K, Wunderlich P, Ladewig J, Kesavan JC, Vandenberghe R, Vandenbulcke M, van Damme P, Walter J, Brüstle O, Koch P (2013) APP processing in human pluripotent stem cell-derived neurons is resistant to NSAID-based γ -secretase modulation. *Stem Cell Reports* **1**, 491-498.
- [38] Koch P, Tamboli IY, Mertens J, Wunderlich P, Ladewig J, Stüber K, Esselmann H, Wiltfang J, Brüstle O, Walter J (2012) Presenilin-1 L166P mutant human pluripotent stem cell-derived neurons exhibit partial loss of γ -secretase activity in endogenous amyloid- β generation. *Am J Pathol* **180**, 2404-2416.
- [39] Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O (2009) A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for *in vitro* instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3225-3230.
- [40] Kukar T, Murphy MP, Eriksen JL, Sagi SA, Weggen S, Smith TE, Ladd T, Khan MA, Kache R, Beard J, Dodson M, Merit S, Ozols VV, Anastasiadis PZ, Das P, Fauq A, Koo EH, Golde TE (2005) Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting A β 42 production. *Nat Med* **11**, 545-550.
- [41] Svedružić ŽM, Popović K, Šendula-Jengi V (2013) Modulators of γ -secretase activity can facilitate the toxic side-effects and pathogenesis of Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e50759.
- [42] Barnwell E, Padmaraju V, Baranello R, Pacheco-Quinto J, Crosson C, Ablonczy Z, Eckman E, Eckman CB, Ramakrishnan V, Greig NH, Pappolla MA, Sambamurti K (2014) Evidence of a novel mechanism for partial γ -secretase inhibition induced paradoxical increase in secreted amyloid β protein. *PLoS One* **9**, e91531.
- [43] Jung JJ, Ladd TB, Kukar T, Price AR, Moore BD, Koo EH, Golde TE, Felsenstein KM (2013) Steroids as γ -secretase modulators. *FASEB J* **27**, 3775-3785.
- [44] Takasugi N, Sasaki T, Shinohara M, Iwatsubo T, Tomita T (2015) Synthetic ceramide analogues increase amyloid- β 42 production by modulating γ -secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **457**, 194-199.
- [45] Guix FX, Wahle T, Vennekens K, Snellinx A, Chávez-Gutiérrez L, Ill-Raga G, Ramos-Fernandez E, Guardia-Laguarta C, Lleó A, Arimon M, Berezovska O, Muñoz FJ, Dotti CG, De Strooper B (2012) Modification of γ -secretase by nitrosative stress links neuronal ageing to sporadic Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* **4**, 660-673.
- [46] Portelius E, Andreasson U, Ringman JM, Buerger K, Daborg J, Buchhave P, Hansson O, Harmsen A, Gustavsson MK, Hanse E, Galasko D, Hampel H, Blennow K, Zetterberg H (2010) Distinct cerebrospinal fluid amyloid beta peptide signatures in sporadic and PSEN1 A431E-associated familial Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **5**, 2.
- [47] Portelius E, Forte J, Molinuevo JL, Gustavsson MK, Andreasson U, Sanchez-Valle R (2012) The amyloid-beta isoform pattern in cerebrospinal fluid in familial PSEN1 M139T- and L286P-associated Alzheimer's disease. *Mol Med Rep* **5**, 1111-1115.
- [48] Egeghy PP, Judson R, Gangwal S, Mosher S, Smith D, Vail J, Cohen Hubal EA (2012) The exposure data landscape for manufactured chemicals. *Sci Total Environ* **414**, 159-166.
- [49] Goldsmith MR, Grulke CM, Brooks RD, Transue TR, Tan YM, Frame A, Egeghy PP, Edwards R, Chang DT, Tornerovelez R, Isaacs K, Wang A, Johnson J, Holm K, Reich M, Mitchell J, Vallero DA, Phillips L, Phillips M, Wambaugh JF, Judson RS, Buckley TJ, Dary CC (2014) Development of a consumer product ingredient database for chemical exposure screening and prioritization. *Food Chem Toxicol* **65**, 269-279.
- [50] Grandjean P, Landrigan PJ (2006) Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* **368**, 2167-2178.

- [51] Grandjean P, Landrigan PJ (2014) Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol* **13**, 330-338.
- [52] Cannon JR, Greenamyre JT (2011) The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicol Sci* **124**, 225-250.
- [53] Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B (2015) Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci* **9**, 124.
- [54] Yegambaram M, Manivannan B, Beach TG, Halden RU (2015) Role of environmental contaminants in the etiology of Alzheimer's disease: A review. *Curr Alzheimer Res* **12**, 116-146.
- [55] Grandjean P (2013) Only one chance. *How environmental pollution impairs brain development - and how to protect the brains of the next generation*. Oxford University Press.
- [56] Demeneix B (2014) *Losing our minds. How environmental pollution impairs human intelligence and mental health*. Oxford University Press.
- [57] Alzheimer's, Association (2015) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **11**, 332-384.
- [58] Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thorton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin CF, Gerrish A, Schmidt H, Kunkle B, Dunstan ML, Ruiz A, Bihoreau MT, Choi SH, Reitz C, Pasquier F, Cruchaga C, Craig D, Amin N, Berr C, Lopez OL, De Jager PL, Deramecourt V, Johnston JA, Evans D, Lovestone S, Letenneur L, Morón FJ, Rubinsztein DC, Eiriksdottir G, Sleegers K, Goate AM, Fiévet N, Huentelman MW, Gill M, Brown K, Kamboh MI, Keller L, Barberger-Gateau P, McGuinness B, Larson EB, Green R, Myers AJ, Dufouil C, Todd S, Wallon D, Love S, Rogaeva E, Gallacher J, St George-Hyslop P, Clarimon J, Lleó A, Bayer A, Tsuang DW, Yu L, Tsolaki M, Bossú P, Spalletta G, Proitsi P, Collinge J, Sorbi S, Sanchez-Garcia F, Fox NC, Hardy J, Deniz Naranjo MC, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Matthews F, European Alzheimer's Disease Initiative (EADI), Genetic, Environmental Risk in Alzheimer's Disease, Alzheimer's Disease Genetic Consortium, Cohorts for Heart, Aging Research in Genomic Epidemiology, Moebius S, Mecocci P, Del Zompo M, Maier W, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Nacmias B, Gilbert JR, Mayhaus M, Lannefelt L, Hakonarson H, Pichler S, Carrasquillo MM, Ingelsson M, Beekly D, Alvarez V, Zou F, Valladares O, Younkin SG, Coto E, Hamilton-Nelson KL, Gu W, Razquin C, Pastor P, Mateo I, Owen MJ, Faber KM, Jonsson PV, Combarros O, O'Donovan MC, Cantwell LB, Soininen H, Blacker D, Mead S, Mosley TH Jr, Bennett DA, Harris TB, Fratiglioni L, Holmes C, de Bruijn RF, Passmore P, Montine TJ, Bettens K, Rotter JI, Brice A, Morgan K, Foroud TM, Kukull WA, Hannequin D, Powell JF, Nalls MA, Ritchie K, Lunetta KL, Kauwe JS, Boerwinkle E, Riemenschneider M, Boada M, Hiltunen M, Martin ER, Schmidt R, Rujescu D, Wang LS, Dartigues JF, Mayeux R, Tzourio C, Hofman A, Nöthen MM, Graff C, Psaty BM, Jones L, Haines JL, Holmans PA, Lathrop M, Pericak-Vance MA, Launer LJ, Farrer LA, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Moskvina V, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD, Amouyel P (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* **45**, 1452-1458.
- [59] Julvez J, Grandjean P (2009) Neurodevelopmental toxicity risks due to occupational exposure to industrial chemicals during pregnancy. *Ind Health* **47**, 459-468.
- [60] Zeliger HI (2013) Exposure to lipophilic chemicals as a cause of neurological impairments, neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Interdiscipl Toxicol* **6**, 103-110.
- [61] Richardson JR, Roy A, Shalat SL, von Stein RT, Hossain MM, Buckley B, Gearing M, Levey AI, German DC (2014) Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. *JAMA Neurol* **71**, 284-290.
- [62] Li G, Kim C, Kim J, Yoon H, Zhou H, 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* **46**, 109-122.
- [63] Hayden KM, Norton MC, Darcey D, Ostbye T, Zandi PP, Breitner JC, Welsh-Bohmer KA, Cache County Study Investigators (2010) Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD the Cache County study. *Neurology* **74**, 1524-1530.
- [64] Fox SH, Brotchie JM (2010) The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Prog Brain Res* **184**, 133-157.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Specific triazine herbicides induce amyloid β 42 production

Erik **PORTELIUS**, Emilie **DURIEU**, Marion **BODIN**, Morgane **CAM**, Josef **PANNEE**, Charlotte **LEUXE**, Aloïse **MABONDZO**, Nassima **OUMATA**, Hervé **GALONS**, Jung Yeol **LEE**, Young-Tae **CHANG**, Kathrin **STÜBER**, Philipp **KOCH**, Gaëlle **FONTAINE**, Marie-Claude **POTIER**, Antigoni **MANOUSOPOULOU**, Spiros **GARBIS**, Adrian **COVACI**, Debby **VAN DAM**, Peter **DE DEYN**, Frank **KARG**, Marc **FLAJOLET**, Chiori **OMORI**, Saori **HATA**, Toshiharu **SUZUKI**, Kaj **BLENNOW**, Henrik **ZETTERBERG** and Laurent **MEIJER**

1. Supplementary Material & Methods

1.1. Triazines and other reagents

The main triazine herbicides (**1-36**) were obtained commercially from Fluka/ Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). The flame retardant TTBP-TAZ (2,4,6-tris(2,4,6-tribromophenoxy)-1,3,5-triazine) (**37**) was from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

Terbutryn and cybutryne metabolites and contaminants, 2-N-tert-butyl-6-(methylsulfonyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine (terbutryn impurity) (**39**), terbutylazine-2-hydroxy (**41**), 4-(tert-butylamino)-6-(ethylamino)-1,3,5-triazine-2-thiol (**42**), 4-(tert-butylamino)-6-(ethylamino)-1,3,5-triazine-2-thiol (**43**) and N,N'-dicyclopropyl-1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine (cyromazine impurity) (**44**) were purchased from MicroCombiChem (Wiesbaden, Germany). Metabolite M13 (**40**) was synthesized by JL and YTC (not shown).

A panel of 236 triazines was selected in a large triazines library constructed as described previously [30, 31]. Twenty products displayed some activity (**45-65**) (Supplementary Table S5). Five triazines (**49, 66-69**) bearing a poly-ethylene glycol linker (2, 3 or 4 ethylene glycol moieties) were synthesized by JL and YTC (not shown).

Aftin-5 (**38**) (Adipogen International, San Diego, CA, USA) was synthesized as previously described [14]. Aftin-5 bearing a poly-ethylene glycol linker (5 ethylene glycol moieties) (**70**) was synthesized by NO and HG (not shown).

All compounds were solubilized as 100 mM stock solutions in 100% dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted just prior use.

The γ -secretase modulator ('Torrey Pines' compound) was synthesized as previously described [14, 30, 31]. DMSO, Nonidet P-40, Tween-20, CHAPSO (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate), dithiothreitol (DTT), bovine serum albumin (BSA), Na₂CO₃, NaHCO₃, citric acid monohydrate, Na₂HPO₄·2H₂O, H₂O₂, digitonin were purchased from Sigma Aldrich. Protease inhibitors mix (Complete) was obtained from Roche (Boulogne-Billancourt, France). Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugate was purchased from Thermo Scientific Pierce (Brebieres, France). o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) tablets were from Invitrogen (St Aubin, France). γ -Secretase inhibitors BMS299897 and DAPT (N-[(3,5-difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-

phenyl]glycine-1,1-dimethylethyl ester) were obtained from Tocris Bioscience (Lille, France). β -secretase inhibitor IV was from Calbiochem (Molsheim, France).

1.2. Cell cultures: cell lines, primary neuron cultures, iPSCs-derived neurons & HEK293-alcadeina cells

N2a-APP695 and CHO-7PA2 cell lines

N2a-APP695 cells (ECACC n° 89121404, lot 07/D/032) were cultured in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) / OptiMEM (1:1 v/v) (Invitrogen, Saint Aubin, France) containing 0.2 mg/mL Geneticin (Gibco, c/o Invitrogen) and 0.5% fetal bovine serum (FBS, Gibco) in a humidified, 5% CO₂ incubator. CHO-7PA2 cells (CHO cells stably expressing APP751 with the Val717Phe familial AD mutation, obtained from D.J. Selkoe, Harvard Medical School, Boston, USA) were cultured in DMEM/F12 (Invitrogen) + 0.5% FBS with Glutamax, Phenol Red and without HEPES. Cells were split routinely every 4/5 days. They were first rinsed with phosphate buffered saline (PBS) (Gibco) and detached from the plate bottom using 4 mL Versene (Gibco) at room temperature (RT) for 3-4 min. Eight mL of fresh medium were added to the cell suspension, and the mix was centrifuged for 3 min at 1,000 rpm. The cell pellet was resuspended in fresh medium before seeding (1/10 dilution) in new flasks.

Primary Rat Neuronal Cultures

Primary neuronal cultures were prepared from E18 OFA rats embryos brains (Charles River laboratories, L'Arbresle, France). All procedures were performed according to European law (EEC 86/609) and were approved by the local veterinary authorities (N° 12037). Primary cultures of cortical neurons were prepared according as described [65] with minor modifications. Dissociated neurons were plated onto poly-D-lysine (50 μ g/mL) coated coverslips (14 mm diameter, Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Germany) into 12 wells culture plates (Costar, Corning NY, USA) at 10⁵ cells/cm² for cortical neurons. All experiments were performed at 15 days *in vitro* (DIV). Briefly, cortices were dissected in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing 5 mM glucose (dissection medium). The medium was replaced 0.05% trypsin in 0.5 mM EDTA (Life Technologies, Grand island, NY, USA). Cortices were digested separately for 15 min at 37°C. After removing the trypsin, cortices were washed in dissection medium, and incubated in HBSS containing trypsin inhibitor (2 mg/mL, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and DNase I (0.05%, Sigma) for 3 minutes at 37°C. Cortices were washed in dissection medium, taken up in few mL of dissection medium and gently triturated by passing through a 1 mL ART® filter tip. Cells were counted and seeded at a density of 10⁵ cells/cm² into 12 wells culture plates (Costar) in plating medium (DMEM medium containing 10% heat-inactivated horse serum (Life Technologies)). Wells contained acid-washed glass coverslips (14 mm diameter, Marienfeld) which had been precoated with 50 μ g/mL poly-D-lysine (Sigma). Cultures were left to attach at 37°C with 5% CO₂. After 2 h, the plating medium was replaced with Neurobasal containing 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 μ g/mL penicillin and streptomycin, and 2% B27 supplement (Life Technologies) (culture medium). After 4 days, cytosine arabinoside (Sigma, 3 μ M final concentration) was added to suppress glial cell proliferation. Cultures were fed twice a week by adding a quarter of the volume of fresh culture medium (after removal of the same volume). At DIV 15th, neurons were incubated in culture medium (MEM 1X (Life Technologies), HEPES buffer 1M 1,5%

(Life Technologies) and NaOH (Sigma) up to pH 7,3) containing 100 μ M herbicides or 100 μ M afin-5 (ManRos Therapeutics, Roscoff, France) or vehicle (0,1% sterile DMSO, Sigma) for 18 hours. At the end of the treatment, secreted A β ₃₈, A β ₄₀ and A β ₄₂ peptides in conditioned medium were quantified by a sandwich immunoassay using the Meso Scale Discovery SECTOR Imager 2400. All reagents were from Meso Scale Discovery (Rockville MD, USA).

Human iPSCs-derived neuronal cultures

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) from 33-year old healthy male (A β PP WT, wild-type) and 55-year old female harboring a lysine 724 to asparagine mutation in A β PP (A β PP K724N mutation) have been generated and characterized previously [37, 38]. From iPSCs we generated long-term self-renewing neuroepithelial stem cells (It-NES cells), a homogeneous population which can be continuously propagated in the presence of FGF2 and EGF. To that end, 4-day-old embryoid bodies were transferred to polyornithine-coated tissue culture dishes and propagated in N2 medium (DMEM/F12 high glucose; N2 supplement, both Life Technologies, Darmstadt, Germany). Within 10 days, neural island consisting of neural rosettes and neural tube-like structures developed in the embryoid body outgrowth. These islands were mechanically isolated by separation from the surrounding cells with a scalpel. Isolated clusters were further propagated for 2 days as free-floating neurospheres in N2 medium containing 10 ng/mL FGF2 and 10 ng/mL EGF (both R&D Systems, Wiesbaden, Germany) and 1 μ L/mL B27 Supplement (Life Technologies; short: N2 FEB medium). Spheres were triturated into single cells by incubating the spheres with trypsin/EDTA for 10 min followed by gentle dissociation with a 1.000 μ L pipette tip. Cells were plated on polyornithine (Sigma Aldrich) and laminin (Life Technologies) precoated plastic dishes. Passaging of the cells was performed when cells had reached full confluence (normally every 3-4 days) at a 1:2 – 1:3 ratio using trypsin/EDTA. Medium was changed every other day while growth factors were added on a daily basis.

Neuronal differentiation was performed by plating 300,000 and 1,000,000 cells per well of a Geltrex (Life Technologies; diluted 1:50)-precoated 12-well plate or 6-well plate, respectively, in N2 FEB medium. The following day, the medium was changed to terminal differentiation medium containing DMEM/F12 and MACS Neuro Medium (Miltenyibiotec, Bergisch Gladbach, Germany) mixed at a 1:1 ratio and supplemented with 1:200 N2 supplement, 1:100 B27 supplement and 300 ng/mL cAMP (Sigma Aldrich). Medium was changed every other day.

Compound treatment was performed on neuronal cultures differentiated for at least 4 weeks. Cells were pretreated for 16 h with compound containing medium (all compounds at 100 μ M in 500 μ L medium/ 12-well plate and 1,5 ml medium/ 6-well plate). Solvent only (DMSO) was used as control. Medium was replaced (same volume with freshly added compounds) and supernatants and lysates were harvested 24 h later. Supernatants were directly frozen in liquid nitrogen until analyzed. A β ₄₂ and A β ₄₀ in the supernatants were analyzed by ELISA (Meso Scale Discovery, Rockville MD, USA) and normalized to the protein content of the cell pellet.

HEK293-alcadeina cell culture and Alcadein fragments analysis

The full-length human Alcadeina1 (Alca) open reading frame [24] was subcloned into the HindIII and XbaI sites of pcDNA3.1 (Hygro+) vector (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific,

Carlsbad, CA), transfected into HEK293 cells with Lipofectamine 2000 (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), and cells stably expressing A β were cloned. The cells cultured in dish coated with poly-L-lysine were treated with Aftin-5 or triazines (100 μ M) for 24 h. The secreted p3-A β were recovered from the cultured medium by immunoprecipitation with anti-p3-A β UT175 antibody, an antibody raised to an antigen peptide composed of Cys plus the human A β 1 839-851 sequence, using Protein G-Sepharose beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The beads were sequentially washed and samples were eluted with trifluoroacetic acid/acetonitrile/water (1:20:20) saturated with sinapinic acid, and subject to MALDI-TOF-MS analysis using an Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Molecular masses were calibrated using the peptide calibration standard (Bruker Daltonics) [25].

1.3. Transient transfections with A β PP truncation mutants

We used the human APP cDNA for all the experiments presented and the truncation mutants were generated by PCR using standard molecular techniques.

Briefly, full-length human APP cDNA was previously subcloned by using standard PCR and TA cloning molecular techniques, into the pcDNA3.1(+) plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) at BglII/BstXI restriction sites. Truncated APP mutants were subcloned from TA by EcoRI/EcoRI restriction sites into APP containing pcDNA3.1 (+) plasmid.

Forward oligonucleotide for:

T1-T6: 5'-TAT ATA AGA TCT CTG AAG TGA AGA TGG ATG C-3'

Reverse oligonucleotides for:

T1: 5'-TAT ATA CCA GAC TAC TGG CTA GGT GAC AGC GGC GTC AAC-3'

T2: 5'-TAT ATA CCA GAC TAC TGG CTA CAC ACC ATG ATG AAT GGA-3'

T3: 5'-TAT ATA CCA GAC TAC TGG CTA CTG TTT CTT CTT CAG CAT -3'

T4: 5'-TAT ATA CCA GAC TAC TGG CTA CAG CAT CAC CAA GGT GAT-3'

T5: 5'-TAT ATA CCA GAC TAC TGG CTA CAC CAA GGT GAT GAC GAT -3'

T6: 5'-TAT ATA CCA GAC TAC TGG CTA CAA GGT GAT GAC GAT CAC -3'

N2a cells were maintained in growing medium (50% DMEM, 50% OPTI-MEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (vol/vol). Transfections were carried using Fugene6 according to the manufacturer instructions. For experiments, cells were plated in 6-well plates at a density of 4×10^5 cells per well. Cells were grown to about 40% confluence and then transfected with relevant plasmid constructs using FuGENE6 (Roche, Indianapolis). 48 h after transfection, cells were treated for 24 h with various triazines. Supernatants were collected for A β 42 measurements and cells were harvested for protein quantification.

1.4. Amyloids assays

Amyloids were measured by different methods according to the different cell types:

- Primary rat neuronal cultures and human iPSCs-derived neuronal cultures: Meso Scale Discovery sandwich ELISA immunoassay.
- N2a cells transfected with various APP C-terminal truncated mutants: BioSource International ELISA assay (see below).

- N2a-APP695 and CHO-7PA2 cell lines: an in-house sandwich ELISA assay described below, as well as tandem mass spectrometry (MS/MS) (see below) and immunoprecipitation / mass spectrometry (IP-MS) (see below).

In-house ELISA capture assay [14]

N2a-APP695 or CHO-7PA2 cells were seeded at 10,000 cells/well in a 96 well plate with modified media (0.5% FBS) and incubated overnight. Cells were treated with fresh media and different compounds (equal quantity of DMSO), then incubated for 18 h in a humidified, 5% CO₂ incubator. The plate was finally centrifuged to remove cell fragments before collecting supernatant samples for amyloids levels determination (see below). To determine the amount of secreted A β peptides in the primary rat neuron culture medium, 15 days culture medium was discarded and replaced by fresh media which was collected after 18 h incubation.

A β ₃₈, A β ₄₀, A β ₄₂ levels were measured in a double antibody sandwich ELISA using a combination of monoclonal antibody (mAb) 6E10 (Covance c/o Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) and biotinylated polyclonal A β ₃₈ [66], A β ₄₀ or A β ₄₂ [67] antibodies (provided by Dr. P.D. Mehta, Staten Island, USA). Briefly, 100 μ L mAb 6E10 diluted in carbonate-bicarbonate buffer (buffer (0.015 M Na₂CO₃ + 0.035 M NaHCO₃) pH 9.6), was coated in the wells of microtiter plates (Maxisorp, Nunc, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) and incubated overnight at 4°C. The plates were washed with PBST (PBS containing 0.05% Tween-20) and blocked for 1 h with 1% BSA in PBST to avoid non-specific binding. Each of the A β ₃₈, A β ₄₀ or A β ₄₂ antibodies did not cross-react with the other amyloid peptides (data not shown). Standard curves were prepared with synthetic amyloids and each of the three antibodies. Fitting was performed using a 4 parameters sigmoid equation (SigmaPlot, Systat, Macon, France).

Typically, the first day, the cells were detached of the flask with Versene, centrifuged during 3 minutes at 1000 rpm and suspended in 10 mL of medium. The cells were counted and seeded in 6 well plates at 200,000 cells/well. The medium used were DMEM/F12 supplemented with 0.5% FBS for the CHO-7PA2 cells and DMEM/Optimem (1:1) supplemented with 0.5% FBS for N2aAPP695 cells. The second day, the cells were treated for 24 h with 100 μ M Aftin 5 or Triazine in a final concentration of DMSO of 0.1%. Control cells were also exposed to 0.1% DMSO. The volume final of medium was 2 mL. The third day, after the 24 h treatment, the plates were agitated slowly and 2 mL of medium were collected in one tube (3 tubes per condition). The tubes were inverted and 200 μ L were removed for ELISA analysis. The remaining 1.8 mL were frozen at -80°C.

Following a washing step, experimental samples were added into the wells and incubation was carried out for 2 h at RT and overnight at 4°C. Plates were washed before incubation with biotinylated polyclonal antibody diluted in PBST + 0.5% BSA at RT for 75 min. After a washing step, streptavidin-HRP conjugate, diluted in PBS + 1% BSA, was added and incubation was carried out for 45 min at RT. After washing, 100 μ L OPD in citrate buffer (0.049 M citric acid monohydrate + 0.1 M Na₂HPO₄.2H₂O + 1 mL H₂O₂ 30%/L) pH 5.0 were added. The reaction was stopped after 15 min with 100 μ L 1 N sulfuric acid. The optical density was measured at 490 nm in a microELISA reader (BioTek Instrument, El 800, Gen 5 software).

BioSource International ELISA assays and data analysis

β Amyloid 1-40 or 1-42 Colorimetric Elisa kits were used for cells transfected with human full length APP and its truncation mutants. After immobilization of total A β from media, A β 40/42 peptide determinations were made by sandwich ELISA (BioSource International, Camarillo, CA). A β levels were normalized to total protein levels after cell recovery. Cells were recovered with 100 μ L of RIPA buffer (0.15 mM NaCl/0.05 mM Tris·HCl, pH 7.2/1% Triton X-100/1% sodium deoxycholate/0.1% SDS), incubated for 30 min on ice, and centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at 4°C. A β 40 and A β 42 standard curves were plotted as a sigmoidal dose-response curve (variable slope) by using GraphPad Prism ver. 4.0. Data presented are the results of at least three independent experiments done in triplicate.

Absolute quantification of amyloids by tandem mass spectrometry (MS/MS)

Solid phase extraction, liquid chromatography (LC) and MS/MS analysis of A β species was performed as described previously [34, 35] with the following modifications. Standard curves for A β 38 and A β 42 were prepared at 0.15, 0.5, 1, 2, 3 and 4 ng/mL while A β 40 was prepared at 15, 50, 100, 200, 300 and 400 ng/mL using unlabeled peptides (rPeptide) in DMEM/F12 supplemented with 0.5% FBS. Uniformly labeled ^{15}N -A β 38, A β 40 and A β 42 peptides (rPeptide) were added to a final concentration of 1.6 ng/mL in calibrators and unknown samples as internal standards. Standard curves were constructed using the unlabeled to ^{15}N -A β peak area ratios and fitted using linear regression. All standard curves were linear and had an R^2 value greater than 0.998. Concentrations of unknowns were extrapolated from the standard curves using the peak area ratio of endogenous to ^{15}N -A β .

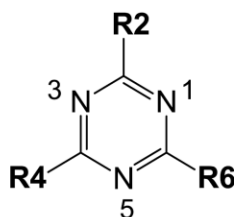
Amyloids profile analysis by immunoprecipitation / mass spectrometry (IP-MS)

Immunoaffinity capture of A β species was combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS for analyzing a variety of A β peptides in a single analysis as described [68]. In brief, the anti-A β antibodies 6E10 and 4G8 were separately coupled to magnetic beads. After washing of the beads, the 4G8 and 6E10-coated beads were used in combination for immunoprecipitation. After elution of the immune-purified A β peptides, analyte detection was performed on an UltraFLEXtreme MALDI TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics). For each peak the areas were normalized against the sum for all the A β peaks in the spectrum followed by averaging of results for separately determined duplicate samples [36].

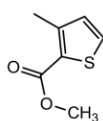
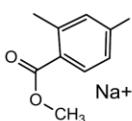
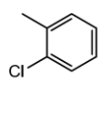
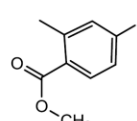
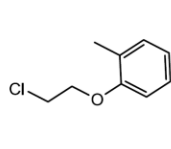
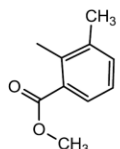
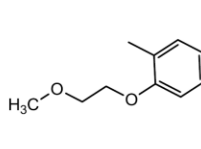
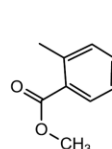
1.5. Cell viability

To measure cell viability, the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) was used in the same wells as the capture ELISA assay. Briefly, 20 μ L of MTS reagent was added in each well containing 100 μ L of media and incubation then proceeded for 3 h (37°C, 5% CO₂ and 95% humidity). Measurements were made at OD 490 Δ 630 nm using a microELISA reader.

2. Supplementary Tables

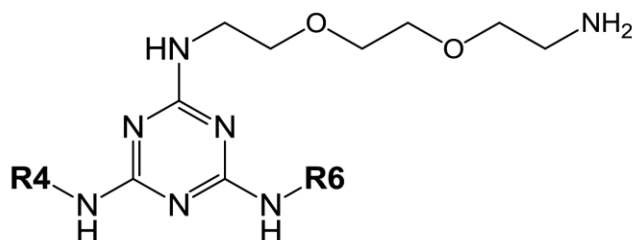


#	Triazines	2	4	6
1	Atrazine	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂
2	Simazine	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH-C ₂ H ₅
3	Propazine	-Cl	-NH-CH(CH ₃) ₂	-NH-CH(CH ₃) ₂
4	Cyanazine	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH-C(CH ₃) ₂ CN
5	Terbuthylazine	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH-C(CH ₃) ₃
6	Sebuthylazine	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅
7	Atraton	-OCH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂
8	Terbumeton	-OCH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-C(CH ₃) ₃
9	Prometon	-OCH ₃	-NH-CH(CH ₃) ₂	-NH-CH(CH ₃) ₂
10	Simetryn	-SCH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-C ₂ H ₅
11	Ametryn	-SCH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂
12	Prometryn	-SCH ₃	-NH-CH(CH ₃) ₂	-NH-CH(CH ₃) ₂
13	Dipropetryn	-SC ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂	-NH-CH(CH ₃) ₂
14	Terbutryn	-SCH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-C(CH ₃) ₃
15	Cybutryne	-SCH ₃	-NH-cycloC ₃ H ₅	-NH-C(CH ₃) ₃
16	Aziprotryn	-SCH ₃	-N=N=N	-NH-CH(CH ₃) ₂
17	Desmetryn	-SCH ₃	-NH-CH ₃	-NH-CH(CH ₃) ₂
18	Dimethametryn	-SCH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃)-CH(CH ₃) ₂
19	Methoprotryn	-SCH ₃	-NH-CH(CH ₃) ₂	-NH-(CH ₂) ₃ -OCH ₃
20	Hydroxyatrazine	=O	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂
21	Desethylhydroxy-atrazine	-OH	-NH ₂	-NH-CH(CH ₃) ₂
22	Ammeline	-OH	-NH ₂	-NH ₂
23	Didealkylatrazine	-Cl	-NH ₂	-NH ₂
24	Desethylatrazine	-Cl	-NH ₂	-NH-CH(CH ₃) ₂
25	Deisopropylatrazine	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH ₂
26	Hexazinone *	=O	=O	-N(CH ₃) ₂
27	Terbumeton-desethyl	-OCH ₃	-NH ₂	-NH-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅
28	Thifensulfuron-methyl	-OCH ₃	-CH ₃	-NH-CO-NH-SO ₂ -X1
29	Iodosulfuron-methyl-sodium	-OCH ₃	-CH ₃	-NH-CO-NH-SO ₂ -X2
30	Chlorosulfuron	-OCH ₃	-CH ₃	-NH-CO-NH-SO ₂ -X3
31	Tribenuron-methyl	-OCH ₃	-CH ₃	-N(CH ₃)-CO-NH-SO ₂ -X4
32	Triasulfuron	-OCH ₃	-CH ₃	-NH-CO-NH-SO ₂ -X5
33	Triflurosulfuron-methyl	-OCH ₃ -CF ₃	-N(CH ₃) ₂	-NH-CO-NH-SO ₂ -X6
34	Cinosulfuron	-OCH ₃	-OCH ₃	-NH-CO-NH-SO ₂ -X7
35	Metsulfuron-methyl	-OCH ₃	-CH ₃	-NH-CO-NH-SO ₂ -X8
36	Trietazine	-Cl	-N(C ₂ H ₅) ₂	-NH-CH(CH ₃) ₂
37	TTBP-TAZ	2,4,6-tribromophenoxy	2,4,6-tribromophenoxy	2,4,6-tribromophenoxy

* N1 = - phenyl ; N3 = - CH₃**X1****X2****X3****X4****X5****X6****X7****X8****Table S1. Structure of the triazines tested.**

#	Triazines	N2a-APP695 (A β ₄₂ fold change)	CHO-7PA2 (A β ₄₂ fold change)
1	Atrazine	2.39 \pm 0.17	1.64 \pm 0.08
2	Simazine	1.42 \pm 0.13	1.04 \pm 0.12
3	Propazine	2.18 \pm 0.42	1.15 \pm 0.07
4	Cyanazine	1.39 \pm 0.11	0.93 \pm 0.07
5	Terbuthylazine	2.91 \pm 0.26	1.92 \pm 0.19
6	Sebuthylazine	2.65 \pm 0.17	1.89 \pm 0.14
7	Atraton	1.29 \pm 0.10	1.21 \pm 0.15
8	Terbumeton	2.66 \pm 0.20	2.57 \pm 0.12
9	Prometon	2.05 \pm 0.32	2.00 \pm 0.17
10	Simetryn	2.09 \pm 0.23	1.86 \pm 0.18
11	Ametryn	3.39 \pm 0.31	3.39 \pm 0.25
12	Prometryn	5.63 \pm 0.63	5.65 \pm 0.17
13	Dipropetryn	10.03 \pm 0.97	5.51 \pm 0.62
14	Terbutryn	7.23 \pm 0.56	6.29 \pm 0.95
15	Cybutryne	6.81 \pm 0.81	5.71 \pm 0.37
16	Aziprotryn	2.16 \pm 0.29	1.73 \pm 0.04
17	Desmetryn	1.60 \pm 0.13	1.76 \pm 0.23
18	Dimethametryn	6.67 \pm 0.62	5.52 \pm 0.48
19	Methoprotryn	2.72 \pm 0.21	2.88 \pm 0.11
20	Hydroxyatrazine	1.02 \pm 0.14	1.02 \pm 0.07
21	Desethylhydroxy-atrazine	1.04 \pm 0.19	1.09 \pm 0.10
22	Ammeline	0.96 \pm 0.24	0.93 \pm 0.10
23	Didealkylatrazine	0.86 \pm 0.15	0.79 \pm 0.06
24	Desethylatrazine	1.34 \pm 0.19	1.22 \pm 0.11
25	Desisopropylatrazine	1.31 \pm 0.26	1.15 \pm 0.09
26	Hexazinone	0.90 \pm 0.19	1.08 \pm 0.15
27	Terbumeton-desethyl	1.28 \pm 0.22	1.26 \pm 0.14
28	Thifensulfuron-methyl	0.85 \pm 0.09	0.97 \pm 0.14
29	Iodosulfuron-methyl-sodium	0.99 \pm 0.12	1.05 \pm 0.04
30	Chlorosulfuron	0.91 \pm 0.08	1.05 \pm 0.17
31	Tribenuron-methyl	1.21 \pm 0.14	1.11 \pm 0.06
32	Triasulfuron	0.85 \pm 0.21	0.92 \pm 0.13
33	Triflusaluron-methyl	0.82 \pm 0.12	0.78 \pm 0.08
34	Cinosulfuron	0.77 \pm 0.11	0.82 \pm 0.16
35	Metsulfuron-methyl	0.69 \pm 0.11	0.86 \pm 0.11
36	Trietazine	0.46 \pm 0.34	0.85 \pm 0.21
37	TTBP-TAZ	1.13 \pm 0.09	1.01 \pm 0.14
38	Aftin-5	6.24 \pm 0.67	4.34 \pm 0.61

Table S2. Effect of 37 triazines on extracellular amyloid A β ₄₂ production by N2a-APP695 and CHO-7PA2 cells. Cells were treated with 100 μ M of each compound for 18 h and cell supernatants were collected for extracellular A β ₄₂ levels measurement by an ELISA assay. Aftin-5 was used as positive control and corresponding volume of vehicle (DMSO) was used as a negative control. Levels are expressed as fold change \pm standard error of A β ₄₂ level over the A β ₄₂ level of control, vehicle-treated cells. Average of two experiments performed in triplicate (representative of four independent experiments). In bold, products inducing >3 fold increase of A β ₄₂ production. TTBP-TAZ, 2,4,6-tris(2,4,6-tribromophenoxy)-1,3,5-triazine. Products were tested at 1, 10 and 100 μ M, but only results with 100 μ M are shown here to also show the inactive products. A dose-dependent effect was often seen with the active compounds.



#	Triazines	R ₂	R ₄	R ₆	N2a-APP695 (Aβ ₄₂ fold change)
45	AA9-E02 *	-NH-(CH ₂) ₂ - (OCH ₂ CH ₂) ₂ -NH ₂	-(CH ₂) ₂ -Ph	-NH- <i>i</i> -Pr	1.29 ± 0.01
46	AA9-E03	"	-(CH ₂) ₂ -Ph	-NH-C ₄ H ₉	3.14 ± 0.15
47	AA9-E04	"	-(CH ₂) ₂ -Ph	-N-(C ₄ H ₉) ₂	1.59 ± 0.06
48	AA9-E05	"	-(CH ₂) ₂ -Ph	-NH-cyclohexyl	2.31 ± 0.15
49	AA9-F03	"	-CH ₂ -Bn-p-OCH ₃	-NH-C ₄ H ₉	5.63 ± 0.16
50	AA9-F08	"	-CH ₂ -Bn-p-OCH ₃	-piperidine	3.37 ± 0.17
51	AA9-G03	"	-Ph-p-OCH ₃	-NH-C ₄ H ₉	4.29 ± 0.32
52	AA9-G04	"	-Ph-p-OCH ₃	-N-(C ₄ H ₉) ₂	2.20 ± 0.13
53	AA9-G05	"	-Ph-p-OCH ₃	-NH-cyclohexyl	2.74 ± 0.05
54	AA9-G06 *	"	-Ph-p-OCH ₃	-NH-CH ₂ -CH=CH ₂	2.34 ± 0.38
55	AA9-G07	"	-Ph-p-OCH ₃	-NH-CH ₂ -(2-tetrahydrofuran)	3.07 ± 0.39
56	AA9-G08	"	-Ph-p-OCH ₃	-piperidine	2.63 ± 0.43
57	AA9-H03	"	-CH ₂ -CH(OH) ₂	-NH-C ₄ H ₉	2.68 ± 0.40
58	AA10-B02	"	-CH ₂ -Bn-p-OCH ₃	-NH-C ₈ H ₁₇	2.88 ± 0.12
59	AA10-B10	"	-CH ₂ -Bn-p-OCH ₃	-NH-p-F-Bn	4.43 ± 0.11
60	AA10-C10	"	-Ph-p-OCH ₃	-NH-p-F-Bn	2.28 ± 0.36
61	AA11-A09	"	-CH ₂ -Bn	-NH-CH(isopropyl)-CO-OCH ₃	3.29 ± 0.58
62	AA11-B08	"	-CH ₂ -Bn-p-OCH ₃	-NH-CH(benzyl)-CO-OCH ₃	2.71 ± 0.47
63	AA11-B09	"	-CH ₂ -Bn-p-OCH ₃	-NH-CH(<i>i</i> -Pr)-CO-OCH ₃	3.03 ± 0.17
64	AA11-E08	"	-CH ₂ -Bn	-p-tBut-Ph	2.27 ± 0.15
65	AA11-F08	"	-CH ₂ -Bn-p-OCH ₃	-p-tBut-Ph	2.14 ± 0.10
66	A1	-S-(CH ₂) ₂ - (OCH ₂ CH ₂) ₃ -NH ₂	-NH- <i>i</i> -Pr	-NH- <i>i</i> -Pr	8.17 ± 0.37
67	B1	-S-(CH ₂) ₂ - (OCH ₂ CH ₂) ₄ -NH ₂	-NH- <i>i</i> -Pr	-NH- <i>i</i> -Pr	4.17 ± 0.89
68	D1	-NH-(CH ₂) ₂ - (OCH ₂ CH ₂) ₂ -NH ₂	-NH- <i>i</i> -Pr	-NH- <i>i</i> -Pr	2.22 ± 0.15
69	C1	-NH-(CH ₂) ₂ - (OCH ₂ CH ₂) ₃ -NH ₂	-NH- <i>i</i> -Pr	-NH- <i>i</i> -Pr	2.63 ± 1.08
70	Aftin-5L				5.10 ± 0.57

Table S3. Effect of 21 products selected from a triazine library on extracellular Amyloid Aβ₄₂ production by N2a-APP695. N2a-APP695 cells were first treated with 10 and 100 μM of 236 triazines for 18 h and cell supernatant was collected for extracellular Aβ₄₂ levels measurement by an ELISA assay. The library was screened in triplicate, and active products (> 3 fold increase in Aβ₄₂ production) were tested at 100 μM on N2a-APP695 cells in three independent experiments. Levels are expressed as fold change of Aβ₄₂ level over the Aβ₄₂ level of control, vehicle-treated cells. Average ± errors bars represent standard error of triplicate values. *, 33 μM. Aftin-5 was used as positive control, and corresponding volume of vehicle (DMSO) was used as a negative control.

3. Supplementary figures

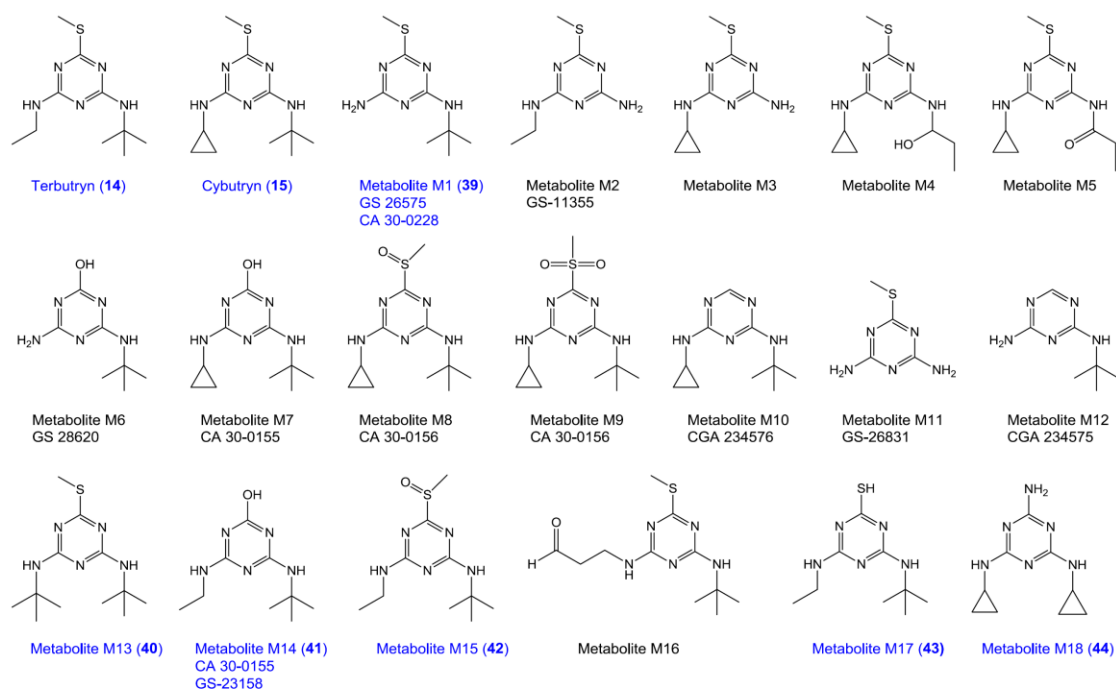
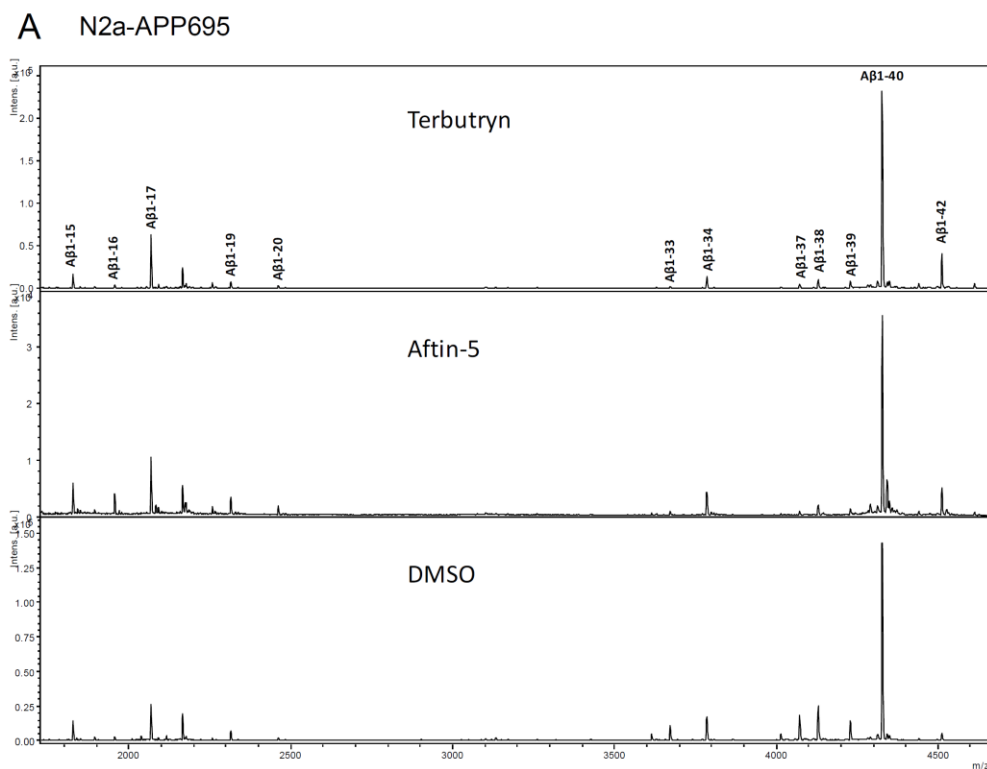


Figure S1. Structure of main terbutryn and cybutryn metabolites. Blue, products which were available for evaluation in the cellular A β ₄₂ production assay.



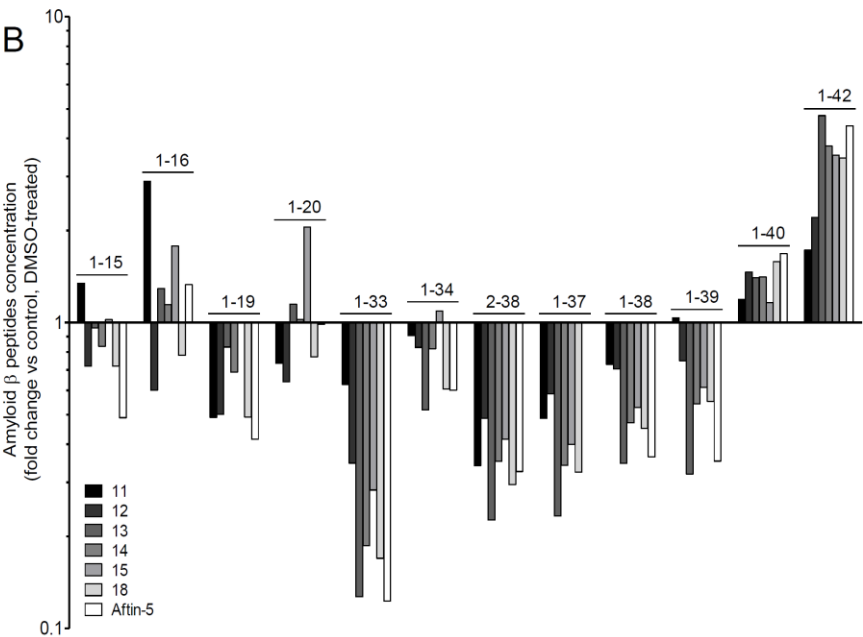


Figure S2. Pattern of amyloid peptides produced by N2a-APP695 cells exposed to triazines. Cells were treated for 18 h with DMSO, 100 μ M of each triazine or aftin-5. Cell supernatants were collected and analyzed as described. **A.** Example spectra of supernatants amyloid profiles from N2a-APP695 cells exposed to DMSO, aftin-5 or terbutryn. **B.** Quantification of all amyloid peptides in N2a-APP695 cell supernatants (Log of fold change in triazine or aftin-5 treated cells over control, DMSO-treated cells).

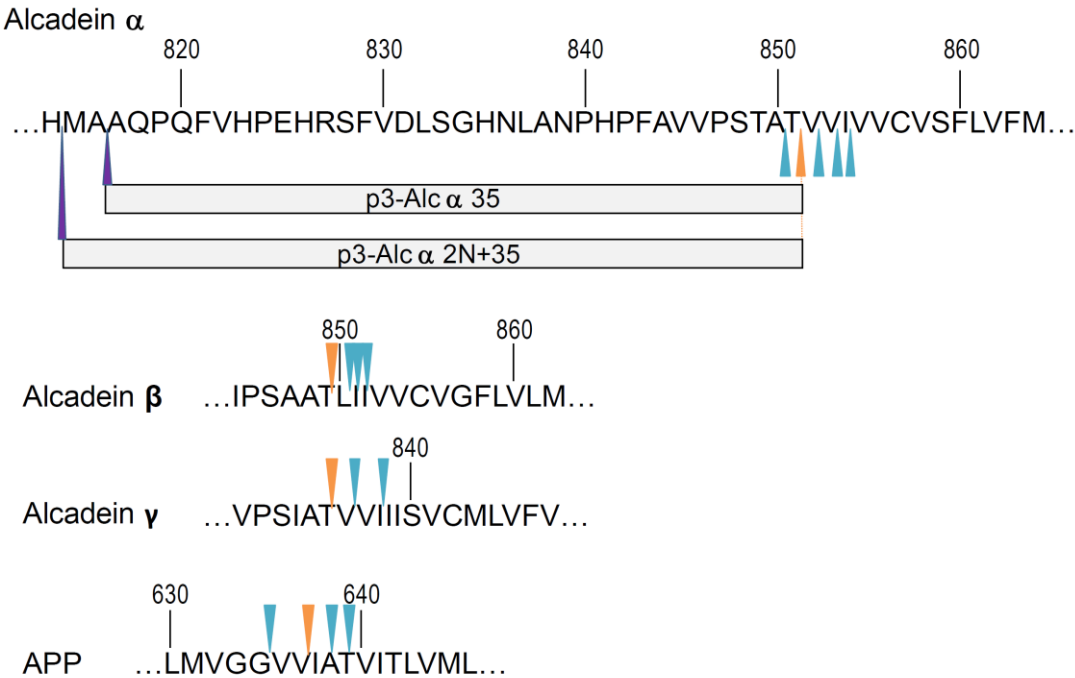


Figure S3. γ -Secretase cleavage sites in Alcadeins and A β PP.

2. Autres résultats

Par ailleurs, des études plus approfondies ont été réalisées sur le dipropetryn et le terbutryn en comparaison avec l'aftin-5, déjà connue pour ses propriétés alzheimerigènes.

La capacité d'induction de la production de peptides amyloïdes par les triazines a été testée sur différents modèles, notamment sur les N2aAPP₆₉₅ (figure 17). Ce même test a été réalisé en parallèle sur les N2a (n'exprimant pas APP, figure 17). Les trois produits induisent fortement la production de peptides A β 42, tout en étant relativement peu toxiques.

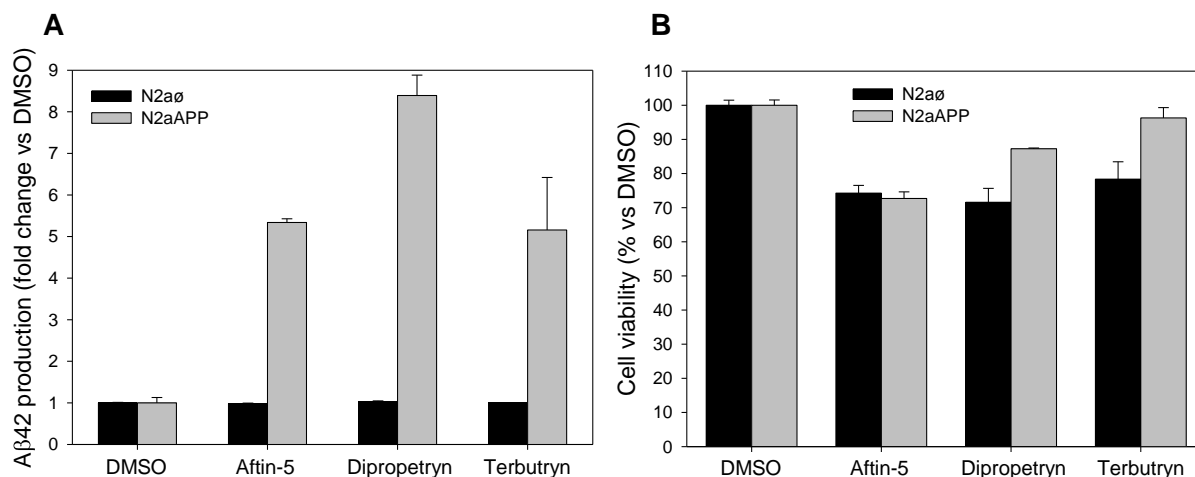


Figure 17 : L'aftin-5, le dipropetryn et le terbutryn induisent l'augmentation de la production de peptides A β -42. Les cellules N2a et N2aAPP₆₉₅ ont été traitées pendant 18h avec 100 μ M d'aftin-5, de dipropetryn ou de terbutryn, ou avec du DMSO. La quantité de peptides A β 42 a été mesurée par un test ELISA (A) et la viabilité cellulaire a été contrôlée par un test MTS (B).

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires d'action des triazines, le protéome de ces cellules N2aAPP₆₉₅, exposées à l'aftin-5, au dipropetryn, au terbutryn ou au DMSO pendant 18h, a été analysé. L'expression de 1796, 1693 et 1963 protéines a été modifiée, dans les cellules traitées à l'aftin-5, au dipropetryn et au terbutryn, respectivement, comparée au contrôle (cellules traitées au DMSO). L'analyse fonctionnelle de ces protéines est présentée dans les annexes 1 à 3. Notamment, les protéines up/down régulées par le traitement au dipropetryn sont significativement retrouvées dans la voie de signalisation de la MA, dans le stress oxydatif, dans les processus basés sur les microtubules et dans le catabolisme des

macromolécules. Ces protéines semblent majoritairement localisées dans la mitochondrie. Au vue de l'ensemble des résultats (cellulaires et animaux), le dipropetryn est considéré comme le produit le plus efficace, parmi les triazines testées, quant à l'induction de la production de longues formes de peptides A β dans le contexte de la MA.

B. Les insecticides pyrazoles : zoom sur le fipronil et ses principaux métabolites

Lors de la recherche de produits alzheimerigènes au sein du « Human Chemical Exposome », une autre famille de pesticides été détectée par Emilie Durieu lors de criblages cellulaires visant à identifier des composés capables d'induire la production extracellulaire d'amyloïdes A β 42 : les insecticides pyrazoles. Mes travaux de thèse se sont donc majoritairement orientés sur cette famille de molécules, en particulier le fipronil. Ma contribution a été de : (1) débiter une analyse des modifications protéomiques induites par l'exposition de cellules N2aAPP₆₉₅ au fipronil sulfone, le métabolite majoritaire du fipronil. (2) tester les effets des métabolites du fipronil sur la production d'A β 42.

1. Résultats préliminaires

Le fipronil et certains de ses dérivés ont été testés pour leur capacité à induire la production de longs peptides A β . Certains d'entre eux montrent une augmentation du ratio A β 42/A β 40 (figure 18A) ainsi qu'une cytotoxicité relativement importante (figure 18B), notamment pour le fipronil sulfide, le fipronil sulfone, le fipronil desulfinyl et le fipronil.

Afin de comprendre le mécanisme d'action du fipronil et de ses dérivés, nous avons, dans un premier temps, voulu vérifier que l'inhibition de la γ -sécrétase engendrait l'inhibition de la production des longues formes de peptides A β (figure 19). À partir de 0,6 μ M, le DAPT, un inhibiteur de la γ -sécrétase, inhibe presque entièrement la formation de peptides A β 42 et A β 40, induite par le fipronil sulfone. A cette concentration, et jusqu'à 10 μ M, le DAPT n'est pas toxique pour les N2aAPP₆₉₅.

Afin de prendre une marge de sécurité, la concentration de 1 μM a été sélectionnée pour les tests suivants.

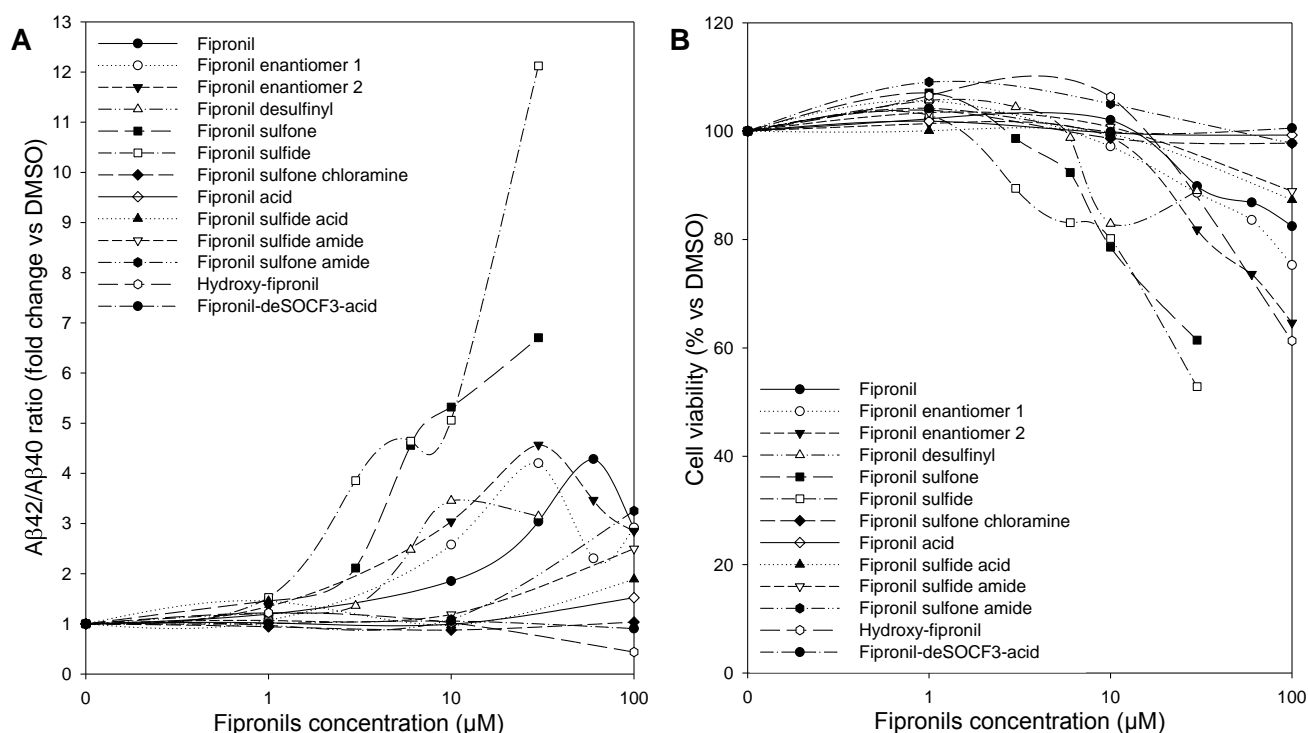


Figure 18 : Le fipronil et certains de ses dérivés augmentent le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Les cellules N2aAPP₆₉₅ ont été exposées à des doses croissantes de fipronil ou de ses dérivés pendant 18h. En raison de la cristallisation de certains composés, ceux-ci n'ont pas tous été testés à des concentrations aussi élevées. La quantité de peptides $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ a été mesurée par un test ELISA (A) et la viabilité a été contrôlée par un test MTS (B).

Toujours dans le même but, une analyse protéomique et phosphoprotéomique a été réalisée sur les cellules traitées au fipronil sulfone, le métabolite majoritaire du fipronil, en présence ou en absence de DAPT. Cette étude a permis de détecter les protéines dont l'expression et la phosphorylation sont modifiées par le fipronil sulfone, et de déterminer celles dépendante ou indépendantes de la γ -sécrétase.

L'analyse fonctionnelle des protéines up/down régulées par le fipronil sulfone est présentée en annexe 4. Comme pour le dipropetryn et le terbutryn, les protéines up/down régulées par le fipronil sulfone sont significativement retrouvées dans la voie de signalisation de la MA, le stress oxydatif, le cycle cellulaire et les processus d'oxydation. De même, ces protéines semblent majoritairement localisées dans la mitochondrie.

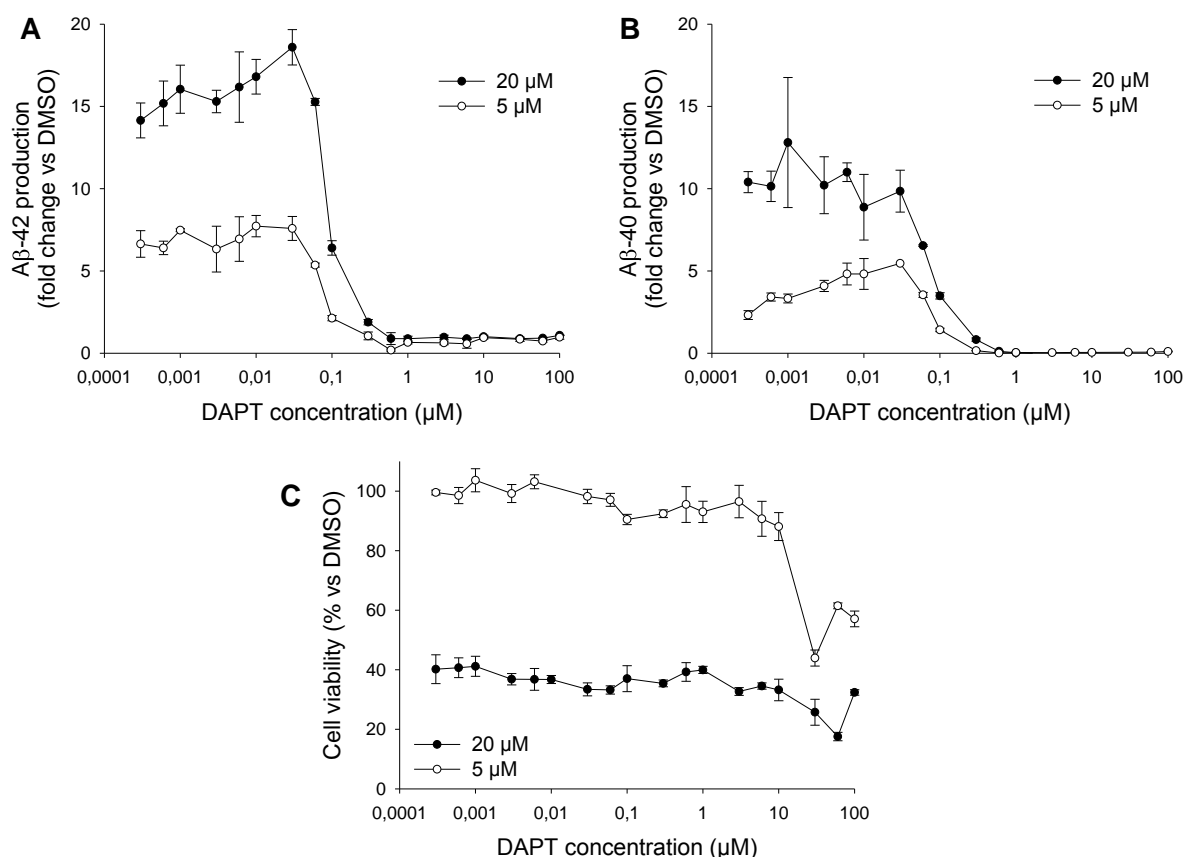


Figure 19 : L'inhibiteur de γ -sécrétase, DAPT, contrebalance l'effet du fipronil sulfone sur la production de peptides A β . Les cellules N2aAPP₆₉₅ ont été traitées pendant 1h avec des doses croissantes de DAPT, puis 5 ou 20 μ M de fipronil sulfone ont été ajoutés pour 18h d'incubation supplémentaires. La quantité de peptides A β 42 et A β 40 a été mesurée par un test ELISA (A et B), et la viabilité cellulaire a été contrôlée par un test MTS (C).

Afin d'en apprendre davantage sur la relation entre le fipronil sulfone et la γ -sécrétase, nous avons comparé les protéines up/down régulées et up/down phosphorylées par le fipronil sulfone en présence de DAPT (schémas en annexe 5). La comparaison « *FipS* vs *DMSO* » représentent les protéines modifiées par le fipronil sulfone, la comparaison « *DAPT FipS* vs *DAPT* » celles insensibles au DAPT et la comparaison « *DAPT FipS* vs *FipS* » celles sensibles au DAPT, et donc a priori dépendantes de la γ -sécrétase. Les listes des protéines up/down phosphorylées par le fipronil sulfone, dépendantes ou indépendantes de la γ -sécrétase, sont présentées en annexes 6 et 7, respectivement. Parmi les protéines sélectionnées au cours de cette étude protéomique et phosphoprotéomique, CDK1 et la vimentine ont attirés notre attention malgré leur absence d'interaction présumée avec la γ -sécrétase. Ces deux protéines, respectivement impliquées dans le cycle cellulaire et la croissance des projections neuronales, pourraient avoir des rôles importants dans les processus

menant à la MA. En outre, des études ont déjà démontré l'effet du fipronil sur la vimentine, induisant l'altération des modifications post-traductionnelles et la mis-localisation de cette dernière.³³³ Du côté des protéines identifiées comme dépendantes de la γ -sécrétase, beaucoup d'entre elles sont encore très peu décrites. Cette analyse protéomique et phosphoprotéomique a donc besoin d'être approfondie, ainsi des mécanismes intéressants menant à la MA pourraient être découverts.

2. Article : « Induction of amyloid- β 42 production by fipronil and other pyrazole insecticides. »

L'étude des pyrazoles, et principalement du fipronil et de certains de ses dérivés, a donné lieu à la rédaction d'un article, soumis le 23 septembre 2017 à « Journal of Alzheimer's Disease ».

Submitted September 23, 2017

Induction of amyloid- β ₄₂ production by fipronil and other pyrazole insecticides

Morgane CAM^{*a}, Emilie DURIEU^{*a}, Marion BODIN^a, Antigoni MANOUSOPOULOU^b, Natalia VASYLIEVA^c, Bogdan BARNYCH^c, Bruce D. HAMMOCK^c, Rebecca L. McMAHEN^d, Mark J. STRYNAR^d, Bettina BOHL^e, Philipp KOCH^e, Chiori OMORI^{f,g}, Kazuo YAMAMOTO^g, Saori HATA^f, Toshiharu SUZUKI^f, Frank KARG^h, Patrick GIZZIⁱ, Vesna ERAKOVIC-HABER^j, Vlatka Bencetic MIHALJEVIC^j, Branka TAVCAR^j, Erik PORTELIUS^k, Josef PANNEE^{k,l}, Kaj BLENNOW^{k,l}, Henrik ZETTERBERG^{k,l,m,n}, Spiros D. GARBIS^b, Hermeto GERBER^{o,p,q}, Jeremy FRAERING^{o,p}, Patrick C. FRAERING^p and Laurent MEIJER^{#a}

^a ManRos Therapeutics, Centre de Perharidy, 29680 Roscoff, Bretagne, France.

^b Faculty of Medicine, Cancer Sciences & Clinical and Experimental Medicine, University of Southampton, Southampton, SO17 1BJ, UK.

^c Department of Entomology & Nematology and UCD Comprehensive Cancer Center, University of California, Davis, CA 95616, USA

^d United States EPA, National Exposure Research Laboratory, 109 TW Alexander Dr., Durham, NC 27705, USA

^e Institute of Reconstructive Neurobiology, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany.

^f Laboratory of Neuroscience, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo 060-0812, Japan.

^g Department of Integrated Bioscience, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Kashiwa 277-8562, Japan

^h HPC INTERNATIONAL SAS and Atlantis Développement SAS, Noyal-Châtillon sur Seiche, 35230 Saint-Erblon, France.

ⁱ Plate-forme TechMedILL, UMR 7242, ESBS - Pôle API, 300 Boulevard Sébastien Brant, BP 10413, 67412 Illkirch cedex, France.

^j Fidelita d.o.o., Pharmacology and Toxicology, Prilaz baruna Filipovica 29, Zagreb, HR-10000, Croatia.

^k Clinical Neurochemical Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, SE-43180 Mölndal, Sweden.

^l Department of Psychiatry and Neurochemistry, Institute of Neuroscience & Physiology, University of Gothenburg, SE-43180 Mölndal, Sweden.

^m Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London WC1N 3BG, United Kingdom.

ⁿ UK Dementia Research Institute, London WC1N 3BG, United Kingdom

^o Foundation Eclosion, 1228 Plan-Les-Ouates, Switzerland.

^p Campus Biotech Innovation Park, 1202 Geneva, Switzerland.

^q Department of Biology, University of Fribourg, 1700 Fribourg, Switzerland.

Running title: A β ₄₂ inducers in the human chemical exposome

* Equal contribution of the two first two authors

[#] **Correspondence to** Laurent Meijer, ManRos Therapeutics, 29680 Roscoff, France. Tel.: +33.6.08.60.58.34; E-mail: meijer@manros-therapeutics.com

Key words: Alzheimer's disease, amyloid precursor protein, aftins, triazines, pyrazoles, phenylpyrazoles, pesticides, fipronil, Amyloid β , A β ₃₈, A β ₄₀, A β ₄₂, A β ₄₃, A β ₄₂/A β ₄₀ ratio, γ -secretase, prevention, human chemical exposome, alzheimerogen.

ABSTRACT

Generation of amyloid β peptides (A β s) by proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (A β PP), especially increased production of A β ₄₂/A β ₄₃ over A β ₄₀, and their aggregation as oligomers and plaques, represent a characteristic feature of Alzheimer's disease (AD). In familial AD (FAD), altered A β production originates from specific mutations of A β PP or presenilins 1/2, the catalytic subunits of γ -secretase. In sporadic AD, the origin of altered production of A β s remains unknown. We hypothesize that the 'human chemical exposome' contains products able to favor the production of A β ₄₂/A β ₄₃ over A β ₄₀ and shorter A β s. To detect such products we screened a library of 3500+ compounds in a cell-based assay for enhanced A β ₄₂/A β ₄₃ production. Nine pyrazole insecticides were found to induce a β - and γ -secretase-dependent, 3-10 fold increase in the production of extracellular A β ₄₂ in various cell lines and neurons differentiated from induced pluripotent stem cells derived from healthy and FAD patients. Immunoprecipitation/mass spectrometry analyses showed increased production of A β s cleaved at positions 42/43, and reduced production of peptides cleaved at positions 38 and shorter. Strongly supporting a direct effect on γ -secretase activity, pyrazoles shifted the cleavage pattern of another γ -secretase substrate, alcadein α , and shifted the cleavage of A β PP by highly purified γ -secretase towards A β ₄₂/A β ₄₃. Focusing on fipronil, we showed that some of its metabolites, in particular the persistent fipronil sulfone, also favor the production of A β ₄₂/A β ₄₃ in both cell-based and cell-free systems. Fipronil administered orally to mice and rats is known to be metabolized rapidly, mostly to fipronil sulfone, which stably accumulates in adipose tissue and brain. In conclusion, several widely used pyrazole insecticides enhance the production of toxic, aggregation prone A β ₄₂/A β ₄₃ peptides, suggesting the possible existence of environmental "Alzheimerogens" which may contribute to the initiation and propagation of the amyloidogenic process in sporadic AD.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a major disease in countries with aging populations. Despite unresolved questions on the initial causes of AD and numerous clinical trial failures in recent years, the lack of satisfactory treatments and the extremely high prevalence of AD calls for fundamental research to determine its underlying molecular and cellular causes and mechanisms and for applied research to identify options for prevention, therapeutic targets and disease-modifying drug candidates [reviews in 1-4].

Although the aggregation of specific forms of amyloid β peptides (A β s) into soluble oligomers is undoubtedly associated with the onset of AD, the upstream etiological events underlying this pathological process remain unclear, including whether there is an absolute, or relative, increase in the production of longer aggregation-prone A β species. A β s are derived from the successive action of two proteases, β -secretase and γ -secretase on one of their numerous substrates, the transmembrane Amyloid precursor protein (A β PP). According to its cleavage site γ -secretase liberates A β s of different sizes. While A β 40 is considered as the main physiological product, the appearance of A β 42 and A β 43, or increase of the A β 42-A β 43/A β 40 ratio is clearly associated with the onset of AD [5-7]. These longer A β s show an increased propensity to form oligomers, which can assemble into large extracellular deposits, the amyloid plaques, a characteristic feature of AD. A β 42/A β 43 oligomers are now considered as the toxic, AD initiating elements rather than the more prominent plaques initially discovered by Aloïs Alzheimer. This 'amyloid cascade theory' is further supported by the identification of the genetic causes of early onset familial AD (FAD). These rare forms of AD (less than 1% of all AD cases) are indeed all associated with specific mutations of either *A β PP* or *PS1* or *PS2* genes (the latter encodes for the catalytic subunits of the γ -secretase complex) [review in 8, 9]. In addition, a specific, protective mutation of A β PP was recently found to be associated with reduced risk for developing AD [10]. Furthermore, animal models that express mutated forms of A β PP and/or PS1, or human A β 42/A β 43, develop molecular, cellular and cognitive deficits reminiscent of AD [6, review in 11, 12]. Yet, the level of the different forms of A β s is not well correlated with cognitive deficits in mice, suggesting that A β s may represent markers rather than inducers of AD in these models [13]. An altered processing of γ -secretase substrates other than A β PP might also be important in the pathogenesis of AD. Although FAD is clearly a consequence of genetic mutations of genes encoding the proteins responsible for the production of A β s, the initial trigger(s) of late-onset,

sporadic AD (>99% of AD cases) remain unknown, despite extensive genome-wide association studies (GWAS) and the identification of various risk factors [review in 14].

Environmental neurotoxic agents including pesticides, organic solvents, metals and some natural toxins (cyanobacteria) are likely sources of AD-inducing factors [reviews in 15-25]. According to the US Environmental Protection Agency (EPA) Toxic Substances Control Act, over 84,000 chemicals are manufactured or imported at levels >10 tons per year, not including pesticides, cosmetics, food stuffs and food additives which are covered by other legislations (www.epa.gov). It is estimated that we are exposed to over 85,000 substances which, along with all natural substances to which we are exposed from conception to death, constitute the ‘human chemical exposome’ (HCE) [26-34]. In search for such potential “Alzheimerogens” (named by analogy with carcinogens), and encouraged by the discovery of Aftins (**A**myloid β **F**orty-**T**wo **I**nducers) [35-37], a class of synthetic compounds which specifically induce the production of A β ₄₂, we have started to assemble and screen a library of compounds belonging to the HCE for A β ₄₂-inducing products. Our first study identified some triazine herbicides as products stimulating the production of A β ₄₂/A β ₄₃ in numerous cell lines [38].

In this new study, we show that several members of the pyrazole class of insecticides, exemplified by fipronil, also increase the γ -secretase-dependent production of A β ₄₂/A β ₄₃ peptides in various cell lines and in a cell-free system with highly purified γ -secretase. Interestingly fipronil is metabolized to fipronil sulfone, a very persistent product that accumulates in adipose tissue and brain. These results show that the HCE contains various brain permeable products able to induce the production of pathogenic A β s. If long exposures occur in real life and if accumulation of A β ₄₂/A β ₄₃ is sufficient to trigger neurodegeneration/neuroinflammation, such products may contribute to the initiation, development and acceleration of sporadic AD and thus be collectively qualified as potential “Alzheimerogens”. Some of them might also be used to develop useful chemically-induced animal models of AD.

MATERIAL AND METHODS

Material and methods are described in full in the SI section. They include: 1. Pyrazoles and other reagents. 2. Cell cultures: cell lines, iPSCs-derived neurons & HEK293-alcadeina cells. 3. Purified γ -secretase preparation. 4. A β cell-based and cell-free assays. 5. Cell viability. 6. Pharmacokinetics studies. 7. Proteomics study.

RESULTS

Screening HCE compounds reveals pyrazole insecticides as A β ₄₂ inducers

We first screened a library of over 3500 low molecular weight compounds representative of the HCE for their ability to induce the production and secretion of A β ₄₂ by N2a cells stably expressing A β PP695 (N2a-A β PP695). An MTS-based cell viability assay was run in parallel to assess cell survival. Although the vast majority of compounds were unable to induce A β ₄₂ production, a few active products including several triazine herbicides [38] and pyrazole insecticides (this article) were identified. We next assembled a small library of 18 pyrazoles (**1-18**, SI, Table S1) that we further tested, along with aftin-5 (**19**) as a positive control, for their ability to trigger A β ₄₂ production at 5, 10, 25 or 50 μ M, in both N2a and CHO cells stably expressing A β PP695 and A β PP751, respectively (SI, Table S1) (Fig. 1). Nine pyrazoles were found to induce more than a 3-fold change in A β ₄₂ levels, showing that A β ₄₂ induction is an intrinsic property of some, but not all, pyrazoles: fenpyroximate (**2**), tebufenpyrad (**3**), bixafen (**4**), fluxapyroxad (**5**), isopyrazam (**6**), penthiopyrad (**8**), chlorantraniliprole (**14**), tolfenpyrad (**16**) and fipronil (**18**) (Fig. 1, 2). We next focused on fipronil (**18**), a widely produced insecticide used to treat crops and pet parasites [reviews in 39-44], and we assembled a small library of fipronil analogues and metabolites (Fig. 3) that were tested for their A β ₄₂ production ability in N2a-A β PP695 cells (SI, Table S2). The two fipronil enantiomers (**18a**, **18b**) were separated by SFC chiral chromatography (Regis Whelk O1 SS column) and found to be roughly equipotent. Interestingly the main metabolites of fipronil (**18**) [45], fipronil sulfone (**20**), fipronil desulfinyl (**21**) and fipronil sulfide (**22**) displayed A β ₄₂ inducing activity equivalent or close to that of the parent compound. In contrast, a few other environmental metabolites such as fipronil chloramine (**24**) [46] and hydroxy-fipronil (**25**) [47] were found to be inactive (SI, Table S2).

A β ₄₂ production triggered by pyrazoles in N2a-APP695 cells requires β - and γ -secretase activity as demonstrated by the fact that it was strongly inhibited by β - (inhibitor IV) and γ -secretases (BMS 299897, DAPT) inhibitors and by a γ -secretase modulator ('Torrey Pines' compound, inducing an increase in A β ₃₈ and a decrease in A β ₄₂ and A β ₄₀) [48, 49] (Fig. 4). A β ₃₈ production was also strongly reduced, while A β ₄₀ levels were only modestly affected as measured by ELISA (data not shown) and by mass spectrometry (Fig. 5). Increased A β ₄₂ production triggered by pyrazoles was further confirmed in HEK293 cells stably expressing A β PPsw (data not shown) and neurons derived from human iPSCs (see below).

Mass spectrometric quantification and profile analysis of pyrazole-induced A β s

A β ₃₈, A β ₄₀ and A β ₄₂ were quantified in N2a-A β PP695 cell culture supernatants using LC-MS/MS [50, 51]. Like Aftins [35, 36] and triazines [38], pyrazoles induced a reduction in A β ₃₈ levels, a slight increase in A β ₄₀ levels and a strong increase in A β ₄₂ levels (Fig. 5).

We next analyzed, by IP-MS [52], the profile of A β s produced by N2a-A β PP695 exposed to fipronil (**18**), fipronil sulfone (**20**) and fipronil desulfinyl (**21**) (Fig. 6). Cell supernatants were collected and A β s were immunoprecipitated and analyzed using MALDI-TOF/TOF [52] (Fig. 6). Exposure to pyrazoles decreased the production of A β ₁₋₁₈, A β ₁₋₁₉, A β ₁₋₃₃, A β ₁₋₃₇ and A β ₁₋₃₈. A β ₁₋₄₀ levels showed a modest increase. In contrast, the two highly neurotoxic [6, 7, 53-55] amyloid peptides A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₃, which were undetectable in supernatants of control cells, were strongly induced in cells treated with fipronil (**18**) and its two metabolites.

Neurons differentiated from human iPSCs of AD patient and healthy control

We next tested the effects of the active pyrazoles and aftin-5 on neurons differentiated for 4 weeks from human iPSCs derived from a healthy individual (A β PP WT, wild-type) or from a patient with familial AD (A β PP K724N mutation) [56-58] (Fig. 7). A β PP K724N neurons produced more A β ₄₂ versus A β ₄₀ compared to A β PP WT neurons. As observed with triazines [38], addition of any of the active pyrazoles or aftin-5 resulted in further increase in A β ₄₂ production, in both A β PP WT and A β PP K724N neurons (Fig. 7).

Pyrazoles affect the specificity of APP-C99 cleavage and A β production in a cell-free γ -secretase activity assay

In order to assess whether the pyrazole-based compounds modulate A β production through a direct effect on the specific processing of APP-C99 by the γ -secretase complex, we tested fipronil (**18**), fipronil sulfone (**20**) and fipronil desulfinyl (**21**) in a previously described cell-free activity assay performed with highly purified γ -secretase protease and APP-C99 substrate (a recombinant APP C-terminal fragment expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein consisting of a N-terminal Met for translation initiation, amino acids 597- 695 of the 695-amino acid human isoform of APP, and a C-terminal Flag tag sequence) [59, 60]. More specifically, A β s generated by purified γ -secretase in the presence of 100 μ M of the pyrazole compounds were analyzed by immunoprecipitation and MALDI-TOF (IP/MS), as previously described [60]. We found that all three pyrazole compounds increased the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio

when compared to the DMSO control (Fig. 8). Importantly, our analysis further revealed that fipronil sulfone (**20**), but not fipronil (**18**) or fipronil desulfinyl (**21**), drastically increased the A β ₄₃/A β ₄₀ ratio by ~2-fold when compared to the DMSO control (Fig. 8). These results strongly support the increased A β ₄₃ production seen exclusively with fipronil sulfone (**20**) in N2a-A β PP695 cells (Fig. 6). Altogether, we found that pyrazoles favor the production of the toxic A β ₄₂ and/or A β ₄₃ peptides, both of which contribute to the formation of amyloid plaques and the development of AD.

Pyrazoles shift the cleavage pattern of another γ -secretase substrate, alcadein

Like A β PP, alcadeins are sequentially cleaved by secretases, first by α -secretase, leading to N- and C-terminal fragments, the latter being then cleaved by γ -secretase to an intracellular domain and the p3-Alc peptide, in a way similar to A β PP [61, 62] (see Fig. 6A in Ref. 38]. HEK293 cells stably expressing full length alcadein α were used to investigate the effects of pyrazoles on alcadein cleavage. Alcadein α is first cleaved on the N-terminal side (two possible sites) followed by cleavage by γ -secretase leading to p3-Alc α 35 and p3-Alc α 2N+35, the latter representing the major peptide in cultured cells. HEK293-alcadein α cells were grown till 70% confluence and treated with 100 μ M pyrazoles for 48 h. The secreted p3-Alc α peptides were recovered by immunoprecipitation and analyzed by MALDI TOF/MS (Fig. 9A). Quantification of p3-Alc α peptides showed that, compared to the p3-Alc α peptide profile in vehicle treated cells, concentrations of the main alcadein α peptide (p3-Alc α 2N+35) and p3-Alc α 2N+37 peptide remained stable. In contrast, both p3-Alc α 2N+34 and p3-Alc α 2N+36 concentrations dropped significantly while the level of p3-Alc α 2N+38 peptide concentration strongly increased (Fig. 9B). These results show that, like for A β PP, pyrazoles induce a shift in the cleavage pattern of Alcadein α , another γ -secretase substrate. Similar effects were seen previously with aftin-5 and triazines [38]. These observations further suggest that pyrazoles are more likely to interact with γ -secretase rather than with their substrates.

Proteomics study of fipronil's effects

In order to understand the molecular mechanisms of action of pyrazoles, we exposed N2a-A β PP cells for 18 h to 20 μ M fipronil sulfone (**20**), 100 μ M dipropetryn or 0.1% DMSO (control) and processed cells for proteomics analysis. Cell supernatant A β ₄₂ levels were as expected (data not shown). A total of 8,027 proteins were identified in the multiplex experiment (data not shown). The expression of 1634 and 1638 proteins was modified,

respectively, in fipronil sulfone (**20**)- and dipropetryn-treated cells compared to control, DMSO-treated cells (Fig. 10A). Among these, 261 proteins were shared by both products-treated cells, out of which 178 were up-regulated or down-regulated in the same direction for both products (SI, Table S4). DAVID analysis of these 178 proteins showed that they gather in mitochondrial pathways, cell cycle control, AD (Fig. 10B)

Fipronil is metabolized to fipronil sulfone, a stable metabolite which accumulates in adipose tissue and brain

We next investigated the pharmacokinetics and biodistribution of fipronil (**18**) and its metabolites in mice (Fig. 11) and rats (SI, Fig. S2). Mice first received a single oral dose of fipronil (**18**) and blood, brain and adipose tissue were collected at various times during 72 h (Fig. 11). Plasma pharmacokinetics showed rapid elimination of fipronil (**18**) and parallel appearance of fipronil sulfone (**20**) which remained stable during the 72 h time-course (SI, Fig. S1). No fipronil desulfinyl (**21**) was detected. Similarly, fipronil (**18**) transiently appeared in brain and adipose tissues, while fipronil sulfone (**20**) accumulated to a stable level in both tissues (Fig. 11A, 11B). Fipronil sulfone (**20**) reached a 5-6 fold higher concentration in adipose tissue compared to brain. Given the metabolic stability of fipronil sulfone (**20**) we next ran a two months duration study following a single oral administration of fipronil (**18**) (Fig. 12A). Fipronil sulfone (**20**) levels were determined at various times up to 56 days after the treatment. The half-life of fipronil sulfone (**20**) was found to be 14 ± 3 days, 17 ± 2 days and 26 ± 3 days in plasma, brain and adipose tissue, respectively (Fig. 11A). We next administered fipronil (**18**) daily, 5 days/week for 3 weeks and measured fipronil sulfone (**20**) in plasma, brain and adipose tissue (Fig. 12B). This repeated oral dosing allowed the maintenance of a stable level of fipronil sulfone (**20**) in plasma, brain and adipose tissue (Fig. 12B). Pharmacokinetics and biodistribution of fipronil (**18**) and fipronil sulfone (**20**) were next studied in rats during a 14 days period, following a single oral administration. Results confirmed rapid metabolism of fipronil (**18**) into fipronil sulfone (**20**) (SI, Fig. S2A). Fipronil sulfone (**20**) was much more stable and showed extensive accumulation in adipose tissue (peak concentration 48 h after oral administration of fipronil (**18**)) followed by slow release and/or metabolism (SI, Fig. S2B).

DISCUSSION

This study reports on the induction of A β ₄₂/A β ₄₃ production, and the increased ratio of long vs. short A β s, in various cell cultures and by highly purified γ -secretase following exposure to several pyrazole insecticides. These results support previous results obtained with various drugs (fenofibrate, celecoxib, indomethacin, isoprenoids) [63], DAPT under certain conditions [64, 65], steroids [66], ceramide analogs [67], the peroxynitrite donor SIN-1 [68], Zinc [60], aftins [35-37] and several triazine herbicides [38]. Altogether these results have two main implications:

(1) they support the idea that the HCE contains several compounds able to shift the cleavage of A β PP towards the production of long, toxic, aggregation-prone A β s, such as A β ₄₂/A β ₄₃, those which are classically associated with AD in humans and numerous animal models of AD. These compounds, if proven to modify this balance in animals (as suggested by the first preliminary results obtained with aftin-4 [28] and celecoxib or FT-1 [63]) and in human, may contribute to the onset, development or acceleration of AD. We suggest that they be collectively named “Alzheimerogens”, by analogy with cancer-inducing carcinogens. Identification of such compounds in our environment appears to be a prevention priority.

(2) some of these compounds, particularly the metabolically stable, brain-permeable molecules, constitute new pharmacological research tools to investigate the role of γ -secretase, its substrates and products, in the onset of AD, in cell lines and animal models. In this context, one of our objectives is to develop a chemically-induced animal model of AD, which would allow the study of AD onset in wild-type (WT) animals. This is exemplified by the orally available fipronil (**18**) which is rapidly metabolized to fipronil sulfone (**20**), an extremely stable compound which accumulates in adipose tissue, crosses the blood brain barrier and reaches stable levels in the brain (Fig. 11, 12; SI, Fig. S2). We are currently running long-term exposure experiments with fipronil (**18**) administered orally in WT and Tg2576 mice.

Mechanism of action of fipronil and other pyrazoles

As also observed with aftins [36] and triazines [38], pyrazoles insecticides, including fipronil derivatives, show a clear structure/activity relationship in their effects on A β production: some are active, others are inactive. Unspecific, detergent, hydrophobic, membrane or protein structure disrupting actions are unlikely to account for the effects of pyrazoles. Several arguments support an effect on γ -secretase and/or its micro-environment:

- (1) induction of A β production by pyrazoles is inhibited by γ -secretase inhibitors or modulators (Fig. 4),
- (2) pyrazoles also affect the cleavage of another substrate of γ -secretase, alcadeins (Fig. 10),
- (3) pyrazoles modify the cleavage pattern of A β PP by highly purified γ -secretase.

Our cell-free γ -secretase activity assays performed with highly purified enzyme and substrate (Fig. 8) show that fipronil (**18**), Fipronil sulfone (**20**) and fipronil desulfinyl (**21**) clearly increased the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio. Remarkably, Fipronil sulfone (**20**) additionally increased by ~2-fold the A β ₄₃/A β ₄₀ ratio. At the molecular level, the γ -secretase complex cleaves the APP-C99 substrate within the transmembrane domain (TMD), first at the ϵ -site located at the intracellular interface, to generate two different C-terminal APP intracellular domains (AICDs) of 50 or 51 aa length [69]. To generate A β s of different lengths, γ -secretase next cleaves the N-terminus of the TMD every α -helical turn (corresponding to 3-4 amino acids), starting from ϵ -sites, following two production lines: the AICD51/A β ₄₈ pathway (A β ₄₈ \Rightarrow A β ₄₅ \Rightarrow A β ₄₂ \Rightarrow A β ₃₈) and the AICD50/A β ₄₉ pathway (A β ₄₉ \Rightarrow A β ₄₆ \Rightarrow A β ₄₃ \Rightarrow A β ₄₀) [69]. Consistent with a direct effect of pyrazoles on APP-C99 processing, our results support an altered A β ₄₈ pathway leading to an increased A β ₄₂ production. Surprisingly, our study further revealed that fipronil sulfone (**20**) unambiguously and drastically increases the A β ₄₃/A β ₄₀ ratio (Fig. 8). This observation is important since A β ₄₃ is known to be highly amyloidogenic and a main species involved in the formation of senile plaques [6, 7, 70]. As of today, A β ₄₃ is known to be a direct precursor of A β ₄₀ [69]. Therefore, the increased A β ₄₃ production in the cell-free assay suggests that fipronil sulfone (**20**) blocks the processing of APP-C99 at position 43 in the A β ₄₉ pathway, an event which is likely associated with reduced A β ₄₀ production.

Further quantitative experiments are required to explain the increased A β ₄₂/A β ₄₀ or A β ₄₃/A β ₄₀ ratios, caused either by increased A β ₄₂ or A β ₄₃ production, a reduced A β ₄₀ production or both. In any case, an altered A β profile in the presence of pyrazole insecticides strongly suggests that the compounds directly affect the positioning of the A β PP substrate in the lipid-bilayer, as previously observed for compounds known as inverse γ -secretase modulators (iGSM) [64]. Similarly to what we observed with fipronil (**18**) and fipronil desulfinyl (**21**), the iGSM nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) Fenofibrate and Celecoxib have indeed been reported to be A β ₄₂-raising and A β ₃₈-lowering compounds [63]. Interestingly, Celecoxib is a pyrazole. The pyrazole scaffold has in fact been used extensively in therapeutic drug development [review in 71]. In contrast to iGSMs, some NSAID-based γ -secretase modulators (GSM), including sulindac-sulfide, lower A β ₄₂ and increase A β ₃₈

productions [63]. GSMs are of great pharmaceutical interest and are currently under clinical evaluation for their ability to reduce the production of the amyloidogenic A β ₄₂ and A β ₄₃ peptides. At the same time the potential risk from A β ₄₂ and A β ₄₃ producing iGSMs needs careful evaluation as some of these compounds are FDA-approved and widely used as NSAIDs. At the molecular level, it has further been shown that residues 29–36 (GAIIGLMV) of the A β motif in APP-C99 located at the TMD N-terminus represent the binding site of both A β ₄₂-lowering GSMs and A β ₄₂-raising GSMs [63]. This raises the question whether the same binding site could be involved in the pyrazole-induced A β ₄₂/A β ₄₀ and A β ₄₃/A β ₄₀ ratio increase. Interestingly, we recently found that zinc can drastically raise the A β ₄₃/A β ₄₀ ratio by influencing the positioning of the APP-C99 TMD through binding to Lysine 28, which is located at the surface of the membrane and is involved in anchoring APP-C99 in the lipid bilayer [69]. This observation further supports the possibility that Lys28 and more globally residues 29–36 in APP-C99 are involved into the pyrazole-induced A β ₄₃/A β ₄₀ increase. Finally, novel GSMs have recently been reported that directly bind on PS1 [72]. Binding of these compounds to PS1 induced a conformational change in the enzyme-substrate interaction that modulated the protease activity and consequently the A β profile. Thus, one cannot exclude that fipronil (**18**), fipronil sulfone (**20**) or fipronil desulfinyl (**21**) also modulate APP-processing by directly binding to the γ -secretase complex. Further experiments are needed to decipher the mode of action of these compounds (see SI, Fig. S3 for working model).

Fipronil exposure and consequences

Fipronil has been developed a selective inhibitor of insect GABA-gated chloride channels [review in 44]. It is one of the most widely used pyrazole insecticides in agriculture (seed, culture & crop treatment), in urban pest control (coackroaches, termites, wasps, flies & ants management in & around buildings) and in veterinary applications (fleas & ticks control for pets and cattle). Fipronil and its metabolites are therefore widely found [73] in urban soil, dust, wastewater and residential runoff [74], in rural soil, rivers and atmosphere [46, 73, 75, 76], but also in various tissues of pet, farmland and wild-life animals [75, 77, 78] (only a very small number of references are cited). Although fipronil (**18**) is relatively resistant to degradation, it is mostly oxidized to fipronil sulfone (**20**), reduced to fipronil sulfide (**22**), photodegraded to fipronil desulfinyl (**21**), hydrolyzed to fipronil amide (**23**, **28**). Many other metabolites have been described [45-47, 73, review in 39]. Although fipronil shows low affinity for mammalian GABA-gated chloride channels compared to those of insects, toxicity studies carried out with fipronil and its metabolites in various vertebrates [39, 40, 43, 44, 77]

as well as studies performed with mammalian cells studies [79-83] cast some doubts about the safety of fipronil to humans. This concern is amplified by (1) the existence of numerous metabolites which are poorly characterized in terms of toxicity, (2) their long persistence in the environment (soil, water, sediment and atmosphere), (3) their accumulation in tissues, especially adipose tissue (Fig. 11, 12), (4) the potency of fipronil sulfone on mammalian GABA-receptor [84], (5) the fact that fipronil and its metabolites essentially meet all criteria of Lipinski's rule of Five (Supplementary Table S5). In addition, fipronil (along with neonicotinoids) is a major worldwide concern for the survival of pollinators [85-88]. In mammals, fipronil shows oxidative stress, neurotoxic, thyroid, endocrine, lung inflammation, blood pressure and reproductive effects [review in 44] at high doses. In humans, fipronil triggers mild nervous troubles as seen in acute intoxication cases [89, 90] and apparently impacted thyroid functions of workers following occupational exposure [91].

As shown in Fig. 11 & 12, fipronil is rapidly metabolized to a very stable product, fipronil sulfone, which readily accumulates in fat tissue. 72 h after a single oral administration of ¹⁴C-fipronil to rats, about 50% and 2% of the radioactivity (essentially fipronil sulfone) were found in adipose tissue and brain, respectively [93]. Fipronil sulfone is also the primary metabolite produced in human via hepatocyte cytochrome P-450 oxydation [89, 91, 93]. Fipronil sulfone was detected in about 25% of 96 human serum samples (0.1-39 ng/mL which corresponds to 0.22-86 nM) [45]. These samples were obtained from individuals with no known fipronil exposure. However fipronil applied to the fur of pets is easily and rapidly transferred to humans [94, 95]. Fipronil and fipronil sulfone levels were measured in urine and blood samples of 159 workers in a factory manufacturing fipronil-containing veterinary products [91]: 33 and 155 had detectable serum fipronil and fipronil sulfone (0.37-42.45 ng/mL, i.e. 0.82-9.32 nM), respectively. Incidentally, fipronil has recently been shown to promote adipogenesis [96] and adiposity/obesity has been suggested as a risk factor for AD [97, 98]. Adipose tissue may thus act as a trap and storage tissue for lipophilic, A β ₄₂/A β ₄₃ inducers like fipronil, other pyrazoles, other pesticides. The persistence of fipronil sulfone, its accumulation in adipose tissue, and its ability to enter the brain raises concerns on its possible long term effects on the central nervous system, in particular on its possible effects on the production of toxic, aggregation-prone amyloidogenic A β ₄₂ and A β ₄₃, as shown in this article.

In conclusion, we have added some pyrazole insecticides, especially the main metabolite of fipronil, in the growing list of HCE products which are able to alter the specificity of A β production. Our hypothesis is that these products may on a long-term, cumulative and additive basis, possibly in parallel with microorganisms [99], alter the A β

production pattern sufficiently to lead to AD pathogenesis, and thus qualify as “Alzheimerogens”. Gradual accumulation in and chronic release from adipose tissue and transfer to the brain may contribute to the onset, development and acceleration of sporadic AD.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Laetitia BAILLY (Laboratoire Cobra, University of Rouen) for purifying the two fipronil enantiomers. We are grateful to Jasna PADOVAN and Zeljko JAVORSCAK (Fidelta) for the rat PK studies. This work was supported by ‘Fonds Unique Interministériel’ PHARMASEA/TRIAD projects, « Agence nationale de sécurité sanitaire, de l’alimentation, de l’environnement et du travail » (ANSES), Fondation “Jérôme Lejeune” and CRITT-Santé Bretagne /FEDER (LM). This research was also partly supported by an FP7-KBBE-2012 grant (BlueGenics) to LM. MC is CIFRE/ManRos Therapeutics PhD fellowship recipient. KB is a Torsten Söderberg Professor. HZ is a Wallenberg Academy Fellow. This work was supported in part by Grant-in-aid for Scientific Research 26293010 (TS) and 24790062 (SH) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan. HG, JF and PCF were supported by the Fondation Eclosion. Partial support was provided by NIEH S/ROI ES002710, NIEH S Superfund Research Program P42 ES004699 and NIH/454 NS079202.

SUPPLEMENTARY INFORMATION contains a supplementary material & methods, 3 supplementary tables, 3 supplementary figures and supplementary references.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT. L. Meijer is one of the co-founders of ManRos Therapeutics. The authors declare that they have no competing interests. B.D. Hammock is a co-founder of Eicosis Human Health.

REFERENCES

- [1] Alzheimer's Association (2017) Alzheimer's disease facts and figures. (2017) *Alzheimers Dement* **13**, 325-373.
- [2] Huang Y, Mucke L (2012) Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* **148**, 1204-1222.
- [3] Vinters HV (2015) Emerging concepts in Alzheimer's disease. *Annu Rev Pathol* **10**, 291-319.
- [4] Canter RG, Penney J, Tsai LH (2016) The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature* **539**, 187-196.
- [5] Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, Vandersteen A, Segers-Nolten I, Van Der Werf K, Subramaniam V, Braeken D, Callewaert G, Bartic C, D'Hooge R, Martins IC, Rousseau F, Schymkowitz J, De Strooper B (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β ₄₂ to A β ₄₀ ratio. *EMBO J* **29**, 3408-3420.
- [6] Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Sleegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC (2011) Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β ₄₃. *Nat Neurosci* **14**, 1023-1032.
- [7] Sandebring A, Welander H, Winblad B, Graff C, Tjernberg LO (2013) The pathogenic a β ₄₃ is enriched in familial and sporadic Alzheimer disease. *PLoS One* **8**, e55847.
- [8] Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, Salloway S, Sperling RA, Windisch M, Xiong C (2011) Autosomal-dominant Alzheimer's disease a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **3**, 1.
- [9] Gaiteri C, Mostafavi S, Honey CJ, De Jager PL, Bennett DA (2016) Genetic variants in Alzheimer disease - molecular and brain network approaches. *Nat Rev Neurol* **12**, 413-427.
- [10] Benilova I, Gallardo R, Ungureanu AA, Castillo Cano V, Snellinx A, Ramakers M, Bartic C, Rousseau F, Schymkowitz J, De Strooper B (2014) The Alzheimer disease protective mutation A2T modulates kinetic and thermodynamic properties of amyloid- β (A β) aggregation. *J Biol Chem* **289**, 30977-30989.

- [11] Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O (2015) Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **10**, 703-711.
- [12] Van Dam D, De Deyn PP (2017) Non human primate models for Alzheimer's disease-related research and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **12**, 187-200.
- [13] Foley AM, Ammar ZM, Lee RH, Mitchell CS (2015) Systematic review of the relationship between amyloid- β levels and measures of transgenic mouse cognitive deficit in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **44**, 787-795.
- [14] Cuyvers E, Sleegers K (2016) Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *Lancet Neurol* **15**, 857-868.
- [15] Grandjean P, Landrigan PJ (2006) Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* **368**, 2167-2178.
- [16] Grandjean P, Landrigan PJ (2014) Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol* **13**, 330-338.
- [17] Cannon JR, Greenamyre JT (2011) The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicol Sci* **124**, 225-250.
- [18] Grandjean P (2013) Only one chance. How environmental pollution impairs brain development - and how to protect the brains of the next generation. Oxford University Press, 212 pp.
- [19] Demeneix B (2014) Losing our minds. How environmental pollution impairs human intelligence and mental health. Oxford University Press, 284 pp.
- [20] Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B (2015) Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers Cell Neurosci* **9**, 124.
- [21] Yegambaram M, Manivannan B, Beach TG, Halden RU (2015) Role of environmental contaminants in the etiology of Alzheimer's disease: a review. *Curr Alzheimer Res* **12**, 116-146.
- [22] Nicolai V, Lucarelli M, Fusco A (2015) Environment, epigenetics and neurodegeneration: Focus on nutrition in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **68**, 8-12.
- [23] Killin LO, Starr JM, Shiue IJ, Russ TC (2016) Environmental risk factors for dementia: a systematic review. *BMC Geriatr* **16**, 175.
- [24] Pearson BL, Simon JM, McCoy ES, Salazar G, Fragola G, Zylka MJ (2016) Identification of chemicals that mimic transcriptional changes associated with autism, brain aging and neurodegeneration. *Nat Commun* **7**, 11173.

- [25] Pearson BL, Ehninger D (2017) Environmental chemicals and aging. *Curr Environ Health Rep* **4**, 38-43.
- [26] Wild CP (2012) The exposome from concept to utility. *Int J Epidemiol* **41**, 24-32.
- [27] Juarez PD, Matthews-Juarez P, Hood DB, Im W, Levine RS, Kilbourne BJ, Langston MA, Al-Hamdan MZ, Crosson WL, Estes MG, Estes SM, Agboto VK, Robinson P, Wilson S, Lichtveld MY (2014) The public health exposome a population-based, exposure science approach to health disparities research. *Int J Environ Res Public Health* **11**, 12866-12895.
- [28] Vrijheid M, Slama R, Robinson O, Chatzi L, Coen M, van den Hazel P, Thomsen C, Wright J, Athersuch TJ, Avellana N, Basagaña X, Brochot C, Bucchini L, Bustamante M, Carracedo A, Casas M, Estivill X, Fairley L, van Gent D, Gonzalez JR, Granum B, Gražulevičienė R, Gutzkow KB, Julvez J, Keun HC, Kogevinas M, McEachan RR, Meltzer HM, Sabidó E, Schwarze PE, Siroux V, Sunyer J, Want EJ, Zeman F, Nieuwenhuijsen MJ (2014) The human early-life exposome (HELIX), project rationale and design. *Environ Health Perspect* **122**, 535-544.
- [29] Wishart D, Arndt D, Pon A, Sajed T, Guo AC, Djoumbou Y, Knox C, Wilson M, Liang Y, Grant J, Liu Y, Goldansaz SA, Rappaport SM (2015) T3DB the toxic exposome database. *Nucleic Acids Res* **43**, D928-934.
- [30] Goldsmith MR, Grulke CM, Brooks RD, Transue TR, Tan YM, Frame A, Egeghy PP, Edwards R, Chang DT, Tornero-Velez R, Isaacs K, Wang A, Johnson J, Holm K, Reich M, Mitchell J, Vallero DA, Phillips L, Phillips M, Wambaugh JF, Judson RS, Buckley TJ, Dary CC (2014) Development of a consumer product ingredient database for chemical exposure screening and prioritization. *Food Chem Toxicol* **65**, 269-279.
- [31] Siroux V, Agier L, Slama R (2016) The exposome concept: a challenge and a potential driver for environmental health research. *Eur Respir Rev* **25**, 124-129.
- [32] Turner MC, Nieuwenhuijsen M, Anderson K, Balshaw D, Cui Y, Dunton G, Hoppin JA, Koutrakis P, Jerrett M (2017) Assessing the exposome with external measures: commentary on the state of the science and research recommendations. *Annu Rev Public Health* **38**, 215-239.
- [33] Buck Louis GM, Smarr MM, Patel CJ (2017) The exposome research paradigm: an opportunity to understand the environmental basis for human health and disease. *Curr Environ Health Rep* **4**, 89-98.
- [34] Escher BI, Hackermüller J, Polte T, Scholz S, Aigner A, Altenburger R, Böhme A, Bopp SK, Brack W, Busch W, Chadeau-Hyam M, Covaci A, Eisenträger A, Galligan JJ,

- Garcia-Reyero N, Hartung T, Hein M, Herberth G, Jahnke A, Kleinjans J, Klüver N, Krauss M, Lamoree M, Lehmann I, Luckenbach T, Miller GW, Müller A, Phillips DH, Reemtsma T, Rolle-Kampczyk U, Schüürmann G, Schwikowski B, Tan YM, Trump S, Walter-Rohde S, Wambaugh JF (2017) From the exposome to mechanistic understanding of chemical-induced adverse effects. *Environ Int* **99**, 97-106.
- [35] Bettayeb K, Oumata N, Zhang Y, Luo W, Bustos V, Galons H, Greengard P, Meijer L, Flajolet M (2012) Small molecule inducers of A β ₄₂ peptide production share a common mechanism of action. *FASEB J* **26**, 5115-5123.
- [36] Hochard A, Oumata N, Bettayeb K, Gloulou O, Fant X, Durieu E, Buron N, Porceddu M, Borgne-Sanchez A, Galons H, Flajolet M, Meijer L (2013) Aftins increase amyloid- β ₄₂, lower amyloid- β ₃₈ and do not alter amyloid- β ₄₀ in vitro production towards a chemical model of Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* **35**, 107-120.
- [37] Meunier J, Borjini N, Gillis C, Villard V, Maurice T (2015) Brain toxicity and inflammation induced in vivo in mice by the amyloid- β forty-two inducer aftin-4, a roscovitine derivative. *J Alzheimers Dis* **44**, 507-524.
- [38] Portelius E, Durieu E, Bodin M, Cam M, Pannee J, Leuxe C, Mabondzo A, Oumata N, Galons H, Lee J, Chang YT, Stüber K, Koch P, Fontaine G, Potier MC, Manousopoulou A, Garbis S, Covaci A, Van Dam D, De Deyn P, Karg F, Flajolet M, Omori C, Hata S, Suzuki T, Blennow K, Zetterberg H, Meijer L (2016) Specific triazine herbicides induce amyloid β 42 production. *J Alzheimers Dis* **54**, 1593-1605.
- [39] Tingle CC, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ (2003) Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol* **176**, 1-66.
- [40] Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke CH, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EA, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Stark JD, Tapparo A, Van Dyck H, Van Praagh J, Van der Sluijs JP, Whitehorn PR, Wiemers M (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**, 5-34.
- [41] Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EA, Noome DA, Simon-Delso N, Tapparo A (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**, 35-67.

- [42] Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD, Van der Sluijs JP, Van Dyck H, Wiemers M (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**, 68-102.
- [43] van der Sluijs JP, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bijleveld van Lexmond MF, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs CA, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EA, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD, Tapparo A, Van Dyck H, van Praagh J, Whitehorn PR, Wiemers M (2015) Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**, 148-54.
- [44] Wang X, Martínez MA, Wu Q, Ares I, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Yuan Z (2016) Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit Rev Toxicol* **46**, 876-899.
- [45] McMahan RL, Strynar MJ, Dagnino S, Herr DW, Moser VC, Garantziotis S, Andersen EM, Freeborn DL, McMillan L, Lindstrom AB (2015) Identification of fipronil metabolites by time-of-flight mass spectrometry for application in a human exposure study. *Environ Int* **78**, 16-23.
- [46] McMahan RL, Strynar MJ, McMillan L, DeRose E, Lindstrom AB (2016) Comparison of fipronil sources in North Carolina surface water and identification of a novel fipronil transformation product in recycled wastewater. *Sci Total Environ* **569-570**, 880-887.
- [47] Vasylieva N, Barnych B, Wan D, El-Sheikh EA, Nguyen HM, Wulff H, McMahan R, Strynar M, Gee SJ, Hammock BD (2017) Hydroxy-fipronil is a new urinary biomarker of exposure to fipronil. *Environ Int* **103**, 91-98.
- [48] Kounnas MZ, Danks AM, Cheng S, Tyree C, Ackerman E, Zhang X, Ahn K, Nguyen P, Comer D, Mao L, Yu C, Pleynt D, Digregorio PJ, Velicelebi G, Stauderman KA, Comer WT, Mobley WC, Li YM, Sisodia SS, Tanzi RE, Wagner SL (2010) Modulation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* **67**, 769-780.
- [49] Kretner B, Fukumori A, Gutsmedl A, Page RM, Luebbers T, Galley G, Baumann K, Haass C, Steiner H (2011) Attenuated Abeta42 responses to low potency gamma-secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds. *J Biol Chem* **286**, 15240-15251.

- [50] Leinenbach A., Pannee J, Dülffer T, Huber A, Bittner T, Andreasson U, Gobom J, Zetterberg H, Kobold U, Portelius E, Blennow K, IFCC Scientific Division Working Group on CSF proteins (2014) Mass spectrometry-based candidate reference measurement procedure for quantification of amyloid- β in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* **60**, 987-994.
- [51] Pannee J, Portelius E, Oppermann M, Atkins A, Hornshaw M, Zegers I, Höjrup P, Minthon L, Hansson O, Zetterberg H, Blennow K, Gobom J (2013) A selected reaction monitoring (SRM)-based method for absolute quantification of A β -38, A β -40, and A β 42 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients and healthy controls. *J Alzheimers Dis* **33**, 1021-1032.
- [52] Portelius E, Olsson M, Brinkmalm G, Rüetschi U, Mattsson N, Andreasson U, Gobom J, Brinkmalm A, Hölttä M, Blennow K, Zetterberg H (2013) Mass spectrometric characterization of amyloid- β species in the 7PA2 cell model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **33**, 85-93.
- [53] Welander H, Frånberg J, Graff C, Sundström E, Winblad B, Tjernberg LO (2009) Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J Neurochem* **110**, 697-706.
- [54] Conicella AE, Fawzi NL (2014) The C-terminal threonine of A β 43 nucleates toxic aggregation via structural and dynamical changes in monomers and protofibrils. *Biochemistry* **53**, 3095-3105.
- [55] Almdahl IS, Lauridsen C, Selnes P, Kalheim LF, Coello C, Gajdzik B, Møller I, Wettergreen M, Grambaite R, Bjørnerud A, Bråthen G, Sando SB, White LR, Fladby T (2017) Cerebrospinal fluid levels of amyloid beta 1-43 mirror 1-42 in relation to imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **9**, 9
- [56] Mertens J, Stüber K, Wunderlich P, Ladewig J, Kesavan JC, Vandenberghe R, Vandenbulcke M, van Damme P, Walter J, Brüstle O, Koch P (2013) APP processing in human pluripotent stem cell-derived neurons is resistant to NSAID-based γ -secretase modulation. *Stem Cell Reports* **1**, 491-498.
- [57] Koch P., Tamboli IY, Mertens J, Wunderlich P, Ladewig J, Stüber K, Esselmann H, Wiltfang J, Brüstle O, Walter J (2012) Presenilin-1 L166P mutant human pluripotent stem cell-derived neurons exhibit partial loss of γ -secretase activity in endogenous amyloid- β generation. *Am J Pathol* **180**, 2404-2416.

- [58] Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O (2009) A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 3225-3230.
- [59] Fraering PC, Ye W, Strub J-M, Dolios G, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, van Dorsselaer A, Wang R, J. Selkoe DJ, Wolfe MS (2004). Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* **43**, 9774–9789.
- [60] Gerber H, Wu F, Dimitrov M, Garcia Osuna GM, Fraering PC (2017) Zinc and copper differentially modulate amyloid precursor protein processing by γ -secretase and amyloid- β peptide production. *J Biol Chem* **292**, 3751-3767.
- [61] Hata S, Fujishige S, Araki Y, Kato N, Araseki M, Nishimura M, Hartmann D, Saftig P, Fahrenholz F, Taniguchi M, Urakami K, Akatsu H, Martins RN, Yamamoto K, Maeda M, Yamamoto T, Nakaya T, Gandy S, Suzuki T (2009) Alcadein cleavages by amyloid beta-precursor protein (APP) alpha- and gamma-secretases generate small peptides, p3-Alcs, indicating Alzheimer disease-related gamma-secretase dysfunction. *J. Biol. Chem.* **284**, 36024-36033.
- [62] Piao Y, Kimura A, Urano S, Saito Y, Taru H, Yamamoto T, Hata S, Suzuki T (2013) Mechanism of intramembrane cleavage of alcadeins by γ -secretase. *PLoS One* **8**, e62431.
- [63] Kukar T, Murphy MP, Eriksen JL, Sagi SA, Weggen S, Smith TE, Ladd T, Khan MA, Kache R, Beard J, Dodson M, Merit S, Ozols VV, Anastasiadis PZ, Das P, Fauq A, Koo EH, Golde TE (2005) Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. *Nat Med* **11**, 545-550.
- [64] Svedružić ŽM, Popović K, Šendula-Jengiđ V (2013) Modulators of γ -secretase activity can facilitate the toxic side-effects and pathogenesis of Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e50759.
- [65] Barnwell E, Padmaraju V, Baranello R, Pacheco-Quinto J, Crosson C, Ablonczy Z, Eckman E, Eckman CB, Ramakrishnan V, Greig NH, Pappolla MA, Sambamurti K (2014) Evidence of a novel mechanism for partial γ -secretase inhibition induced paradoxical increase in secreted amyloid β protein. *PLoS One* **9**, e91531.
- [66] Jung JI, Ladd TB, Kukar T, Price AR, Moore BD, Koo EH, Golde TE, Felsenstein KM (2013) Steroids as γ -secretase modulators. *FASEB J* **27**, 3775-3785.
- [67] Takasugi N, Sasaki T, Shinohara M, Iwatsubo T, Tomita T (2015) Synthetic ceramide analogues increase amyloid- β 42 production by modulating γ -secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **457**, 194-199.

- [68] Guix FX, Wahle T, Vennekens K, Snellinx A, Chávez-Gutiérrez L, Ill-Raga G, Ramos-Fernandez E, Guardia-Laguarta C, Lleó A, Arimon M, Berezovska O, Muñoz FJ, Dotti CG, De Strooper B (2012) Modification of γ -secretase by nitrosative stress links neuronal ageing to sporadic Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* **4**, 660-673.
- [69] Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y (2009) gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci.* **29**, 13042-13052.
- [70] Burnouf S, Gorsky MK, Dols J, Grönke S, Partridge L (2015) A β ₄₃ is neurotoxic and primes aggregation of A β ₄₀ in vivo. *Acta Neuropathologica* **130**, 35-47.
- [71] Khan MF, Alam MM, Verma G, Akhtar W, Akhter M, Shaquiquzzaman M (2016) The therapeutic voyage of pyrazole and its analogs: A review. *Eur J Med Chem* **120**, 170-201.
- [72] Ebke A, Luebbbers T, Fukumori A, Shirotani K, Haass C, Baumann K, Steiner H (2011) Novel γ -secretase enzyme modulators directly target presenilin protein. *J Biol Chem* **286**, 37181-37186.
- [73] de Toffoli AL, da Mata K, Bisinoti MC, Moreira AB (2015) Development, validation, and application of a method for the GC-MS analysis of fipronil and three of its degradation products in samples of water, soil, and sediment. *J Environ Sci Health B* **50**, 753-759.
- [74] Gan J, Bondarenko S, Oki L, Haver D, Li JX (2012) Occurrence of fipronil and its biologically active derivatives in urban residential runoff. *Environ Sci Technol* **46**, 1489-1495.
- [75] Michel N, Freese M, Brinkmann M, Pohlmann JD, Hollert H, Kammann U, Haarich M, Theobald N, Gerwinski W, Rotard W, Hanel R (2016) Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe. *Sci Total Environ* **568**, 171-179.
- [76] Socorro J, Durand A, Temime-Roussel B, Gligorovski S, Wortham H, Quivet E (2016) The persistence of pesticides in atmospheric particulate phase: An emerging air quality issue. *Sci Rep* **6**, 33456.
- [77] Lopez-Antia A, Ortiz-Santaliestra ME, Camarero PR, Mougeot F, Mateo R (2015) Assessing the risk of fipronil-treated seed ingestion and associated adverse effects in the red-legged partridge. *Environ Sci Technol* **49**, 13649-13657.

- [78] Gibbons D, Morrissey C, Mineau P (2015) A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**, 103-118. Erratum in: *Environ Sci Pollut Res Int* **23**, 947.
- [79] Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA (2016) Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. *Toxicol Lett* **252**, 42-49.
- [80] Sidiropoulou E, Sachana M, Flaskos J, Harris W, Hargreaves AJ, Woldehiwet Z (2011) Fipronil interferes with the differentiation of mouse N2a neuroblastoma cells. *Toxicol Lett* **201**, 86-91.
- [81] Lee JE, Kang JS, Ki YW, Lee SH, Lee SJ, Lee KS, Koh HC (2011) Akt/GSK3 β signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett* **202**, 133-141.
- [82] Park JH, Park YS, Lee JB, Park KH, Paik MK, Jeong M, Koh HC (2016) Meloxicam inhibits fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. *J Appl Toxicol* **36**, 10-23.
- [83] Ruangjaroon T, Chokchaichamnankit D, Srisomsap C, Svasti J, Paricharttanakul NM (2017) Involvement of vimentin in neurite outgrowth damage induced by fipronil in SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* **486**, 652-658.
- [84] Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T (2005) Sulfone metabolite of fipronil blocks gamma-aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 363-373.
- [85] Kairo G, Poquet Y, Haji H, Tchamitchian S, Cousin M, Bonnet M, Pelissier M, Kretschmar A, Belzunces LP, Brunet JL (2017) Assessment of the toxic effect of pesticides on honey bee drone fertility using laboratory and semifield approaches: A case study of fipronil. *Environ Toxicol Chem* Feb 22. doi: 10.1002/etc.3773. [Epub ahead of print]
- [86] Roat TC, Carvalho SM, Palma MS, Malaspina O (2017) Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. *Environ Toxicol Chem* **36**, 1652-1660.
- [87] Kairo G, Provost B, Tchamitchian S, Ben Abdelkader F, Bonnet M, Cousin M, Sénéchal J, Benet P, Kretschmar A, Belzunces LP, Brunet JL (2016) Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Sci Rep* **6**, 31904.
- [88] Erickson BE (2013) Europe to ban fipronil pesticide to protect bees. *Chem Eng News* **91**, 21.

- [89] Mohamed F, Senarathna L, Percy A, Abeyewardene M, Eaglesham G, Cheng R, Azher S, Hittarage A, Dissanayake W, Sheriff MH, Davies W, Buckley NA, Eddleston M (2004) Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil - a GABAA-gated chloride channel blocker. *J Toxicol Clin Toxicol* **42**, 955-963.
- [90] Lee SJ, Mulay P, Diebolt-Brown B, Lackovic MJ, Mehler LN, Beckman J, Waltz J, Prado JB, Mitchell YA, Higgins SA, Schwartz A, Calvert GM (2010) Acute illnesses associated with exposure to fipronil--surveillance data from 11 states in the United States, 2001-2007. *Clin Toxicol (Phila)* **48**, 737-744.
- [91] Herin F, Boutet-Robinet E, Levant A, Dulaurent S, Manika M, Galatry-Bouju F, Caron P, Soulat JM (2011) Thyroid function tests in persons with occupational exposure to fipronil. *Thyroid* **21**, 701-706.
- [92] Cravedi JP, Delous G, Zalko D, Viguié C, Debrauwer L (2013) Disposition of fipronil in rats. *Chemosphere* **93**, 2276-2283.
- [93] Roques BB, Lacroix MZ, Puel S, Gayraud V, Picard-Hagen N, Jouanin I, Perdu E, Martin PG, Viguié C (2012) CYP450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. *Toxicol Sci* **127**, 29-41. Erratum in: *Toxicol Sci* **130**, 444-445.
- [94] Cochran RC, Yu L, Krieger RI, Ross JH (2015) Post application fipronil exposure following use on pets. *J Toxicol Environ Health A* **78**, 1217-1226.
- [95] Bigelow Dyk M, Liu Y, Chen Z, Vega H, Krieger RI (2012) Fate and distribution of fipronil on companion animals and in their indoor residences following spot-on flea treatments. *J Environ Sci Health B* **47**, 913-924.
- [96] Sun Q, Qi W, Yang JJ, Yoon KS, Clark JM, Park Y (2016) Fipronil promotes adipogenesis via AMPK α -mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Food Chem Toxicol* **92**, 217-223.
- [97] Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, Ball MJ, Bearer EL, Braak H, Bullido MJ, Carter C, Clerici M, Cosby SL, Del Tredici K, Field H, Fulop T, Grassi C, Griffin WS, Haas J, Hudson AP, Kamer AR, Kell DB, Licastro F, Letenneur L, Lövhelm H, Mancuso R, Miklossy J, Otth C, Palamara AT, Perry G, Preston C, Pretorius E, Strandberg T, Tabet N, Taylor-Robinson SD, Whittum-Hudson JA (2016) Microbes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **51**, 979-984.
- [98] Peditizi E, Peters R, Beckett N (2016) The risk of overweight/obesity in mid-life and late life for the development of dementia: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Age Ageing* **45**, 14-21. Erratum in: *Age Ageing* **45**, 740.

- [99] Mazon JN, de Mello AH, Ferreira GK, Rezin GT (2017) The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sci* **182**, 22-28.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Some pyrazoles trigger production of extracellular amyloid A β -42. Effect of 18 pyrazoles on extracellular amyloid A β ₄₂ production by N2a-APP695 and CHO-7PA2-APPsw cells. Cells were treated with 100 μ M of each compound for 18 h and cell supernatants were collected for extracellular A β ₄₂ levels measurement by an ELISA assay. Aftin-5 was used as a positive control and the corresponding volume of vehicle (DMSO) was used as a negative control. Levels are expressed as fold change, \pm standard error, of A β ₄₂ levels over the A β ₄₂ level of control, vehicle-treated cells. Average of five experiments performed in triplicate. Horizontal dotted lines indicate levels for 1 and 3 fold changes in A β ₄₂ concentration.

Figure 2. Molecular structure of the nine active pyrazoles.

Figure 3. Molecular structure of fipronil and some of its metabolites and derivatives.

Figure 4. Extracellular A β ₄₂ production induced by pyrazoles is inhibited by β -secretase inhibitor IV (Calbiochem), γ -secretase inhibitors DAPT & BMS 299897, and γ -secretase modulator 'Torrey Pines'. N2a-APP695 cells were exposed to 10 μ M β -secretase inhibitor IV, 2 μ M BMS 299897, 2 μ M DAPT or 10 μ M 'Torrey Pines' compound. 1.5 h later cells were exposed to 50 μ M (**2**, **5**, **8**, **14**, **16**, **18**) or 25 μ M (**3**, **4**, **6**) pyrazoles or 50 μ M Aftin-5. Extracellular A β ₄₂ levels were measured after 18 h and are expressed as fold change, \pm standard error, of A β ₄₂ level in pyrazole-treated cells over the A β ₄₂ level of control, vehicle-treated cells. Representative of two independent experiments performed in triplicates. Error bars represent standard deviation of all six values.

Figure 5. Absolute quantification of A β ₃₈, A β ₄₀ and A β ₄₂ using LC-MS/MS. Levels of the three A β s were determined by mass spectrometry in supernatants of N2a-APP695 cells following 18 h treatment with DMSO, 100 μ M of pyrazoles **18**, **20** or **21**. Amyloid levels are expressed as percentage of levels in vehicle-treated cells (average \pm SE of quadruplicate values; absolute values in control cell supernatants are indicated) and A β ₄₂/A β ₄₀ ratios are indicated in parentheses. Horizontal dotted line indicates basal A β levels vs. the values in DMSO-treated cells.

Figure 6. Pattern of A β s produced by N2a-APP695 cells exposed to pyrazoles 18, 20 or 21. Cells were treated for 18 h with DMSO or 20 μ M of each pyrazole. Cell supernatants were collected and analyzed as described. Quantification of all A β s in N2a-APP695 cells supernatants are presented as percentage of total amyloids. Note the decrease in peptides 1-37, 1-38, the increase in 1-40 and the appearance of 1-42 and 1-43 in the supernatants of pyrazole-treated cells (these two peptides are undetectable in the supernatant of DMSO-treated cells).

Figure 7. Pyrazoles trigger enhanced production of A β ₄₂ versus A β ₄₀ in neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells. Neurons were derived from iPSCs obtained from healthy donor (APP WT, white bars) or from an AD patient with APP K724N mutation (grey bars). They were exposed for 24 h to DMSO (control), 100 μ M Aftin-5 or the nine pyrazoles. Cell supernatants were collected for extracellular A β ₄₀ and A β ₄₂ levels measurement by an ELISA assay. Levels are expressed as A β ₄₂/A β ₄₀ ratios \pm standard error of triplicate values.

Figure 8. Mass spectrometric analysis of the A β s generated in cell-free γ -secretase assays, in the presence of DMSO or fipronils 18, 20 or 21. **A.** The A β s generated by highly purified γ -secretase in the presence of 100 μ M of fipronil (**18**), fipronil sulfone (**20**) or fipronil desulfinyl (**21**) or DMSO (the solvent used to solubilize the pyrazoles) were pooled from triplicates of the activity assays, immunoprecipitated overnight with the anti-A β antibody 4G8 and protein G and analyzed by MALDI-TOF in a reflectron mode. The A β s generated from the recombinant APP-C99 contain an N-terminal methionine, which results in a mass shift of +149m/z when compared to endogenous A β peptides. **B.** Note the increased A β ₄₂/A β ₄₀ ratio for fipronils **18**, **20** and **21**, and the increased A β ₄₃/A β ₄₀ ratio for fipronil sulfone (**20**).

Figure 9. Pyrazoles alter the cleavage pattern of Alcadein α , leading to increased p3-Alca38 production. **A.** Immunoprecipitation/mass spectrometry spectra of p3-Alca peptides produced by HEK cells expressing full length Alcadein α exposed to various pyrazoles or DMSO (control). Cells were treated for 48 h with 100 μ M of each reagent and p3-Alca peptides were analyzed by MALDI-TOF/MS. **A.** Representative profile for each product showing the the p3-Alca_{2N+34}, p3-Alca_{2N+35}, p3-Alca_{2N+36}, p3-Alca_{2N+37} and p3-Alca_{2N+38} peaks. **B.** Relative quantification of p3-Alca peptides produced by cells exposed

to DMSO (control), fipronil (**18**), fipronil sulfone (**20**) or fipronil desulfinyl (**21**). Levels of each peptide are presented as relative ratios of p3-Alca2N+38 versus p3-Alca2N+35 (average \pm SEM of triplicate values).

Figure 10. Proteomics & phosphoproteomics analysis of N2a-APP695 cells exposed to fipronil sulfone- and dipropetryn- treated cells. **A.** N2a-APP695 cells were exposed for 18 h to 20 μ M fipronil sulfone, 100 μ M dipropetryn or DMSO. This led to increased extracellular A β ₄₂ expression (3.58 ± 0.05 and 7.87 ± 0.81 fold change for fipronil sulfone and dipropetryn, respectively, compared to DMSO-treated cells). Up/down-regulated proteins in fipronil sulfone- (1634) and dipropetryn- (1638) treated cells vs. DMSO-treated cells were identified and compared. Among the **261** common proteins, **178** proteins (listed in Supplementary Table S1) were either up-regulated by both treatments or down-regulated by both treatments. **B.** DAVID analysis of the 178 proteins common to fipronil sulfone and dipropetryn treatments. Data are selected with p-value <0.01 and FDR <0.05. FDR = False Discovery Rate.

Figure 11. Short-term time-course of fipronil and fipronil sulfone bioaccumulation in brain (A) and epididymal adipose tissue (B) following a single oral administration of fipronil. Fipronil (10 mg/kg) was administrated by oral gavage at time 0. Animals were sacrificed at various times and plasma, epididymal adipose tissue and brain were collected. Fipronil and fipronil sulfone levels were quantified by LC-MS/MS. Concentrations are expressed as μ g/brain or μ g/epididymal adipose tissue.

Figure 12. Long-term time-course of fipronil sulfone production and accumulation following single (A) or repeated (B) oral administrations of fipronil. **A.** Fipronil (10 mg/kg) was administrated by oral gavage on day 0. Animals were sacrificed at various times and plasma, epididymal adipose tissue and brain were collected. Fipronil sulfone levels were quantified by LC-MS/MS. **B.** Fipronil was administrated by oral gavage 5 days /week for 3 weeks (times of administration are indicated by black dots). Animals were sacrificed at various times and plasma, epididymal adipose tissue and brain were collected. Fipronil sulfone levels were quantified by LC-MS/MS. Concentrations are expressed as μ g/brain, μ g/epididymal adipose tissue or μ g/mL plasma.

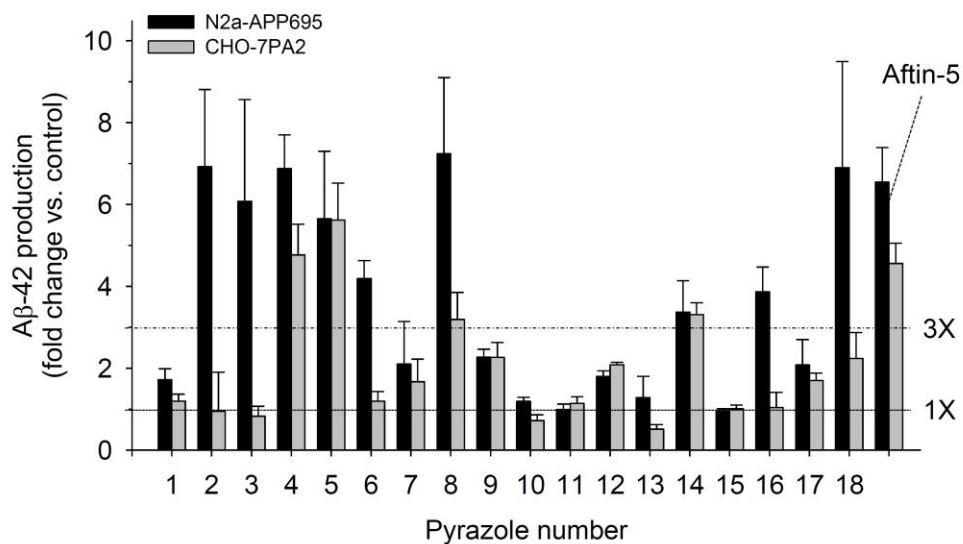


Figure 1

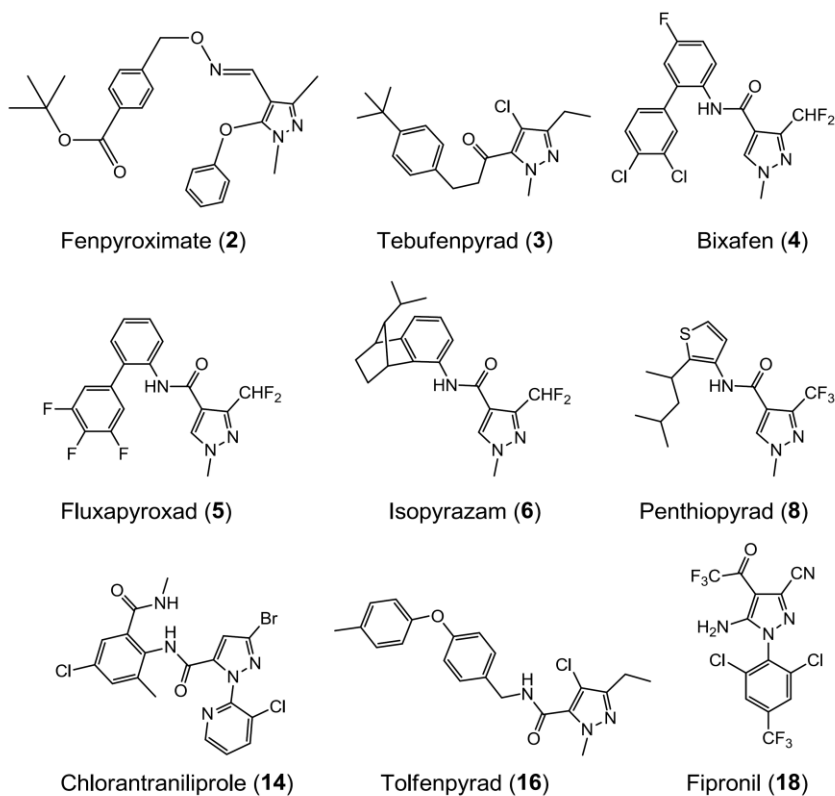


Figure 2

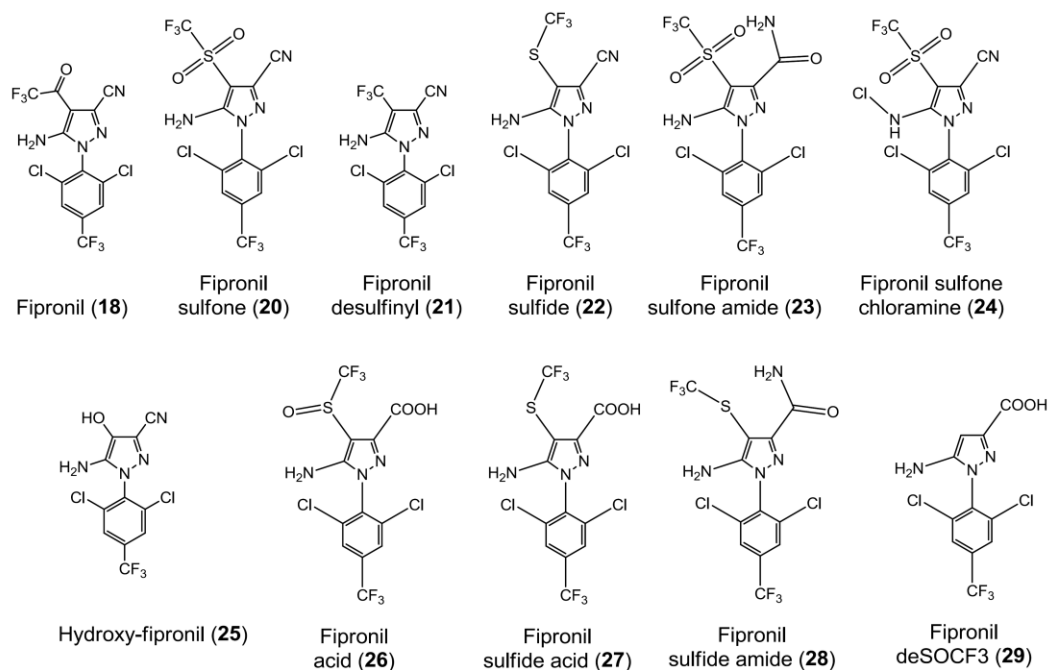


Figure 3

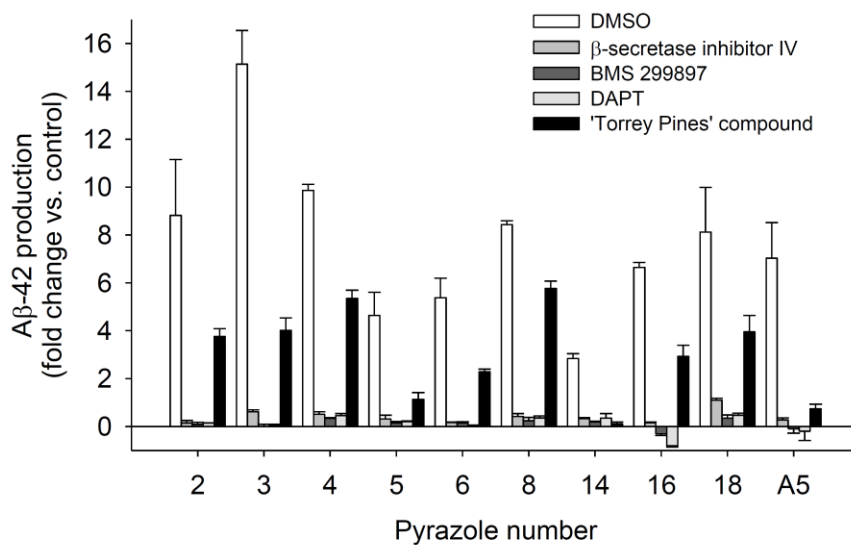


Figure 4

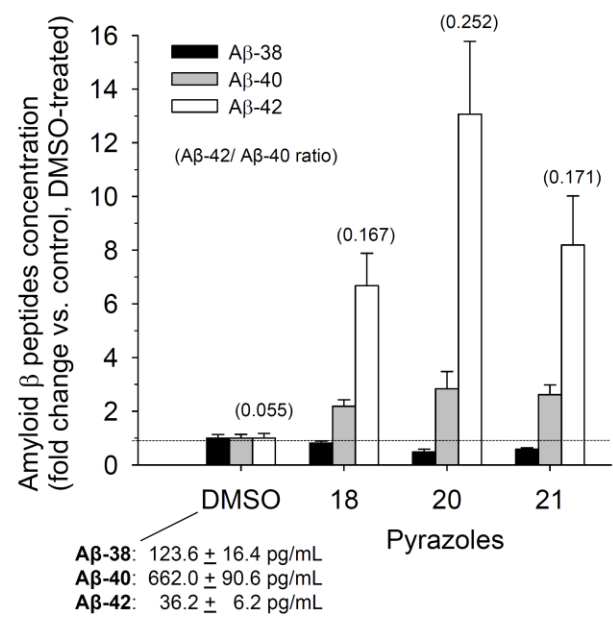


Figure 5

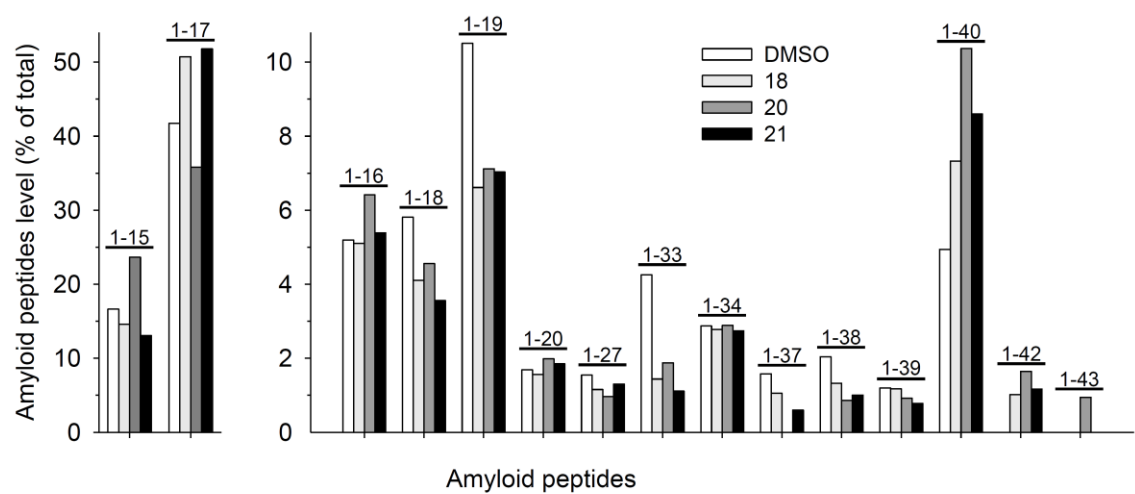


Figure 6

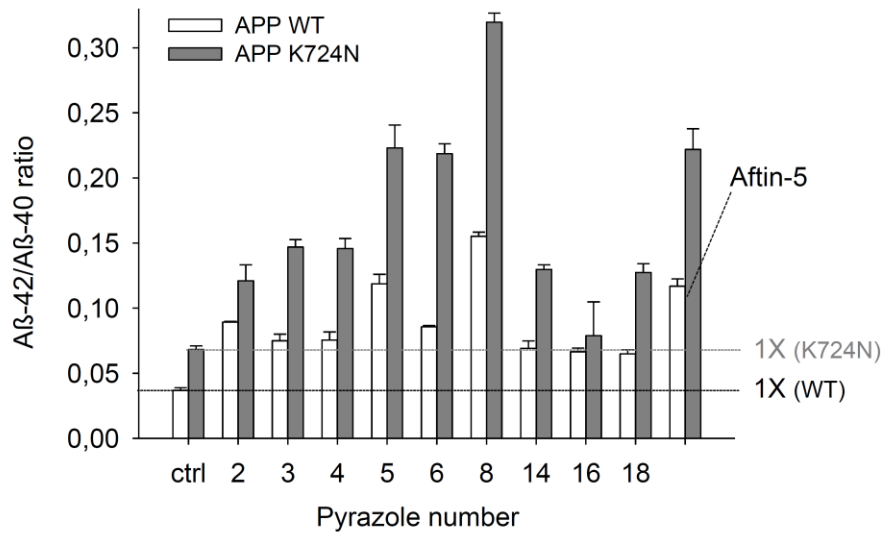


Figure 7

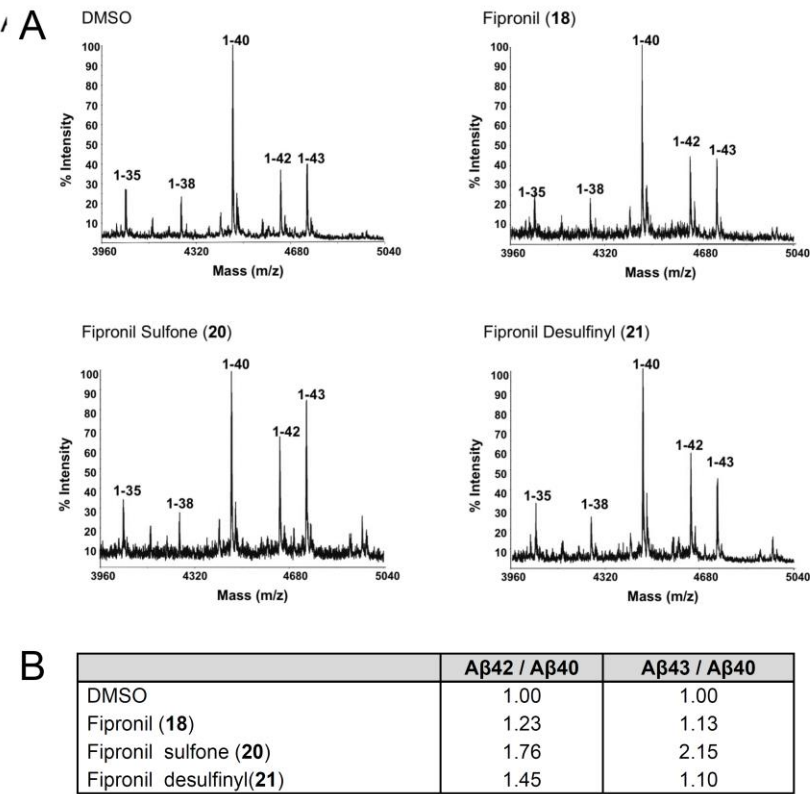


Figure 8

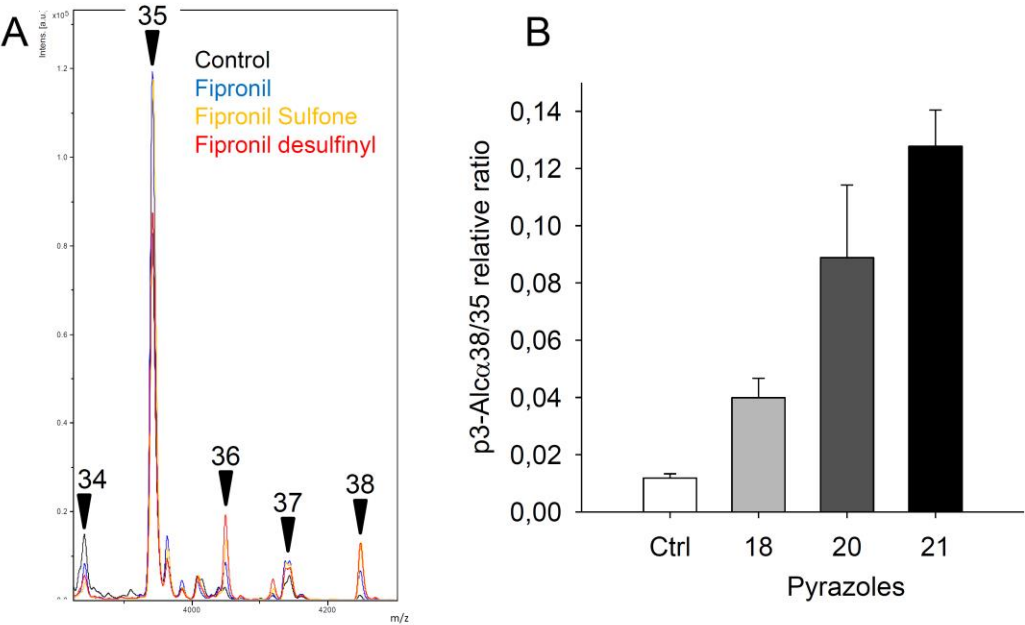


Figure 9

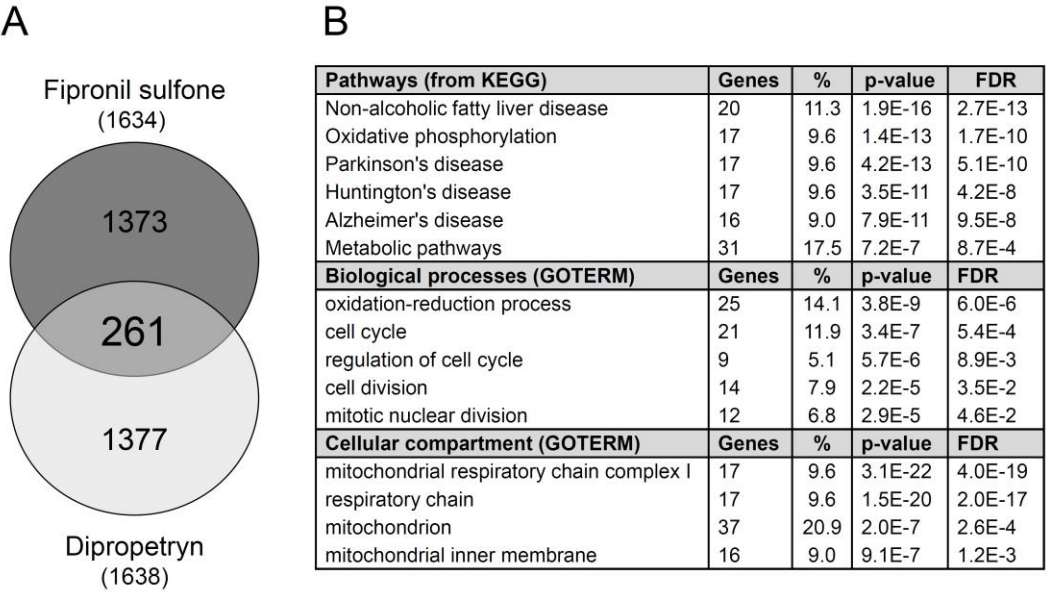


Figure 10

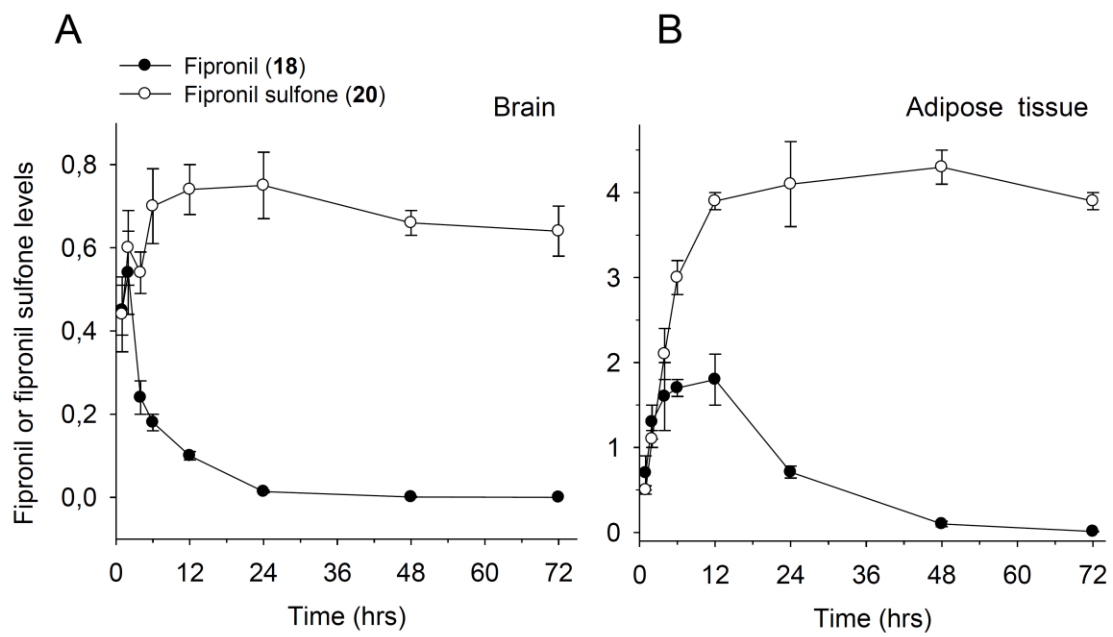


Figure 11A, 11B

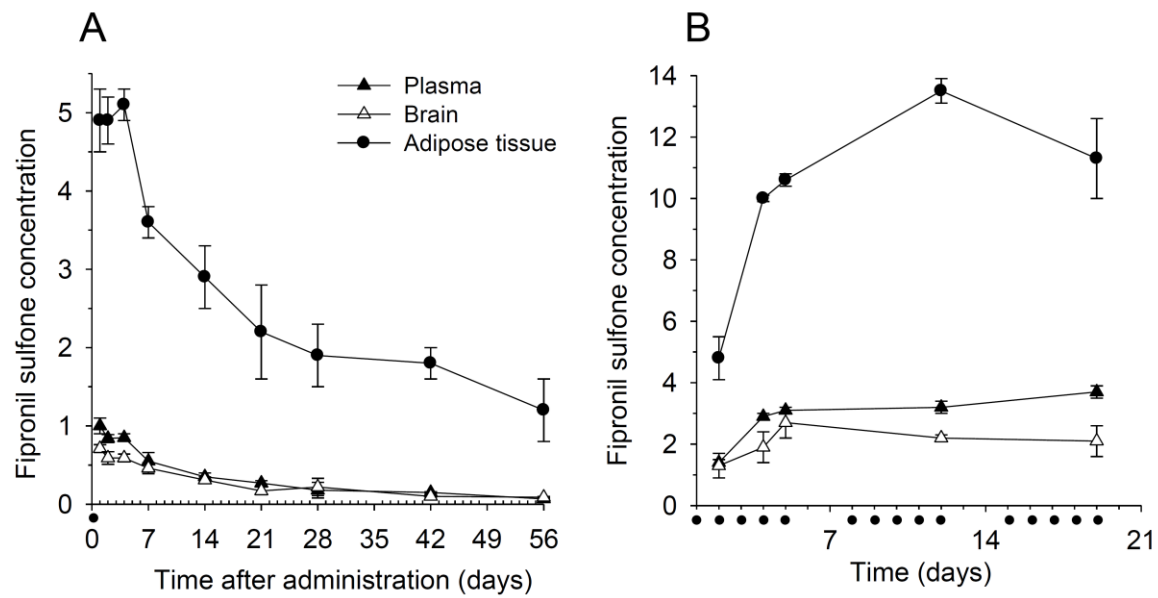


Figure 12A, 12B

Submitted September, 2017

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Induction of amyloid- β ₄₂ production by fipronil and other pyrazole insecticides

Morgane CAM, Emilie DURIEU, Marion BODIN, Antigoni MANOUSOPOULOU, Natalia VASYLIEVA, Bogdan BARNYCH, Bruce HAMMOCK, Rebecca L. McMAHEN, Mark J. STRYNAR, Bettina BOHL, Philipp KOCH, Chiori OMORI, Kazuo YAMAMOTO, Saori HATA, Toshiharu SUZUKI, Frank KARG, Patrick GIZZI, Vesna ERAKOVIC-HABER, Vlatka Bencetic MIHALJEVIC, Branka TAVCAR, Erik PORTELIUS, Josef PANNEE, Kaj BLENNOW, Henrik ZETTERBERG, Spiros GARBIS, Hermeto GERBER, Jeremy FRAERING, Patrick C. FRAERING and Laurent MEIJER

Contents

1. Supplementary Material & Methods	
1.1. Pyrazoles and other reagents	2
1.2. Cell cultures: cell lines, iPSCs-derived neurons and & HEK293-alcadein α cells	2
1.3. Purified γ -secretase preparation	3
1.4. Amyloids assays	3
1.5. Cell viability	4
1.6. Pharmacokinetics studies	4
1.7. Proteomics & phosphoproteomics study	5
2. Supplementary Tables	
Table S1. Effect of 18 pyrazoles on A β ₄₂ production by N2a-APP695 & CHO-7PA2 cells	6
Table S2. Effect of fipronil derivatives on A β ₄₂ production by N2a-APP695 & CHO-7PA2 cells.	6
Table S3. A β ₄₂ inducing pyrazoles: physico-chemical & biological properties, toxicity, persistence	7
Table S4. Proteomics study of fipronil- and dipropetryn- treated cells	9
Table S5. Fipronil and the Lipinski rule of 5	11
3. Supplementary Figures	
Figure S1. Short-term time-course of fipronil and fipronil sulfone pharmacokinetics in mice	12
Figure S2. Time-course of fipronil and fipronil sulfone pharmacokinetics & bioaccumulation in Sprague Dawley rat.	12
Figure S3: Model for the mechanism by which Pyrazole compounds could modulate A β production towards A β ₄₂ .	13
4. Supplementary References	14

1. Supplementary Material & Methods

1.1. Pyrazoles and other reagents

The main pyrazole pesticides (**1-18**) were obtained commercially from Fluka/ Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France): Cyenopyrafen (**1**, Fluka 32069), Fenpyroximate (**2**, Fluka 31684), Tebufenpyrad (**3**, Fluka 46438), Bixafen (**4**, Fluka 32581), Fluxapyroxad (**5**, Fluka 37047), Isopyrazam (**6**, Fluka 32532), Penflufen (**7**, Fluka 37049), Penthiopyrad (**8**, Fluka 32064), Pyraclostrobin (**9**, Fluka 33696), Metazachlor (**10**, Fluka 36155), Pyrazolynate (**11**, Fluka 32459), Pyrazoxyfen (**12**, Fluka 32437), Pinoxaden (**13**, Fluka 32821), Chlorantraniliprole (**14**, Fluka 32510), Dimetilan (**15**, Fluka 45450), Tolfenpyrad (**16**, Fluka 37043), Ethiprole (**17**, Fluka 33976), Fipronil Sulfone (**20**, Fluka 32333), Fipronil Desulfinyl (**21**, Fluka 41865), Fipronil Sulfide (**22**, Fluka 34520). Fipronil (**18**) was purchased from TCI (Tokyo Chemical Industry Co., LTD., Tokyo, Japan). Fipronil sulfone chloramine (**24**) [1] was obtained commercially from the US EPA organization (Research Triangle Park, NC, USA). Fipronil sulfone amide (**23**), Hydroxy-fipronil (**25**) [2], Fipronil acid (**26**), Fipronil

sulfide acid (**27**), Fipronil sulfide amide (**28**) and Fipronil-deSOCF3-acid (**29**) were obtained from Dr. Hammock laboratory (Department of Entomology, University of California, Davis, CA 95616, USA).

Aftin-5 and the γ -secretase modulator ('Torrey Pines' compound) were synthesized as previously described [3-5]. All compounds were solubilized as 100 mM stock solutions in 100% dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted just prior use. Aftin-5 is available from ManRos Therapeutics, 29680-Roscoff, France (meijer@manros-therapeutics.com) and Adipogen International (<http://www.adipogen.com/>).

DMSO, Nonidet P-40, Tween-20, DL-dithiothreitol (DTT), bovine serum albumin (BSA), Na₂CO₃, NaHCO₃, citric acid monohydrate, Na₂HPO₄·2H₂O, H₂O₂, Protease inhibitors mix (Complete), DAPT (*N*-[(3,5-difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenylglycine-1,1-dimethylethyl ester), digitonin were purchased from Sigma Aldrich. Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugate was purchased from Thermo Scientific Pierce (Brebieres, France). o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) tablets were from Invitrogen (St Aubin, France). γ -Secretase inhibitors BMS299897 was obtained from Tocris Bioscience (Lille, France). β -secretase inhibitor IV was from Calbiochem (Molsheim, France). Protease inhibitors mix (Complete) was obtained from Roche (Boulogne-Billancourt, France).

1.2. Cell cultures: cell lines, primary neurons, iPSCs-derived neurons and HEK293- α caldein cells

N2a-APP₆₉₅, CHO-7PA2 and HEK293-APP_{2P3Tsw} cell lines

N2a-APP₆₉₅ cells (gift from Dr. Marc Flajolet, Rockefeller Institut, New York, USA) were cultured in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) / OptiMEM (1:1 v/v) (Invitrogen, Saint Aubin, France) containing 0.2 mg/mL Genitcin (G418, HyClone Laboratories Inc., Ohama, NE, USA) and 0.5% fetal bovine serum (FBS, Gibco, c/o Invitrogen) in a humidified, 5% CO₂ incubator. CHO-7PA2 cells (CHO cells stably expressing APP751 with the Val717Phe familial AD mutation, obtained from D.J. Selkoe, Harvard Medical School, Boston, USA) and HEK293-APP_{2P3Tsw} were cultured in DMEM (Invitrogen) + 10% FBS with Glutamax, Phenol Red and without HEPES. Cells were split routinely every 2/3 days. They were first rinsed with phosphate buffered saline (PBS, Gibco) and detached from the plate bottom using 2 mL Versene (Gibco) at room temperature (RT) for 3-4 min. Eight mL of fresh medium were added to the cell suspension, and the mix was centrifuged for 3 min at 1,000 rpm. The cell pellet was resuspended in fresh medium before seeding (1/10 dilution) in new flasks.

iPSCs-derived neurons

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) from 33-year old healthy male (A β PP WT, wild-type) and 55-year old female harboring a lysine 724 to asparagine mutation in A β PP (A β PP K724N mutation) have been generated and characterized previously [6]. From iPSCs we generated long-term self-renewing neuroepithelial stem cells (It-NES cells), a homogeneous population which can be continuously propagated in the presence of FGF2 and EGF. To that end, 4-day-old embryoid bodies were transferred to polyornithine-coated tissue culture dishes and propagated in N2 medium (DMEM/F12 high glucose; N2 supplement, both Life Technologies, Darmstadt, Germany). Within 10 days, neural island consisting of neural rosettes and neural tube-like structures developed in the embryoid body outgrowth. These islands were mechanically isolated by separation from the surrounding cells with a scalpel. Isolated clusters were further propagated for 2 days as free-floating neurospheres in N2 medium containing 10 ng/mL FGF2 and 10 ng/mL EGF (both R&D Systems, Wiesbaden, Germany) and 1 μ L/mL B27 Supplement (Life Technologies; short: N2 FEB medium). Spheres were triturated into single cells by incubating the spheres with trypsin/EDTA for 10 min followed by gentle dissociation with a 1.000 μ L pipette tip. Cells were plated on polyornithine (Sigma Aldrich) and laminin (Life Technologies) precoated plastic dishes. Passaging of the cells was performed when cells had reached full confluence (normally every 3-4 days) at a 1:2 – 1:3 ratio using trypsin/EDTA. Medium was changed every other day while growth factors were added on a daily basis.

Neuronal differentiation was performed by plating 300,000 cells per well of a Geltrex (Life Technologies; diluted 1:50)-precoated 12-well plate in N2 FEB medium. The following day, the medium was changed to terminal differentiation medium containing DMEM/F12 supplemented with 1:200 N2 supplement, 1:100 B27 supplement, 1:100 Non-Essential Amino Acids Solution (Life Technologies) and 4.4 mM glucose. Medium was changed every other day.

Compound treatment was performed on neuronal cultures differentiated for at least 4 weeks. Cells were pretreated for 16 h with compound containing medium. Solvent only (DMSO) was used as control. Medium was replaced (same volume with freshly added compounds) and supernatants and lysates were harvested 24 h later. Supernatants were directly frozen in liquid nitrogen until analyzed. A β ₄₂ and A β ₄₀ in the supernatants were analyzed by ELISA (Meso Scale Discovery, Rockville MD, USA) and normalized to the protein content of the cell pellet.

HEK293-alcadeina cells - Alcadein fragments analysis

The full-length human Alcadeina1 (Alc α) open reading frame [7] was subcloned into the HindIII and XbaI sites of pcDNA3.1 (Hygro+) vector (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), transfected into HEK293 cells with Lipofectamine 2000 (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), and cells stably expressing Alc α were cloned. The cells were cultured at 37°C until 70% confluence in dishes coated with poly-L-lysine. They were next treated with pyrazoles (100 μ M) or DMSO for 48 h. The secreted p3-Alc α were recovered from the cultured medium, after preclearing on protein G -sepharose, by immunoprecipitation (constant rotation for 24 h at 4°C) with anti-p3-Alc α UT175 antibody, an antibody raised to an antigen peptide composed of Cys plus the human Alc α 839-851 sequence, using Protein G-Sepharose beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The beads were sequentially washed and samples were eluted with trifluoroacetic acid/acetonitrile/water (1:20:20) saturated with sinapinic acid, and subject to MALDI-TOF-MS analysis using an Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Molecular masses were calibrated using the peptide calibration standard (Bruker Daltonics) [8].

1.3. Purified γ -secretase preparation γ -Secretase activity assays

The cell-free γ -secretase assays were performed as previously described [9] with highly purified γ -secretase and APP-C99, a recombinant APP-CTF substrate expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein consisting of a N-terminal Met for translation initiation, amino acids 597- 695 of the 695-amino acid human isoform of APP, and a C-terminal Flag tag sequence. Briefly, purified γ -secretase was reconstituted in a HEPES buffer containing 0.25% (w/v) CHAPSO and 0.10% (w/v) phosphatidylcholine (PC) at pH 7.0. Next, the selected pesticides solubilized in DMSO (fipronil (**18**), fipronil sulfone (**20**) and fipronil desulfinyl (**21**)) were added to the reaction at a final concentration of 100 μ M. Finally, the purified and pre-cleared APP-C99-Flag substrate [10] was added at a final concentration of 1 μ M to launch the reaction and all samples were incubated at 37°C for 4 hours. The reactions were stopped by addition of SDS at a final concentration of 0.3% (w/v).

Immunoprecipitation and mass spectrometric analysis of A β s.

Immunoprecipitation and mass spectrometry (IP/MS) experiments were performed as previously described [10]. Briefly, triplicates from the activity assays performed with highly purified γ -secretase were pooled and incubated overnight at 4°C with 2.5 μ L of the 4G8 antibody (1:1000, Biolegend, CA, USA) and 30 μ L protein G (Sigma-Aldrich) to precipitate A β s. After IP, the beads were washed three times with washing buffer (50 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl, 0.1% n-octyl- β -D-glycopyranoside) and immunoprecipitated proteins were eluted with trifluoroacetic acid (1%): acetonitrile: H₂O (1:20:20). The elutions were then equally mixed with saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and analyzed in a reflectron mode by MALDI-TOF on an ABI 4800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). The A β s generated from the recombinant Met-APP-C99-Flag contain a N-terminal methionine, which results in a mass shift of +149m/z when compared to endogenous A β peptides.

1.4. Amyloids assays

A β s were measured by different methods according to the different cell types:

- human iPSCs-derived neuronal cultures: Meso Scale Discovery sandwich ELISA immunoassay.
- N2a-APP695 & CHO-7PA2 cell lines: an in-house sandwich ELISA assay described below, as well as tandem mass spectrometry (MS/MS) (see below) and immunoprecipitation / mass spectrometry (IP-MS) (see below).

In-house ELISA capture assay [3]

N2a-APP695 or CHO-7PA2 cells were seeded at 10,000 cells/well in a 96 well plate with modified media (0.5% FBS) and incubated overnight. Cells were treated with fresh media and different compounds (equal quantity of DMSO), then incubated for 18 h in a humidified, 5% CO₂ incubator at 37°C. The supernatant samples were collected for A β s levels determination.

A β ₃₈, A β ₄₀, A β ₄₂ levels were measured in a double antibody sandwich ELISA using a combination of monoclonal antibody (mAb) 6E10 (BioLegend c/o Ozyme, Montigny-le Bretonneux, France) and biotinylated polyclonal A β ₃₈ [11], A β ₄₀ or A β ₄₂ [11] antibodies (provided by Dr. P.D. Mehta, Staten Island, USA). Briefly, 100 μ L 6E10 diluted in carbonate-bicarbonate buffer (buffer (0.015 M Na₂CO₃ + 0.035 M NaHCO₃) pH 9.6), were coated in the microtiter plates wells (Maxisorp, Nunc, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) and incubated overnight at 4°C. The plates were washed with PBST (PBS containing 0.05% Tween-20) and blocked for 1 h with 1% BSA in PBST to avoid non-specific binding. Following a washing step, experimental samples were added into the wells and incubation was carried out for 2 h at RT and overnight at 4°C. Plates were washed before incubation with biotinylated polyclonal antibody diluted in PBST + 0.5% BSA at RT for 75 min. After a washing step, streptavidin-HRP conjugate, diluted in PBS + 1% BSA, was added and incubation was carried out for 45 min at RT. After washing, 100 μ L OPD in citrate buffer (0.049 M citric acid monohydrate + 0.1 M

Na₂HPO₄·2H₂O + 0.03% H₂O₂) pH 5.0 were added. The reaction was stopped after 15 min with 100 μ L 1 N sulfuric acid. The optical density was measured at 490 nm in a microELISA reader (BioTek Instrument, El 800, Gen 5 software). Standard curves were prepared with synthetic amyloids and each of the three antibodies. Fitting was performed using a 4 parameters sigmoid equation (SigmaPlot, Systat, Macon, France). Each of the A β ₃₈, A β ₄₀ or A β ₄₂ antibodies did not cross-react with the other A β s (data not shown).

Absolute quantification of amyloids by tandem mass spectrometry (MS/MS)

Solid phase extraction, liquid chromatography (LC) and MS/MS analysis of A β species was performed as described previously [13, 14] with the following modifications. Standard curves for A β ₃₈ and A β ₄₂ were prepared at 0.15, 0.5, 1, 2, 3 and 4 ng/mL while A β ₄₀ was prepared at 15, 50, 100, 200, 300 and 400 ng/mL using unlabeled peptides (rPeptide) in DMEM/F12 supplemented with 0.5% FBS. Uniformly labeled ¹⁵N-A β ₃₈, A β ₄₀ and A β ₄₂ peptides (rPeptide) were added to a final concentration of 1.6 ng/mL in calibrators and unknown samples as internal standards. Standard curves were constructed using the unlabeled to ¹⁵N-A β peak area ratios and fitted using linear regression. All standard curves were linear and had an R² value greater than 0.998. Concentrations of unknowns were extrapolated from the standard curves using the peak area ratio of endogenous to ¹⁵N-A β .

1.5. Cell viability

To measure cell viability, the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) was used in 96 well plates as the ELISA capture assay. Briefly, 20 μ L of MTS reagent were added in each well containing 100 μ L of media and incubation then proceeded for 1h30 (37°C, 5% CO₂ and humidified atmosphere). Measurements were made at OD 490Δ630 nm using a microELISA reader (BioTek Instrument, El 800, Gen 5 software).

1.6. Pharmacokinetics studies

Mice

Experimental design: Plasma, brain and adipose tissue concentrations for fipronil (**18**) and fipronil sulfone (**20**) were determined in 24 (Fig. 11), 21 (Fig. 12A) or 15 (Fig. 12B) CD-1 mice. For oral administration, a solution of 25 mg Fipronil /mL DMSO was prepared and diluted 1:25 in olive oil, leading to a 1 mg/mL solution (4% DMSO in olive oil). Animals were dosed orally at 10 mg/kg, with a volume of administration of 10 mL/kg by gavage, acutely (day 0; Fig. 11 and 12A) or chronically (5 days/week: days 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18; Fig. 12B). Mice were sacrificed at various time-points: 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 h (Fig. 11), 1, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 42 and 56 days (Fig. 12A) and 1, 3, 4, 11, 18 days (Fig. 12B). Following collection, blood samples were centrifuged to separate plasma which was stored frozen at -80°C until analysis. In addition, at each time point, brain and adipose (epididymal) tissues were collected and kept frozen at -80°C until analysis.

Sample preparation and analysis: 400 μ L of plasma samples were diluted with 1 mL acetonitrile for proteins precipitation and compound extraction. Brain and adipose tissues were grinded in 400 μ L of physiological serum and diluted with 1 mL acetonitrile. Following 3 min vortexing, samples were sonicated for 3 min and thereafter centrifuged for 5 min at 15000 g at 4°C. Supernatants were transferred into a microplate for LC-MS/MS analysis. Samples were assayed using a UHPLC coupled to a triple quadrupole Shimadzu LC-MS 8030 mass spectrometer. A standard range of concentrations was analyzed in the same series of injections.

Rats (Supplementary Fig. S2)

Housing and feeding of animals: rats were housed in cages with solid floors (TECNIPLAST cages, type IIIH, polysulfone cage, the surface 425 mm x 266 mm x 185 mm). Three animals were housed per cage on irradiated, granulated litter for rodents (Scobis Uno - Mucedola, Italy). Animals were kept in the following conditions: temperature 22°C \pm 2, relative humidity 55% \pm 10, about 15 - 20 air changes per hour, artificial light cycle of 12 hours light (7:00 to 19:00). Animals had free access to food SDS VRF 1 (P), UK and drinking water distributed in bottles (TECNIPLAST) and filled with drinking water coming from municipal water main. All animals were managed similarly and with due regard for their well-being according to prevailing practices and the experimental plan approved by CARE-Zagreb (Committee on Animal Research Ethics).

Experimental design: Plasma, brain and adipose tissue concentrations for fipronil (**18**), fipronil sulfone (**20**) and fipronil desulfinyl (**21**) were determined in 33 male Sprague Dawley rats (weighing 205-230 g on the day of the study). For oral administration, a solution of 25 mg fipronil /mL DMSO was prepared the day of the in vivo experiment and diluted 1:25 in olive oil, leading to a 1 mg/mL solution (4% DMSO in olive oil). Animals were dosed orally at 10 mg/kg, with a volume of administration of 10 mL/kg using a syringe and needles. Prior to sample collection during the different time-points (1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 168, 240, 336 h), animals were anesthetized (n=3 per time-point) with a cocktail of ketamine and xylazine (i.p.). Following collection, blood samples were centrifuged at 1560 g for 10 min at 4°C and plasma samples were aliquoted into polypropylene

tubes (25 μ L). Plasma samples were stored frozen at -20°C until analysis. In addition, at each time point, brain tissue was collected and brain hemispheres were divided. One brain hemisphere was used for fipronil analysis, and the other was immediately snap-frozen and stored at -70°C. In addition, adipose tissue (epididymal) was collected, individually weighed and kept frozen at -70°C until analysis.

Sample preparation and analysis: A 25 μ L aliquot of plasma was diluted with 1 volume of HPLC grade water and extracted by protein precipitation with four volumes of acetonitrile:methanol (2:1, v/v) mixture containing internal standard (Diclofenac, 100 ng/mL Warfarin 10 ng/mL). Following vortexing, samples were placed at 4°C for 1 h and thereafter centrifuged for 30 min at 4500 rpm. Extracts were transferred to polypropylene 96-well plates, diluted with water (1:1) and submitted to LC-MS/MS analysis. Brain and adipose tissue samples were thawed and homogenized with four volumes of water using an Ultraturrax homogenizer. Thereafter, an aliquot of 50 μ L of homogenate was processed in the same manner as plasma samples. Adipose tissue samples were diluted 10 times with blank sample. Extracts were transferred to polypropylene 96-well plates, diluted with water (1:1) and submitted for LC-MS/MS analysis. Samples were assayed for parent compound using a Sciex QTrap5500 mass spectrometer, against a series of matrix matched calibration curve standards. Individual standards and quality control (QC) standards were prepared by spiking blank male CD rat plasma with test compound and extracting as for the experimental samples above. The method showed a fipronil (**18**) standard curve range 0.5-1000 ng/mL in plasma, 2.5-5000 ng/g in brain tissue and 2.5-12500 ng/g in adipose tissue. The standard curve range for fipronil sulfone (**20**) was 0.5-2500 ng/mL in plasma, 5.0-12500 ng/g in brain tissue and 12.5-12500 ng/g in adipose tissue. The standard curve range for fipronil desulfinyl (**21**) was 0.5-2500 ng/mL in plasma, 2.5-12500 ng/g in brain tissue and 2.5-12500 ng/g in adipose tissue. For preparation of calibration standards (CS) and quality control (QC) samples blank rat K2EDTA plasma and tissues were used and samples were prepared in the same manner as described above. The stock solutions used to prepare CSs and QCs were prepared at a concentration 4 mg/mL in DMSO, and compound and metabolites were mixed to a concentration of 1 mg/mL. Quality control samples for all three analytes were prepared at three concentration levels: 5, 50, 500 ng/mL in plasma, 25, 250, 2500 ng/mL in brain and adipose tissue. Blank and double blank matrix were analyzed to ensure specificity. Pharmacokinetic analysis was performed using Phoenix WinNonlin 6.4. (Pharsight) software using individual animal data, non-compartmental analysis and the target dose.

1.7. Proteomics analysis of N2a-A β PP cells

The first day, the N2a-APP695 cells were detached from the flask with Versene, centrifuged during 3 min at 1,000 rpm and suspended in 10 mL medium. Cells were counted and seeded in 100 mm diameter plates at 8.10^6 cells/plate. The media used was DMEM/Optimem (1:1) supplemented with 0.5% FBS. The second day, cells were exposed for 18 h to 20 μ M fipronil sulfone, 100 μ M dipropetryn or 0.1% DMSO (control). The third day, medium was collected in 15 mL tubes (1 tube per condition). The tubes were inverted and 200 μ L were removed for ELISA analysis (In-house ELISA capture assay, see above). The cells were rinsed in 5 mL PBS, scrapped in 1 mL PBS + protease inhibitors mix and centrifuged 10 min at 21,100 g at 4°C. The cell pellets were snap-frozen, stored at -80°C and analyzed by mass spectrometry.

For each condition cell culture was performed in triplicate and cells were then pooled. Samples were dissolved in dissolution buffer (0.5 M triethylammonium bicarbonate / 0.05% sodium dodecyl sulfate), homogenized using the FastPrep system (Savant Bio, Cedex, Fr) and then subjected to pulsed probe sonication (Misonix, Farmingdale, NY, USA). Lysates were centrifuged (16,000 g, 10 min, 4°C) and supernatants were measured for protein content using the Direct DetectTM Spectroscopy system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. From each lysate volume (adjusted to the highest volume of 40 μ L) containing 100 μ g final protein content was subjected to reduction, alkylation, trypsin proteolysis and two-plex isobaric tag for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling per supplier's specifications (ABSciex, San Jose, CA, USA). Labelled peptides were pooled and fractionated with high-PH reverse phase (RP) chromatography using the Waters, XBridge C8 column (150 x 3 mm, 3.5 μ m particle) with the Shimadzu LC-20AD HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan). Each resulting fraction was LC-MS analysed with low-pH RP capillary chromatography (PepMap C18, 50 μ m ID x 50cm L, 100 Å pore, 3.5 μ m particle) and nanospray ionization FT-MS (Ultimate 3000 UHPLC - LTQ-Velos Pro Orbitrap Elite, Thermo Scientific, Bremen, DE) as reported previously [15-17].

Unprocessed raw files were submitted to Proteome Discoverer 1.4 for target decoy searching with SequestHT for tryptic peptides. Quantification ratios were normalized on the median value and log2 transformed. A protein was considered modulated in 20 μ M fipronil sulfone and 100 μ M dipropetryn vs. 0.1% DMSO (control) when its log2ratio was above or below \pm 1 Standard Deviation across all analysed samples per category as reported previously [18].

DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) was applied to identify significantly enriched pathways in the modulated proteome. Benjamini corrected p-values \leq 0.05 were considered significant.

2. Supplementary Tables

Table S1. Effect of 18 pyrazoles on extracellular A β_{42} production by N2a-APP695 and CHO-7PA2 cells. Cells were treated with each compound (5, 10, 25 or 50 μ M) for 18 h and cell supernatants were collected for extracellular A β_{42} levels measurement by an ELISA assay. Aftin-5 (**19**) was used as positive control and corresponding volume of vehicle (DMSO) was used as a negative control. Levels are expressed as fold change \pm SE of A β_{42} level over the A β_{42} level of control, vehicle-treated cells. Average of five independent experiments performed in triplicate. In bold, products inducing more than a 3 fold increase of A β_{42} production.

#	Pyrazoles	Concentration (μ M)	N2a-APP695 (Fold change)	CHO-7PA2 (Fold change)
<i>Pyrazole acaricides</i>				
1	Cyenopyrafen	5	1.72 \pm 0.27	1.20 \pm 0.17
2	Fenpyroximate	50	6.92 \pm 1.89	0.95 \pm 0.16
3	Tebufenpyrad	25	6.08 \pm 2.49	0.83 \pm 0.24
<i>Pyrazole fungicides</i>				
4	Bixafen	10	6.88 \pm 0.82	4.77 \pm 0.75
5	Fluxapyroxad	50	5.65 \pm 1.65	5.62 \pm 0.90
6	Isopyrazam	25	4.19 \pm 0.44	1.20 \pm 0.24
7	Penflufen	50	2.10 \pm 1.04	1.67 \pm 0.55
8	Penthiopyrad	50	7.24 \pm 1.86	3.19 \pm 0.66
9	Pyraclostrobin	10	2.27 \pm 0.01	2.27 \pm 0.37
<i>Pyrazole herbicides</i>				
10	Metazachlor	50	1.19 \pm 0.10	0.72 \pm 0.14
11	Pyrazolynate	50	0.99 \pm 0.13	1.14 \pm 0.16
12	Pyrazoxyfen	10	1.80 \pm 0.14	2.08 \pm 0.06
13	Pinoxaden	50	1.28 \pm 0.52	0.51 \pm 0.11
<i>Pyrazole insecticides</i>				
14	Chlorantraniliprole	50	3.37 \pm 0.77	3.31 \pm 0.29
15	Dimetilan	50	0.95 \pm 0.06	1.01 \pm 0.09
3	Tebufenpyrad	25	6.08 \pm 2.49	0.83 \pm 0.24
16	Tolfenpyrad	50	3.87 \pm 0.60	1.04 \pm 0.37
17	Ethiprole	50	2.08 \pm 0.62	1.70 \pm 0.18
18	Fipronil	50	6.90 \pm 2.59	2.24 \pm 0.63
19	Aftin-5	50	6.54 \pm 0.85	4.56 \pm 0.50

Table S2. Effect of fipronil metabolites and derivatives on extracellular A β_{42} production by N2a-APP695. Cells were treated with each compound (0.1 to 100 μ M) for 18 h and cell supernatants were collected for extracellular A β_{42} levels measurement by an ELISA assay and cell survival by a MTS assay. A corresponding volume of DMSO was used as a negative control. A β_{42} induction is expressed as fold change relative to fold change induced by fipronil at the indicated concentration. Concentrations at which maximum fold change was seen were selected according to solubility and toxicity limits. Average of 3 independent experiments performed in triplicate. In bold, products inducing more than a 3 fold increase of A β_{42} production.

#	Fipronil	Concentration (μ M)	Fold change relative to Fipronil induced fold change
18	Fipronil	60	1.00
18a	Fipronil enantiomer 1	30	0.94
18b	Fipronil enantiomer 2	60	1.08
20	Fipronil sulfone	30	1.21
21	Fipronil desulfinyl	30	0.57
22	Fipronil sulfide	10	0.44
23	Fipronil sulfone amide	100	0.05
24	Fipronil sulfone chloramine	100	0.07
25	Hydroxy-fipronil	10	0.03
26	Fipronil acid	100	0.07
27	Fipronil sulfide acid	100	0.12
28	Fipronil sulfide amide	100	0.09
29	Fipronil deSOCF ₃	100	0.03

Table S3. Aβ₄₂ inducing pyrazoles: physico-chemical & biological properties, toxicity and persistence in soil.

#	Pyrazole	CAS registry #	MW	Log P	Water solubility (mg/L)	LD50 (oral, rat) (mg/kg)
2	Fenpyroximate	134098-61-6	421.494	5.01	0.0231	245 (1)
3	Tebufenpyrad	119168-77-3	333.861	4.93	2.61	202-320 (2)
4	Bixafen	581809-46-3	414.2128	3.3	0.49	> 5,000 (2)
5	Fluxapyroxad	907204-31-3	381.3028	3.08	3.44	> 2,000 (2)
6	Isopyrazam	881685-58-1	359.4177	4.1 (syn), 4.4 (anti)	1.05 - 0.55 (syn-anti)	> 2,000 - 310 (syn-anti) (2)
8	Penthiopyrad	183675-82-3	359.414	4.62	1.375	> 2,000 (2)
14	Chlorantraniliprole	500008-45-7	483.1516	2.86	0.880 (2)	5,000 (1)
16	Tolfenpyrad	129558-76-5	383.8768	6.1	0.087	386
18	Fipronil	120068-37-3	417.09	4	3.78 (2)	92 (1)

#	Pyrazole	European Food Safety Authority (EFSA) (3)	Toxnet reference (1)
2	Fenpyroximate	www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3493.pdf	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/134098-61-6
3	Tebufenpyrad	www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4091.pdf	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/119168-77-3
4	Bixafen	www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2917.pdf	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/581809-46-3
5	Fluxapyroxad	www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2522.pdf	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/907204-31-3
6	Isopyrazam	www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2600.pdf	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/881685-58-1
8	Penthiopyrad	www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3111.pdf	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/183675-82-3
14	Chlorantraniliprole	www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3143.pdf	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/500008-45-7
16	Tolfenpyrad	-	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/129558-76-5
18	Fipronil	www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/praper_concl_sr65_fi	chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/120068-37-3

(1) <http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/>(2) <http://epa.gov/pesticides/>(3) http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents

#	Pyrazole	Persistence in soil (Half-life Degradation Time, DT50, days) (3)
2	Fenpyroximate	30 - 159
3	Tebufenpyrad	17.7 - 76.5
4	Bixafen	30.6 - > 1.235 (field); > 1 year (lab)
5	Fluxapyroxad	213 - 1.827
6	Isopyrazam	87.9 - 760
8	Penthiopyrad	61 - 406
14	Chlorantraniliprole	223 - 886
16	Tolfenpyrad	4
18	Fipronil	32 - 346

#	Pyrazole	PubChem
2	Fenpyroximate	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9576412
3	Tebufenpyrad	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86354
4	Bixafen	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11434448
5	Fluxapyroxad	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16095400
6	Isopyrazam	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/58079280
8	Penthiopyrad	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11388558
14	Chlorantraniliprole	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11271640
16	Tolfenpyrad	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10110536
18	Fipronil	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3352

Table S4. Proteomics study of fipronil sulfone- and dipropetryn- treated cells. N2a-APP695 cells were exposed for 18 h to 20 μ M fipronil sulfone, 100 μ M dipropetryn or DMSO. Up/down-regulated proteins in fipronil sulfone- and dipropetryn- treated cells, compared to DMSO-treated cells, were identified and compared. Among the 261 common proteins, 178 proteins (listed here) were either up-regulated by both treatments or down-regulated by both treatments.

Accession #	Gene	Protein name	Log2 ratio	
			Fipronil sulfone	Dipropetryn
D3YX14	Ddit3	DNA damage-inducible transcript 3 protein (Fragment)	1,9197	0,6517
Q06507	Atf4	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4	1,4811	0,4400
P01325	Ins1	Insulin-1	1,2232	0,7009
O08750	Nfil3	Nuclear factor interleukin-3-regulated protein	0,9021	0,4418
P05627	Jun	Transcription factor AP-1	0,8920	0,6101
Q3TYD4	Arsg	Arylsulfatase G	0,8768	0,3108
Q9EPQ7	Stard5	StAR-related lipid transfer protein 5	0,8648	0,3342
Q3UTD5	Gm1965	Protein Gm1965	0,8497	0,3363
O54943	Per2	Period circadian protein homolog 2	0,8203	2,8796
Q8C5W0-2	Clmn	Isoform 2 of Calmin	0,8139	1,4035
P01942	Hba	Hemoglobin subunit alpha	0,7991	0,3080
Q9QX47-4	Son	Isoform 4 of Protein SON	0,7905	0,4896
O35387	Hax1	HCLS1-associated protein X-1	0,7389	0,4880
Q8BGR2	Lrrc8d	Leucine-rich repeat-containing protein 8D	0,7114	0,5937
Q9DB73	Cyb5r1	NADH-cytochrome b5 reductase 1	0,6127	0,5699
Q640N1	Aebp1	Adipocyte enhancer-binding protein 1	0,5937	0,3561
E9Q8V6	Dennd4a	Protein Dennd4a	0,5829	0,5488
Q8CC21-2	Ttc19	Isoform 2 of Tetratricopeptide repeat protein 19, mitochondrial	0,5659	0,3363
Q8VHP6	Cdhr1	Cadherin-related family member 1	0,5600	0,3658
Q8CHQ0	Fbxo4	F-box only protein 4	0,5247	1,1096
Q8BIZ6	Snip1	Smad nuclear-interacting protein 1	0,5134	0,4365
P97333	Nrp1	Neuropilin-1	0,5134	0,8301
Q9QYA2	Tomm40	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	0,4875	0,3518
P29391	Ftl1	Ferritin light chain 1	0,4778	0,8677
E9QA62	Lmod3	Protein Lmod3	0,4750	0,6454
Q8BND4	Ddx26b	Protein DDX26B	0,4720	0,4550
P17047	Lamp2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	0,4717	0,3163
P29699	Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	0,4572	0,3613
Q99LM9	Tada1	Transcriptional adapter 1	0,4378	0,6293
Q3UL97-4	Atf7ip2	Isoform 4 of Activating transcription factor 7-interacting protein 2	0,4312	0,6583
Q9WV54	Asah1	Acid ceramidase	0,4188	0,3301
G5E8L6	Klrg2	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 2	0,4163	0,3275
Q9CQ88	Tspan31	Tetraspanin-31	0,4121	0,3319
O55187	Cbx4	E3 SUMO-protein ligase CBX4	0,4057	0,4705
D3YXJ0	Dgkh	Protein Dgkh	0,3857	0,9298
Q62302	Tex261	Protein TEX261	0,3790	0,6576
Q9CQV4	Fam134c	Protein FAM134C	0,3659	0,4648
Q3TVI8	Pbxip1	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	0,3595	0,6977
O35493	Clk4	Dual specificity protein kinase CLK4	0,3563	0,4679
F8W122	Bclaf1	Bcl-2-associated transcription factor 1	0,3533	0,3168
Q8CHH5	GLTSCR1	GLTSCR1-like protein	0,3467	0,3555
F8WJG3	Tra2b	Transformer-2 protein homolog beta	0,3372	0,4089
P21956-2	Mfge8	Isoform 2 of Lactadherin	0,3370	0,3034
Q8BHC7	Rhbdd1	Rhomboid-related protein 4	0,3294	0,3538
P20060	Hexb	Beta-hexosaminidase subunit beta	0,3218	0,4614
E9Q933	Tmem11	Transmembrane protein 11, mitochondrial	0,3212	0,3858
Q91VS8	Farp2	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2	0,3209	0,5863
Q8K094	Pvr	Poliovirus receptor	0,3171	0,5366
Q8BLG0-2	Phf20	Isoform 2 of PHD finger protein 20	0,3167	0,3424
Q62371	Ddr2	Discoidin domain-containing receptor 2	0,3121	0,5145
Q9R0H0	Acox1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	0,3044	0,3076
Q9D720	Nsmce1	Non-structural maintenance of chromosomes element 1 homolog	-0,3550	-0,3187
P11440	Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1	-0,3564	-0,6482
Q8BIG4	Fbxo28	F-box only protein 28	-0,3593	-0,4824
Q3UGP9	Lrrc58	Leucine-rich repeat-containing protein 58	-0,3603	-1,1593
Q9CYZ6	CS060	Uncharacterized protein C19orf60 homolog	-0,3626	-0,9782
Q8BXJ2	Trerf1	Transcriptional-regulating factor 1	-0,3645	-0,3214
Q8BS45	Ttc26	Tetratricopeptide repeat protein 26	-0,3657	-0,7601
G3UY19	Prc1	Protein regulator of cytokinesis 1	-0,3676	-0,4211
Q8BFR1	Zc3hav11	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1-like	-0,3772	-0,7232
Q9D1I5	Mcee	Methylmalonyl-CoA epimerase, mitochondrial	-0,3844	-0,5174
Q3UWW6	Gas2l3	GAS2-like protein 3	-0,3874	-0,3741
P11276	Fn1	Fibronectin	-0,3909	-0,6294
Q9DBY0-2	Foxp4	Isoform 2 of Forkhead box protein P4	-0,4052	-0,3259
Q9D6V8	Paip2	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2	-0,4085	-0,4730

Q9WTP2	Spry4	Protein sprouty homolog 4	-0,4087	-0,7416
Q9R210	Tfeb	Transcription factor EB	-0,4093	-0,4001
P52651	Rhox5	Homeobox protein Rhox5	-0,4126	-0,7573
Q7TMV3	Fastkd5	FAST kinase domain-containing protein 5	-0,4135	-0,4634
Q9CWU2	Zdhhc13	Palmitoyltransferase ZDHHC13	-0,4165	-0,5963
Q9D5R3	Ccdc41	Centrosomal protein of 83 kDa	-0,4165	-0,3336
P03899	Mtdn3	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3	-0,4210	-0,7193
Q8R570	Snap47	Synaptosomal-associated protein 47	-0,4236	-0,3934
Q99PM9	Uck2	Uridine-cytidine kinase 2	-0,4386	-0,6465
Q52KF3	Spire1	Protein spire homolog 1	-0,4440	-0,5759
Q9JJN6	Ctnnbip1	Beta-catenin-interacting protein 1	-0,4468	-0,3944
Q8R4Y8	Rttm	Rotatin	-0,4470	-0,3836
Q9CQF0	Mrpl11	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	-0,4553	-0,3886
Q8R034	Anapc13	Anaphase-promoting complex subunit 13	-0,4569	-0,3149
K4DI67	Ncapd3	Condensin-2 complex subunit D3	-0,4594	-0,3746
P51943	Ccna2	Cyclin-A2	-0,4605	-0,3823
Q80YQ2	Med23	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23	-0,4722	-0,3757
Q3UFG8	Frm8	FERM domain-containing protein 8	-0,4873	-0,4491
E9Q6Y8	Usp31	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	-0,4874	-0,3791
E9QL53	Cit	Citron Rho-interacting kinase	-0,4939	-0,3268
Q9JLV2-2	Trpc4ap	Isoform 2 of Short transient receptor potential channel 4-associated protein	-0,4978	-0,3800
A2A4A1	Dnajc24	DnaJ homolog subfamily C member 24	-0,4984	-0,3544
O35654	Pold2	DNA polymerase delta subunit 2	-0,5019	-0,5682
Q3TLR7	Dtl	Denticless protein homolog	-0,5023	-0,5271
Q4VBD9	Gzf1	GDNF-inducible zinc finger protein 1	-0,5058	-0,3792
O35594	Ift81	Intraflagellar transport protein 81 homolog	-0,5129	-0,3044
Q61846	Melk	Maternal embryonic leucine zipper kinase	-0,5265	-0,5338
Q9EP52	Twsg1	Twisted gastrulation protein homolog 1	-0,5303	-0,7884
Q8BPY9	Fignl1	Fidgetin-like protein 1	-0,5394	-0,4740
Q9CQA1	Trappc5	Trafficking protein particle complex subunit 5	-0,5473	-0,3451
Q9CQW9	Ifitm3	Interferon-induced transmembrane protein 3	-0,5554	-0,5662
Q9D2L9	Fam111a	Protein FAM111A	-0,5596	-0,4249
Q8BR63	Fam177a1	Protein FAM177A1	-0,5653	-0,3240
Q8BH64	Ehd2	EH domain-containing protein 2	-0,5658	-0,8432
Q9NWG9	Mageh1	Melanoma-associated antigen H1	-0,5736	-0,4172
P25322	Ccnd1	G1/S-specific cyclin-D1	-0,5762	-0,7147
Q920L1	Fads1	Fatty acid desaturase 1	-0,5763	-0,4476
Q8CHR6	Dpyd	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	-0,5807	-0,9361
Q9ESN5-3	Cenpk	Isoform 3 of Centromere protein K	-0,5933	-0,5503
H7BX14	Tsen34	tRNA-splicing endonuclease subunit Sen34	-0,5945	-0,4446
E9PXS4	Ptp4a3	Protein tyrosine phosphatase type IVA 3	-0,6032	-0,4858
Q61500	Itm2a	Integral membrane protein 2A	-0,6035	-0,8889
P60521	Gabarrap12	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	-0,6041	-0,7099
Q8BTW8	Cdk5rap1	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1	-0,6093	-0,3659
Q6P5F7-2	Ttyh3	Isoform 2 of Protein tweety homolog 3	-0,6120	-0,3621
Q8K3J1	Ndufs8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	-0,6153	-0,3118
P97477	Aurka	Aurora kinase A	-0,6195	-0,5260
Q64701	Rbl1	Retinoblastoma-like protein 1	-0,6239	-0,4754
O35668-2	Hap1	Isoform A of Huntingtin-associated protein 1	-0,6347	-0,8223
Q8CBY0	Gatc	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit C, mitochondrial	-0,6362	-0,5130
Q3TQQ9-3	CA112	Isoform 3 of Uncharacterized protein C1orf112 homolog	-0,6457	-0,4851
P41230-2	Kdm5c	Isoform 2 of Lysine-specific demethylase 5C	-0,6788	-0,5768
Q8BL43	Rassf10	Ras association domain-containing protein 10	-0,6820	-0,3869
Q8R2L5	Mrps18c	28S ribosomal protein S18c, mitochondrial	-0,7057	-0,4103
Q4G5Y1	Klhdc2	Kelch domain-containing protein 2	-0,7204	-1,4610
Q9CPP6	Ndufa5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	-0,7235	-0,4140
Q9JID9	Sh2b2	SH2B adapter protein 2	-0,7250	-0,8643
Q8BGB5	Limd2	LIM domain-containing protein 2	-0,7250	-0,6006
Q91ZD4	Vangl2	Vang-like protein 2	-0,7253	-0,3282
F8WJ72	Cdc45	Cell division control protein 45 homolog	-0,7460	-0,5989
Q99J93	Ifitm2	Interferon-induced transmembrane protein 2	-0,7868	-1,0809
P52431	Pold1	DNA polymerase delta catalytic subunit	-0,7976	-0,3728
Q9DC70	Ndufs7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	-0,7982	-0,3521
P13011	Scd2	Acyl-CoA desaturase 2	-0,8002	-0,4180
P35546-2	Ret	Isoform 2 of Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	-0,8004	-0,6998
O08573-2	Lgals9	Isoform Short of Galectin-9	-0,8014	-0,3394
Q91XX1	Pcdhgc3	Protein Pcdhgc6	-0,8043	-0,4299
G3UX71	Gstt3	Protein Gstt3	-0,8144	-0,3625
Q78YZ6-3	Scoc	Isoform 3 of Short coiled-coil protein	-0,8177	-1,0846
P52503	Ndufs6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	-0,8209	-0,4088
J3QP80	Gm5814	MCG15559	-0,8342	-0,8142
J3QNA8	Rnpepl1	Protein Rnpepl1 (Fragment)	-0,8415	-0,3391
F6RS26	Gm11639	Protein Gm11639	-0,8428	-0,3024
Q9CQO0	Smim8	Small integral membrane protein 8	-0,8440	-0,3886
G3UW58	mCG_1043768	MCG1043768	-0,8452	-1,1081
P60330	Esp1l	Separin	-0,8541	-0,7027

Q99LJ8	Nus1	Nogo-B receptor	-0,8595	-1,3301
O08919	Numb1	Numb-like protein	-0,8674	-0,3991
Q9WVF7	Pole	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	-0,8678	-0,3841
Q9D727	CF226	Uncharacterized protein C6orf226 homolog	-0,8689	-0,5693
Q9R0M8	Slc35a2	UDP-galactose translocator	-0,8701	-0,4693
Q3TTY5	Krt2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	-0,8782	-0,4920
F8VQJ3	Lamc1	Laminin subunit gamma-1	-0,8812	-0,5301
Q9D1C1	Ube2c	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	-0,8986	-0,9741
Q8JZP9	Gas2l1	GAS2-like protein 1	-0,9029	-0,4048
Q80WE4-3	Kif20b	Isoform 3 of Kinesin-like protein KIF20B	-0,9095	-0,3145
Q7TMF3	Ndufa12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	-0,9095	-0,5634
Q8VDF2-2	Uhrf1	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	-0,9311	-0,4937
E9QPX3	Ndufs4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	-0,9434	-0,4930
Q99M54	Cdca3	Cell division cycle-associated protein 3	-0,9471	-0,3083
Q91WD5	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	-0,9561	-0,4364
Q504M2	Pdp2	MCG53395	-0,9703	-0,3752
Q9Z1P6	Ndufa7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	-0,9920	-0,8845
Q91VD9	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	-1,0114	-0,5372
Q99N93	Mrpl16	39S ribosomal protein L16, mitochondrial	-1,0907	-0,3029
Q9DCJ5	Ndufa8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	-1,1312	-0,3866
Q6PFD6	Kif18b	Kinesin-like protein KIF18B	-1,1607	-0,4428
Q8CIB9	Esco2	N-acetyltransferase ESCO2	-1,1936	-0,8128
G3UYJ7	Gm20441	Protein Gm20441 (Fragment)	-1,2051	-0,6467
Q8R3W2	0610009B22Rik	MCG6979, isoform CRA_a	-1,2118	-0,4141
P11157	Rrm2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	-1,2694	-1,6044
Q9CQ75	Ndufa2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	-1,2732	-0,3923
Q99LC3	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	-1,2782	-0,5846
P15105	Glul	Glutamine synthetase	-1,3419	-0,3827
H3BJJ1	Gmnn	Geminin (Fragment)	-1,3547	-1,5922
G3UY65	Ccnb1	G2/mitotic-specific cyclin-B1	-1,3575	-1,0960
A2AP32	Ndufb6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	-1,3751	-0,3563
Q9D9L5	Actr2	Actin-related protein T2	-1,4152	-0,4080
B1ARW4	Ndufs5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5 (Fragment)	-1,5601	-0,9973
Q9CQ91	Ndufa3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3	-1,6210	-0,4345
P04184	Tk1	Thymidine kinase, cytosolic	-1,8552	-0,3220
Q9CQX4	Paf	PCNA-associated factor	-2,1761	-2,0555
Q8BK30	Ndufv3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	-2,7794	-1,1467

Table S5. Fipronil and the Lipinski rule of 5. Violations of the rule are indicated in bold.

Favorable parameters according to the Lipinski rule of 5	Fipronil (18)	Fipronil sulfone (20)	Fipronil desulfinyl (21)
Molecular mass: ≤ 500	437.15	453.15	389.08
Log P *: < 5	4.5	4.7	4.6
H-bond donors (OH & NH): ≤ 5	1	1	1
H-bond acceptors (O & N): ≤ 10	11	11	9

* P is the octanol-water partition coefficient

3. Supplementary Figures

Figure S1. Short-term time-course of fipronil and fipronil sulfone pharmacokinetics in mice following a single oral administration of fipronil. Fipronil (10 mg/kg) was administrated by oral gavage at time 0. Animals were sacrificed at various times and plasma samples were collected at various time-points during a 72 hr period. Fipronil and fipronil sulfone levels were quantified by LC-MS/MS.

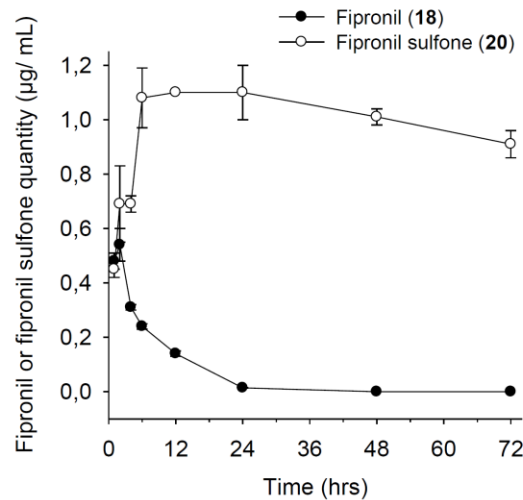


Figure S2. Time-course of fipronil and fipronil sulfone pharmacokinetics and bioaccumulation in plasma and brain (A) and epididymal adipose tissue (B) following a single oral administrations of fipronil in Sprague Dawley rat. Fipronil (10 mg/kg) was administrated by oral gavage at time 0. Animals were sacrificed at various times up to 336 hrs (14 days) and plasma, epididymal adipose tissue and brain were collected. Fipronil and fipronil sulfone levels were quantified by LC-MS/MS.

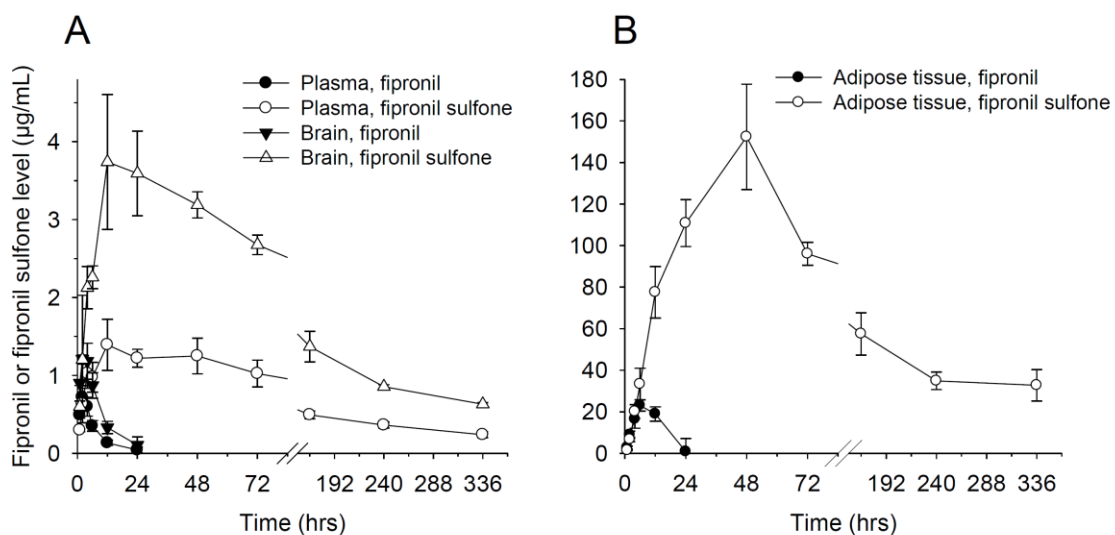
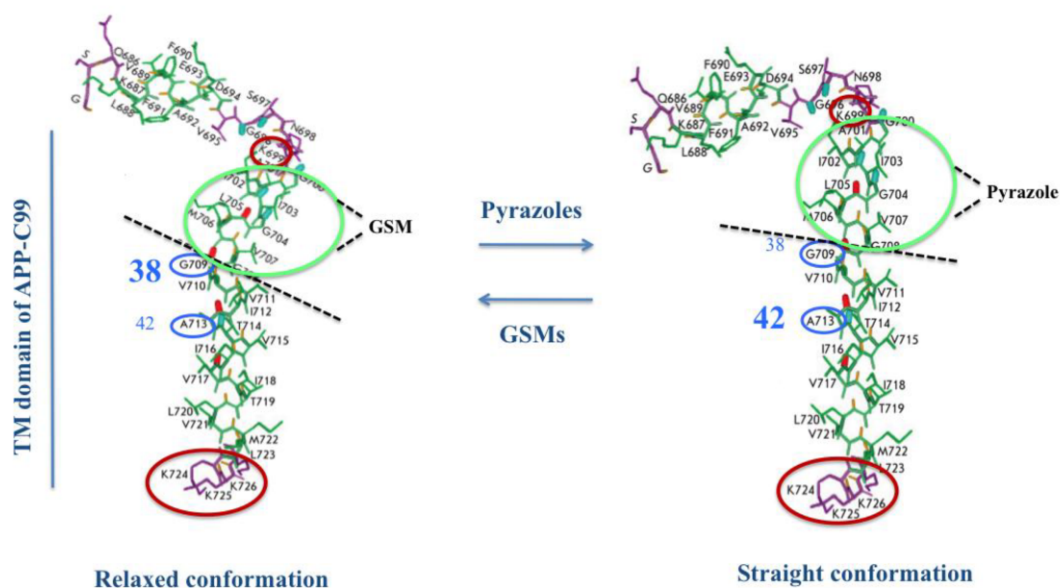


Figure S3. Model for the mechanism by which Pyrazole compounds could modulate A β production towards A β ₄₂. In this model, the binding of γ -secretase modulating compounds (GSM) on a motif (700-GAIIGLMV-707; green ellipse; G700 of full length A β PP corresponds to glycine 29 of A β) located at the N-terminus of the A β PP-C99 trans-membrane domain (TMD) induces a relaxed conformation, which makes the position 38 accessible to the catalytic site of γ -secretase and consequently results in increased A β ₃₈ and reduced A β ₄₂ (left). In contrast, the A β ₄₂-raising pyrazoles would bind to the GSM binding motif and straighten the TMD of A β PP (right), with the consequence being a lesser accessible position 38 to γ -secretase and increased A β ₄₂ and reduced A β ₃₈ productions (right). Note the lysine residues (red ellipses), which are responsible for the positioning of the A β PP transmembrane domain in the lipid bilayer, and which also represent possible pyrazole-binding sites affecting the positioning of the TMD and the specificity of processing by γ -secretase (model adapted from PDB: 2LLM [15]).



4. Supplementary References

- [1] McMahan RL, Strynar MJ, McMillan L, DeRose E, Lindstrom AB (2016) Comparison of fipronil sources in North Carolina surface water and identification of a novel fipronil transformation product in recycled wastewater. *Sci Total Environ* **569-570**, 880-887.
- [2] Vasylieva N, Barnych B, Wan D, El-Sheikh EA, Nguyen HM, Wulff H, McMahan R, Strynar M, Gee SJ, Hammock BD (2017) Hydroxy-fipronil is a new urinary biomarker of exposure to fipronil. *Environ Int* **103**, 91-98.
- [3] Hochard A, Oumata N, Bettayeb K, Gloulou O, Fant X, Durieu E, Buron N, Porceddu M, Borgne-Sanchez A, Galons H, Flajolet M, Meijer L (2013) Aftins increase amyloid- β 42, lower amyloid- β 38 and do not alter amyloid- β 40 extracellular production in vitro: Toward a chemical model of Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* **35**, 107-120.
- [4] Kounnas MZ, Danks AM, Cheng S, Tyree C, Ackerman E, Zhang X, Ahn K, Nguyen P, Comer D, Mao L, Yu C, Pleynt D, Digregorio PJ, Velicelebi G, Stauderman KA, Comer WT, Mobley WC, Li YM, Sisodia SS, Tanzi RE, Wagner SL (2010) Modulation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* **67**, 769-780.
- [5] Kretner B, Fukumori A, Gutsmedl A, Page RM, Luebbers T, Galley G, Baumann K, Haass C, Steiner H (2011) Attenuated Abeta42 responses to low potency gamma-secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds. *J Biol Chem* **286**, 15240-15251.
- [6] Mertens J, Stüber K, Wunderlich P, Ladewig J, Kesavan JC, Vandenberghe R, et al. 2013. APP processing in human pluripotent stem cell-derived neurons is resistant to NSAID-based γ -secretase modulation. *Stem Cell Reports* **1**, 491-498.
- [7] Araki Y, Kawano T, Taru H, Saito Y, Wada S, Miyamoto K, Kobayashi H, Ishikawa HO, Ohsugi Y, Yamamoto T, Matsuno K, Kinjo M, Suzuki T (2007) The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *EMBO J* **26**, 1475-1486.
- [8] Hata S, Fujishige S, Araki Y, Kato N, Araseki M, Nishimura M, Hartmann D, Saftig P, Fahrenholz F, Taniguchi M, Urakami K, Akatsu H, Martins RN, Yamamoto K, Maeda M, Yamamoto T, Nakaya T, Gandy S, Suzuki T (2009) Alcadein cleavages by amyloid beta-precursor protein (APP) alpha- and gamma-secretases generate small peptides, p3-Alcs, indicating Alzheimer disease-related gamma-secretase dysfunction. *J Biol Chem* **284**, 36024-36033.
- [9] Dimitrov M, Alattia J-R, Lemmin T, Lehal R, Fligier A, Houacine J, Hussain I, Radtke F, Dal Peraro M, Behr D, Fraering PC (2013) Alzheimer's disease mutations in APP but not γ -secretase modulators affect epsilon-cleavage-dependent AICD production. *Nat Commun* **4**, 2246.
- [10] Gerber H, Wu F, Dimitrov M, Garcia Osuna GM, Fraering PC (2017) Zinc and copper differentially modulate amyloid precursor protein processing by γ -secretase and amyloid- β peptide production. *J Biol Chem* **292**, 3751-3767.
- [11] Mehta PD, Pirttilä T (2005) Increased cerebrospinal fluid A beta38/A beta42 ratio in Alzheimer disease. *Neurodegener Dis* **2**, 242-245.
- [12] Potempska A, Mack K, Mehta P, Kim KS, Miller DL (1999) Quantification of sub-femtomole amounts of Alzheimer amyloid beta peptides. *Amyloid* **6**, 14-21.
- [13] Leinenbach A, Pannee J, Dülffer T, Huber A, Bittner T, Andreasson U, Gobom J, Zetterberg H, Kobold U, Portelius E, Blennow K; IFCC Scientific Division Working Group on CSF proteins (2014) Mass spectrometry-based candidate reference measurement procedure for quantification of amyloid- β in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* **60**, 987-994.
- [14] Pannee J, Portelius E, Oppermann M, Atkins A, Hornshaw M, Zegers I, Höjrup P, Minthon L, Hansson O, Zetterberg H, Blennow K, Gobom J (2013) A selected reaction monitoring (SRM)-based method for absolute quantification of A β -38, A β -40, and A β 42 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients and healthy controls. *J Alzheimers Dis* **33**, 1021-1032.
- [15] Manousopoulou A, Gatherer M, Smith C, Nicoll JAR, Woelk CH, Johnson M, Kalaria R, Attems J, Garbis SD, Carare RO (2017) Systems proteomic analysis reveals that clusterin and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 increase in leptomeningeal arteries affected by cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* **43**, 492-504.
- [16] Manousopoulou A, Koutmani Y, Karaliota S, Woelk CH, Manolagos ES, Karalis K, Garbis SD (2016) Hypothalamus proteomics from mouse models with obesity and anorexia reveals therapeutic targets of appetite regulation. *Nutr Diabetes* **6**, e204.
- [17] Manousopoulou A, Saito S, Yamamoto Y, Al-Daghri NM, Ihara M, Carare RO, Garbis SD (2016) Hemisphere asymmetry of response to pharmacologic treatment in an Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis* **51**, 333-338.

- [18] Manousopoulou A. Woo J. Woelk CH. Johnston HE. Singhanian A. Hawkes C. Garbis SD. Carare RO (2015) Are you also what your mother eats? Distinct proteomic portrait as a result of maternal high-fat diet in the cerebral cortex of the adult mouse. *Int J Obes (Lond)* **39**. 1325-1328.

II. Inhibition pharmacologique de DYRK1A, une protéine kinase impliquée dans la maladie d'Alzheimer

DYRK1A étant une cible intéressante et prometteuse dans le traitement de la MA, de la T21 et de nombreuses autres pathologies, le développement d'inhibiteurs de cette kinase est donc un des enjeux de ManRos Therapeutics.

A. Inhibition, *in vitro*, de l'activité kinase de DYRK1A par les leucettines

Par souci de confidentialité, en dehors de la leucettamine B et la leucettine L41, les structures chimiques de cette famille de molécules ne seront pas communiquées dans cette thèse et leur nom sera codé.

Les leucettines sont synthétisées par l'équipe du Dr. Bazureau à l'université de Rennes, en collaboration avec ManRos Therapeutics. Leur efficacité est d'abord testée *in vitro* par le biais de tests kinases (tests réalisés à la Station Biologique de Roscoff) puis en tests cellulaires, avant que les molécules sélectionnées ne soient testées *in vivo* sur des modèles de souris et de rats (tests réalisés par différentes collaborations, notamment par l'équipe du Dr. Hérault à l'IGBMC de Strasbourg). A ce jour, plus de 570 leucettines ont été synthétisées, la leucettine L41 étant la mieux caractérisée de la famille.

1. Absence d'effet protecteur de la leucettine E1 contre la mort cellulaire induite par le glutamate

La leucettine E1 a une structure chimique jugée prometteuse et de bons résultats lors des tests kinases quant à l'inhibition de DYRK1A. Nous nous sommes donc intéressés à son efficacité lors de tests cellulaires. Pour cela, des cellules SH-SY5Y, de neuroblastome humain, surexprimant l'isoforme 4R de la protéine Tau ont été traitées pendant 6h avec des doses croissantes de leucettine E1. La même

expérience a été réalisée en parallèle avec la leucettine L41 à titre de contrôle (figure 20). Les phosphorylations de la Ser202, de la Thr205 et notamment de la Thr212 de Tau traduisent l'activité de DYRK1A. La leucettine L41 inhibe l'activité de DYRK1A dès de faibles concentrations, en revanche, ce blocage n'est pas aussi net pour la leucettine E1 pour laquelle l'inhibition de la kinase est moins visible, même à de forte concentration. Cependant, la leucettine E1 montre des résultats encourageants sur les modèles animaux.

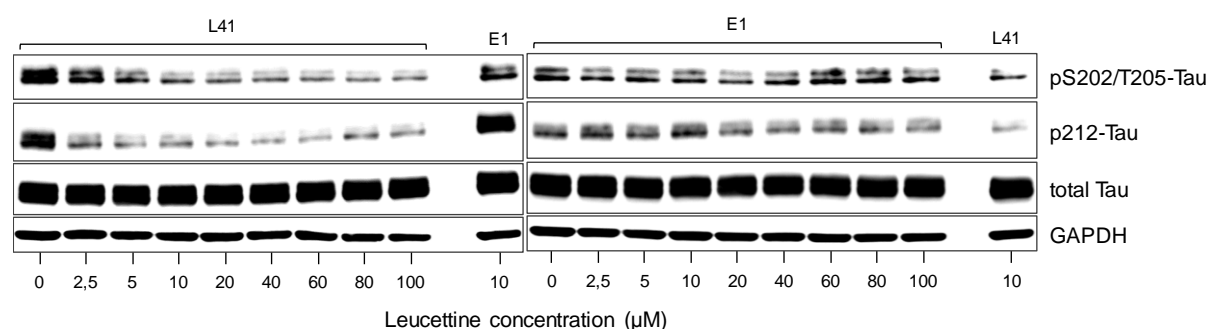


Figure 20 : Inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par les leucettines L41 et E1. Les cellules SH-SY5Y-Tau4R ont été exposées à des doses croissantes de leucettines L41 ou E1 pendant 6h. Le niveau des phosphorylations de la Ser202, de la Thr205 et de la Thr212 de la protéine Tau, reflétant l'activité kinase de DYRK1A, ont été évalué par western blotting, ainsi que l'expression de la protéine Tau total. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

Par ailleurs, de précédentes études ont démontré la capacité de la leucettine L41 à protéger les cellules contre la mort cellulaire induite par le glutamate.²⁷⁸ Nous avons cherché à savoir si la leucettine E1 possède ces mêmes propriétés. Pour cela, des cellules HT22, de neuroblastome murin, ont été exposées à 10 mM de glutamate et à des quantités croissantes de leucettines L41 ou E1 pendant 24 heures (figure 21). Contrairement à la leucettine L41, la leucettine E1 ne présente aucun effet protecteur contre la toxicité induite par le glutamate, même à des concentrations relativement élevées.

Le produit n'ayant pas l'effet escompté lors des différents tests cellulaires, le développement de la famille de molécules s'est ensuite tourné vers d'autres leucettines.

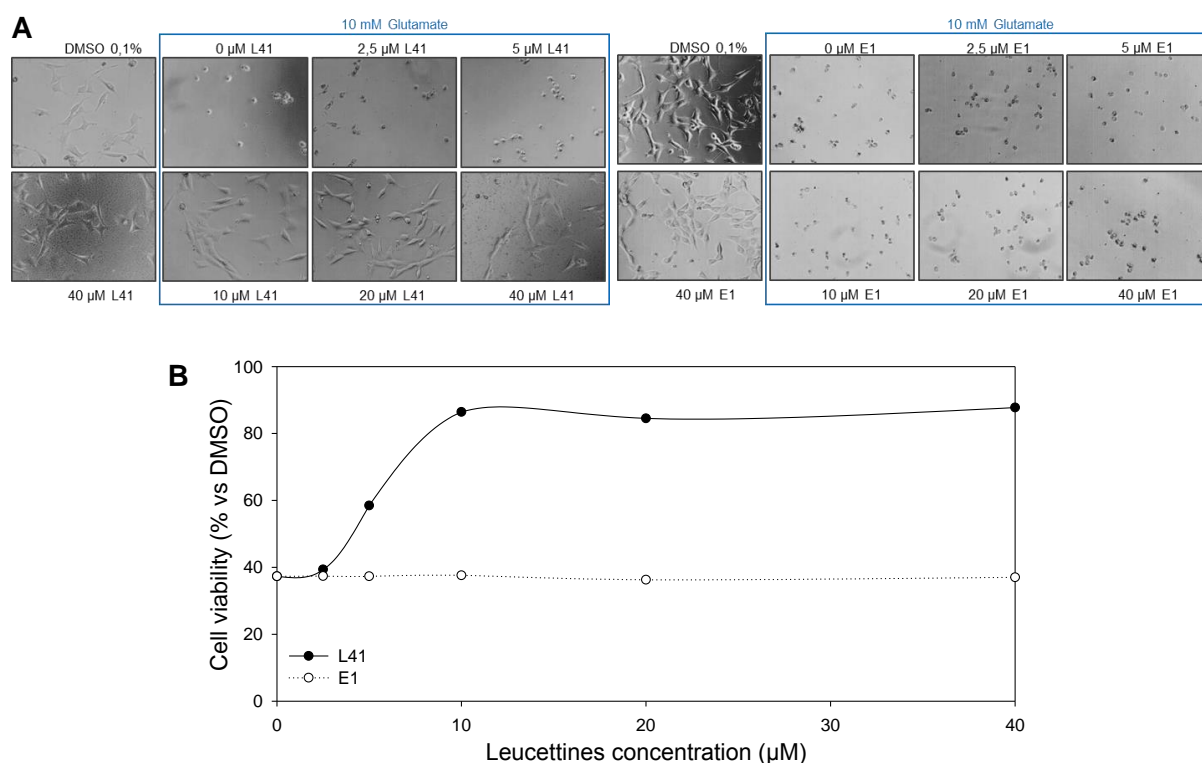


Figure 21 : Absence d'effet protecteur de la leucettine E1 contre la mort cellulaire induite par le glutamate. Les cellules HT22 ont été exposées à 10 μM de Glutamate et à des doses croissantes de leucettines L41 ou E1 pendant 24h. L'aspect microscopique des cellules ont été observé au grossissement x100 (A) et leur viabilité a été mesurée (B).

2. Mise en place d'un nouveau test cellulaire

Afin de confirmer l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par les leucettines, nous avons souhaité mettre en place un second test cellulaire. Grâce à une donation du Dr. Becker, nous disposons de cellules SY-SY5Y surexprimant de manière conditionnelle DYRK1A active (D1A) ou inactive (*kinase dead*, KD).³⁵⁸ Le principe est donc le suivant : surexprimer la kinase afin de mieux visualiser son inhibition.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer la quantité de doxycycline à utiliser pour une induction correcte de DYRK1A dans ce modèle. Ainsi, les cellules SH-SY5Y-D1A et SH-SY5Y-KD ont été incubées en présence de différentes concentrations de doxycycline pendant 6h (figure 22). Pour induire DYRK1A, 0,5 μg/mL de doxycycline semblent suffisant. Par mesure de sécurité, la concentration à 1 μg/mL a été choisie pour les futures expériences. Notons que lorsque la kinase active est exprimée, la cycline D1 est phosphorylée au niveau de sa Thr286, ce qui n'est pas le cas de la kinase inactive. Ceci démontre le rôle

de DYRK1A quant à cette phosphorylation. De plus, cela est corrélé à la diminution de l'expression de la cycline D1 totale. En effet, comme de nombreuses autres protéines, sa phosphorylation induit sa dégradation.

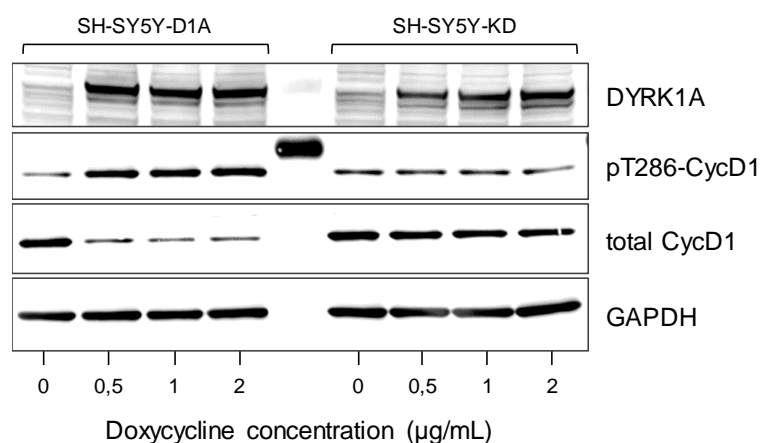


Figure 22 : Induction de DYRK1A, par la doxycycline, dans les cellules SH-SY5Y-D1A et SH-SY5Y-KD. Les cellules ont été exposées à 0,5, 1 ou 2 µg/mL de doxycycline ou à de l'eau pendant 6h. Le niveau de phosphorylation de la Thr286 de la cycline D1, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de la cycline D1 et de DYRK1A a été évaluée par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

Nous avons ensuite voulu vérifier le potentiel inhibiteur de la leucettine L41 dans ce système. Un co-traitement des cellules SH-SY5Y-D1A et SH-SY5Y-KD a été réalisé avec ou sans doxycycline et avec une dose croissante de leucettine L41 (figure 23). L'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par la molécule est visible dès 0,3 µM dans les SH-SY5Y-D1A. Une légère variation est également visible dans les SH-SY5Y-KD. Cette même variation est observée dans les deux types cellulaires en absence de doxycycline. Cela s'explique par la faible présence de DYRK1A endogène et fonctionnelle dans ces cellules.

Afin d'améliorer ce test, nous avons étudié le temps d'exposition optimal à la doxycycline (figure 24). Une incubation de 24 heures a été retenue pour la suite des tests.

Dans ce même objectif, nous avons ensuite évalué le meilleur temps d'exposition aux leucettines (figure 25). De même, un traitement de 24 heures a été validé.

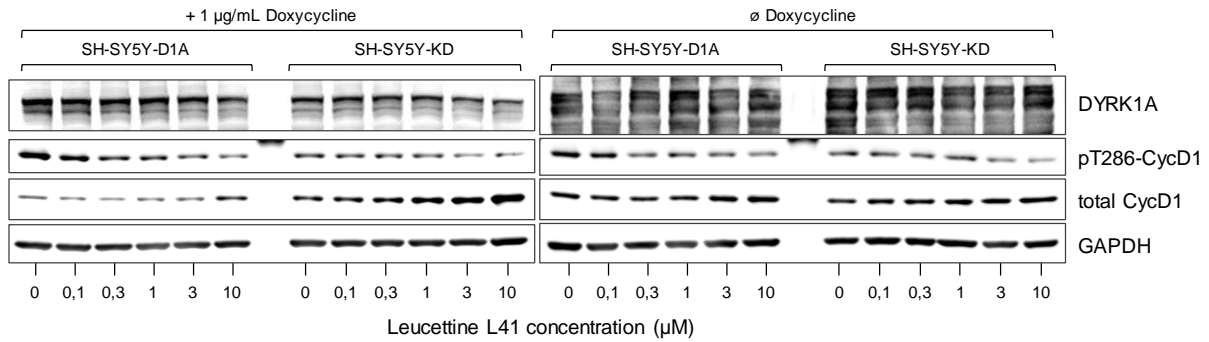


Figure 23 : Inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par la leucettine L41 de manière dose-dépendante. Les cellules SH-SY5Y-D1A et SH-SY5Y-KD ont été exposées à 1 µg/mL de doxycycline pendant 1h, puis différentes concentrations de leucettine L41 ont été ajoutées pour 6h supplémentaires. Le niveau de phosphorylation de la Thr286 de la cycline D1, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de la cycline D1 et de DYRK1A a été évaluée par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

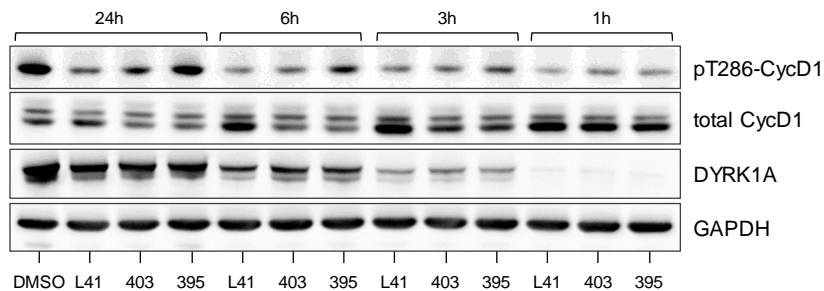


Figure 24 : Détermination du temps optimal d'exposition à la doxycycline. Les cellules SH-SY5Y-D1A ont été exposées à 1 µg/mL de doxycycline pendant 1, 3, 6 ou 24 heures. Les leucettines L41, 403 ou 395 ont ensuite été ajoutées à une concentration finale de 10 µM pour 6 heures supplémentaires. Étant inactive, la leucettine 395 a été utilisée en contrôle, tout comme le DMSO. Le niveau de phosphorylation de la Thr286 de la cycline D1, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de la cycline D1 et de DYRK1A a été évaluée par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

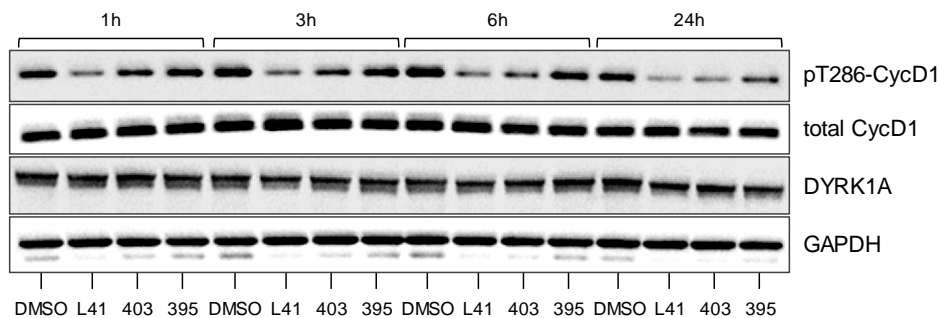


Figure 25 : Détermination du temps optimal d'exposition aux leucettines. Les cellules SH-SY5Y-D1A ont été exposées à 1 µg/mL de doxycycline pendant 24 heures. Les leucettines L41, 403 ou 395 ont ensuite été ajoutées à une concentration finale de 10 µM pour 1, 3, 6 ou 24 heures

supplémentaires. Le DMSO a été utilisé en contrôle. Le niveau de phosphorylation de la Thr286 de la cycline D1, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de la cycline D1 et de DYRK1A a été évaluée par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

3. Screening des leucettines : quelques exemples

Disposant de deux tests cellulaires, le potentiel d'inhibition de nombreuses leucettines a été contrôlé. Des études de dose-réponse ont été réalisées pour les leucettines considérées comme actives. A titre d'exemple, le résultat de quelques leucettines est présenté en figure 26.

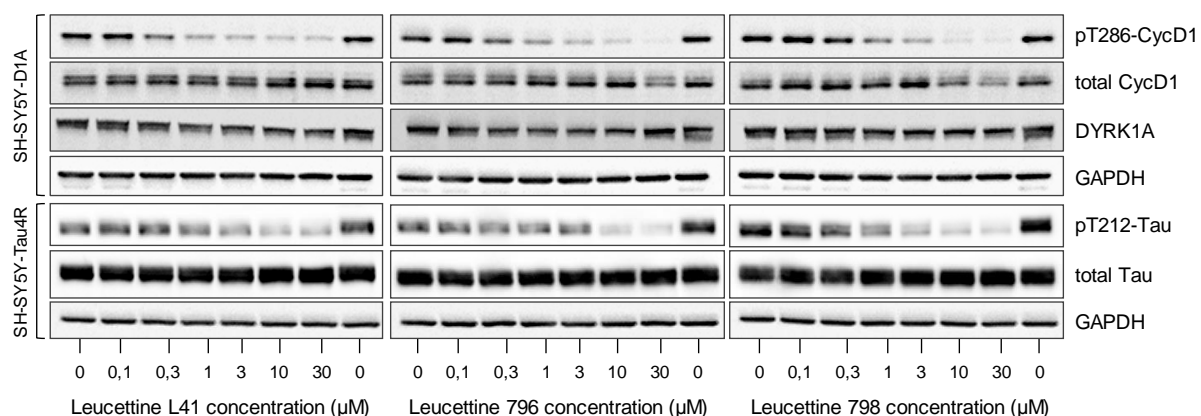


Figure 26 : Inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par quelques leucettines de manière dose-dépendante. Les cellules SH-SY5Y-D1A ont été exposées à 1 $\mu\text{g/mL}$ de doxycycline pendant 24 heures puis 0 à 30 μM de différentes leucettines ont été ajoutés pour 24 heures supplémentaires. Le niveau de phosphorylation de la Thr286 de la cycline D1, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de la cycline D1 et de DYRK1A a été évaluée par western blotting. Les cellules SH-SY5Y-Tau4R ont été exposées à 0 à 30 μM de différentes leucettines pendant 6 heures. Le niveau de phosphorylation de la Thr212 de Tau, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de Tau a été évaluée par western blotting. Pour les deux traitements, l'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

Certaines nouvelles leucettines semblent aussi efficaces que la leucettine L41. Le même effet inhibiteur est observé sur les sites T212 de Tau et T286 de la cycline D1 phosphorylés par DYRK1A. Ces deux nouvelles leucettines, présentées en figure 26, semblent néanmoins diminuer légèrement l'expression de la cycline D1 lors de traitement à 30 μM . Des efforts sont encore à fournir quant à connaissance des cibles des leucettines afin d'optimiser leur structure.

B. Analyse de la capacité des RCZ à inhiber, *in vitro*, l'activité kinase de DYRK1A

Par souci de confidentialité, l'origine précise et les structures chimiques de ces molécules ne seront pas communiquées dans cette thèse et leur nom sera codé.

Lors d'études sur une plante utilisée en médecine traditionnelle asiatique, plusieurs composés ont été extraits. L'un d'entre eux présentant une inhibition importante de DYRK1A, ManRos Therapeutics a lancé un projet visant à synthétiser ce composé et à l'améliorer, formant ainsi la famille des RCZ.

Après la mise au point de la méthode de synthèse de la RCZ (équivalent de la molécule naturelle), l'équipe de chimie de ManRos Therapeutics, en collaboration avec l'équipe du Pr. Hervé Galons à l'Université Paris Descartes, s'est penchée sur l'optimisation de cette molécule. Jusqu'à présent, plus d'une douzaine de molécules différentes ont été synthétisées. Leurs propriétés d'interaction avec un panel de kinases ont été testées à la Station Biologique de Roscoff et les tests cellulaires ont été réalisés à ManRos Therapeutics.

Les tests kinases montrent que les RCZ sont très spécifique de DYRK1A. Dans un premier temps, afin de s'assurer du potentiel d'inhibition de la RCZ originelle (RCZ-2), les cellules SH-SY5Y surexprimant DYRK1A fonctionnelle (D1A) ou la kinase inactive (*kinase dead*, KD) ont été exposées à une gamme de RCZ-2 pendant 6 heures (figure 27). Une inhibition de 56% de la phosphorylation de la cycline D1 est observée à 100 μ M. Ce résultat est encourageant bien qu'insuffisant. En effet la concentration nécessaire de RCZ-2 pour inhiber l'activité kinase est trop élevée pour poursuivre l'étude de cette molécule vers un candidat médicament.

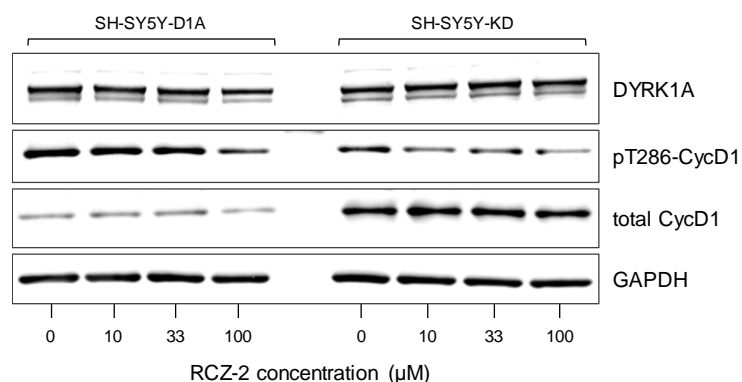


Figure 27 : inhibition dose-dépendante de DYRK1A par la RCZ-2. Les cellules SH-SY5Y-D1A et SH-SY5Y-KD ont été exposées à 1 $\mu\text{g/mL}$ de doxycycline pendant 24h, puis différentes concentrations de RCZ-2 ont été ajoutées pour 24h supplémentaires. Le niveau de phosphorylation de la Thr286 de la cycline D1, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de la cycline D1 et de DYRK1A a été évaluée par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

Un panel de RCZ a ensuite été testé sur les cellules SH-SY5Y-Tau4R, surexprimant l'isoforme 4R de la protéine Tau, et sur les cellules SH-SY5Y-D1A. Un test de viabilité démontre que les molécules testées ne sont pas toxiques (figure 28). Cependant, contrairement aux résultats attendus après les tests kinases montrant leur affinité et leur spécificité pour DYRK1A, des quantités importantes de RCZ sont nécessaires à l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A dans les cellules (figure 29). Se pose alors la question de la capacité des RCZ testées à pénétrer les cellules. Par ailleurs, certaines RCZ diminuant la phosphorylation de la cycline D1, diminuent aussi l'expression de DYRK1A (figure 29).

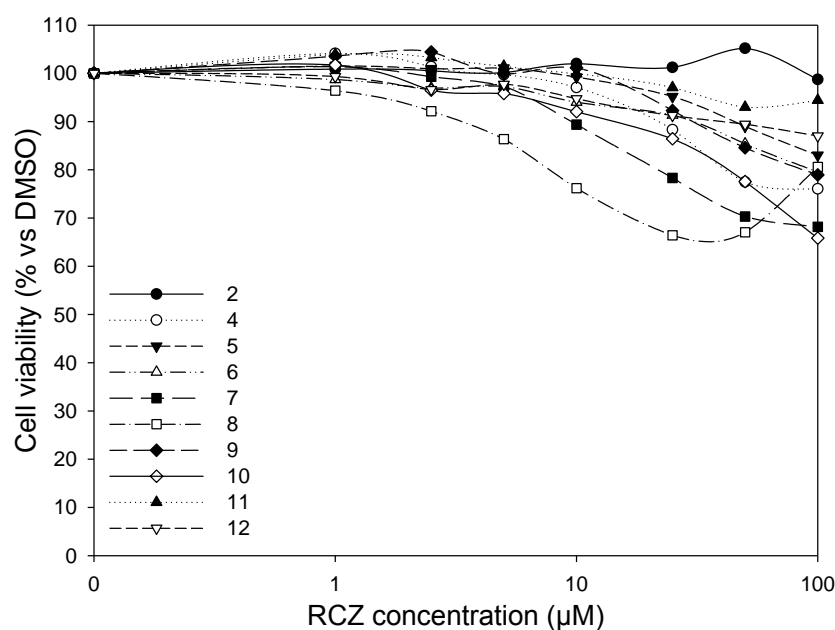


Figure 28 : Toxicité de certaines RCZ. Les cellules SH-SY5Y-Tau4R ont été exposées à différentes concentrations de RCZ pendant 48h. La viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTS.

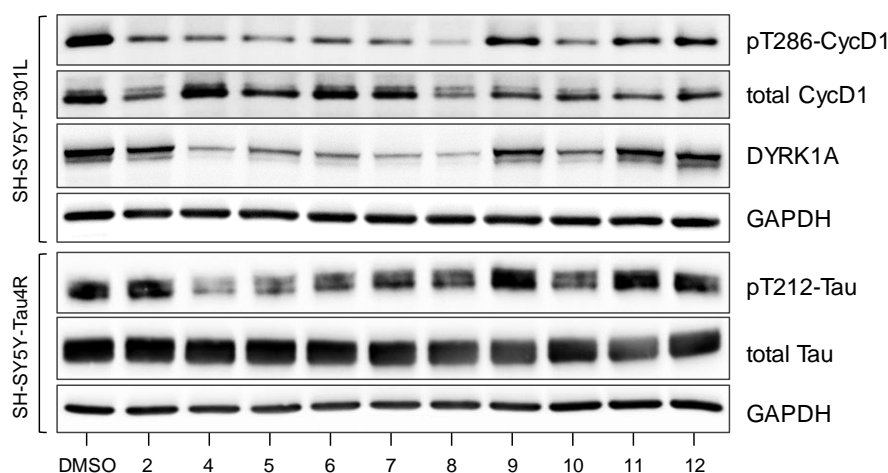


Figure 29 : Screening de certaines RCZ quant à leur inhibition de l'activité kinase de DYRK1A.

Les cellules SH-SY5Y-D1A ont été exposées à 1 μg/mL de doxycycline pendant 24 heures puis 100 μM de différentes RCZ ont été ajoutés pour 24 heures supplémentaires. Le niveau de phosphorylation de la Thr286 de la cycline D1, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de la cycline D1 et de DYRK1A a été évaluée par western blotting. Les cellules SH-SY5Y-Tau4R ont été exposées à 0 à 30 μM de différentes leucettines pendant 6 heures. Le niveau de phosphorylation de la Thr212 de Tau, traduisant l'activité kinase de DYRK1A, ainsi que l'expression de Tau a été évaluée par western blotting. Pour les deux traitements, l'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

C. Inhibition, in vitro, de l'activité kinase de DYRK1A par les polyandrocarpamines

Les polyandrocarpamines sont des molécules naturelles issues d'ascidies marines dont la structure ressemble aux leucettines. Leur activité sur DYRK1A a été découverte lors du screening de nombreuses molécules à travers un test kinases. Le test mis en place avec les leucettines, quant à la détection de l'activité de DYRK1A intracellulaire, a également été utilisé pour tester l'effet des polyandrocarpamines. Après une étude de dose-réponse des composés actifs, la meilleure dose efficace a été conservée. Un article a été rédigé et a été soumis le 30 août au journal « Marine drugs ». Ma contribution a été de tester les effets des polyandrocarpamines et d'autres aminoimidazolinones sur la phosphorylation de la Thr286 de la cycline D1 dans le système cellulaire décrit ci-dessus.

Article : « Marine derived 2-aminoimidazolinone alkaloids.

Leucettamine B -related polyandrocarpamines inhibit mammalian and protozoan DYRK & CLK kinases. »

Mar. Drugs **2017**, *x*, 1-x manuscripts

Full Original Paper

Marine derived 2-aminoimidazolinone alkaloids. Leucettamine B -related polyandrocarpamines inhibit mammalian and protozoan DYRK & CLK kinases.

Nadège LOAËC^{1,2}, Eletta ATTANASIO¹, Benoît VILLIERS¹, Emilie DURIEU¹, Tania TAHTOUH¹, Morgane CAM¹, Rohan A. DAVIS³, Aline ALENCAR⁴, Mélanie ROUE⁵, Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI⁵, Peter PROKSCH⁶, Emmanuelle LIMANTON⁷, Solène GUIHENEUF⁷, François CARREAUX⁷*, Jean-Pierre BAZUREAU⁷*, Michelle KLAUTAU⁴*, and Laurent MEIJER¹*

1. ManRos Therapeutics, Perharidy Research Center, 29680 Roscoff, Bretagne, FRANCE.
2. Station Biologique de Roscoff, CNRS, ‘Protein Phosphorylation and Human Disease’ group, Place G. Teissier, 29680 Roscoff, Bretagne, FRANCE.
3. Griffith Institute for Drug Discovery, Griffith University, Brisbane, Queensland 4111, AUSTRALIA
4. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia - Departamento de Zoologia, Av. Carlos Chagas Filho 373 - CCS - Bloco A - Sala A0-100, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, BRASIL.
5. Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, UMR 7245 CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, 57 rue Cuvier (C.P. 54), 75005 Paris, France.
6. Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, GERMANY.
7. Université de Rennes 1, Institut des Sciences Chimiques de Rennes, ISCR UMR CNRS 6226, Groupe Chimie Organique et Interfaces (CORINT), Bât. 10A, Campus de Beaulieu, Avenue du Général Leclerc, CS 74205, 35042 Rennes cedex, Bretagne, FRANCE.

*** Correspondence should be addressed to:**

Biology: L. Meijer, <meijer@manros-therapeutics.com>

Chemistry: F. Carreaux, <francois.carreaux@univ-rennes1.fr>

& J.P. Bazureau, <jean-pierre.bazureau@univ-rennes1.fr>

Sponge phylogeny: M. Klautau, <mklautau@biologia.ufrj.br>

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: A large diversity of 2-aminoimidazolone alkaloids are produced by various marine invertebrates, especially by the marine Calcareous sponges *Leucetta* and *Clathrina*. The phylogeny of these sponges and the wide scope of 2-aminoimidazolinone alkaloids they produce are reviewed in this article. The origin (invertebrate cells, associated microorganisms, or filtered plankton), physiological functions, and natural molecular targets of these alkaloids are largely unknown. Following the identification of leucettamine B as an inhibitor of selected protein kinases, we synthesized a family of analogues, collectively named leucettines, as potent inhibitors of DYRKs (dual-specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases) and CLKs (cdc2-like kinases) and potential pharmacological leads for the treatment of several diseases, including Alzheimer's disease and Down syndrome. We here assembled a small library of marine sponge- and ascidian-derived 2-aminoimidazolinone alkaloids, along with several synthetic analogues, and tested them on a panel of mammalian and protozoan kinases. Polyandrocarpamines A and B were found to be potent and selective inhibitors of DYRKs and CLKs. They inhibited cyclin D1 phosphorylation on a DYRK1A phospho-site in cultured cells. 2-Aminoimidazolinones thus represent a promising chemical scaffold for the design of potential therapeutic drug candidates acting as specific inhibitors of disease-relevant kinases, and possibly other disease-relevant targets.

Keywords: marine sponge, Porifera, Calcarea, ascidian, *Polyandrocarpa*, 2-aminoimidazolinone alkaloids, leucettamine B, leucettine, polyandrocarpamines, protein kinases, DYRK, CLK, kinase inhibitor, Alzheimer's disease, Down syndrome.

1. Introduction

Protein kinases catalyze the phosphorylation of proteins on serine, threonine and tyrosine residues [1]. They represent a large family of intracellular regulators which, after their initial discovery by Edwin Krebs and Edmund Fisher in the 1950's [2], has seen massive research investment on their functions and regulations. The human kinome comprises 518 kinases, many of which display some abnormal activity or deregulation in human disease. This prompted both academic and pharmaceutical laboratories to search for, optimize, characterize and develop pharmacological inhibitors of selected disease-relevant protein kinases. As a matter of fact, kinases have become the leading therapeutic target in the pharmaceutical industry, before G-protein coupled receptors, and over 30 inhibitors have already reached the clinical market [1, 3, 4]. Although many inhibitors were initially derived from natural products, all drug candidates are chemically synthesized at some stage of their development towards a therapeutic drug.

During a general screen for inhibitors of cell signaling and cell cycle control kinases, we identified the marine sponge product leucettamine B as a weak inhibitor of various protein kinases [5, 6]. Following this initial discovery, a large number of analogues and derivatives were synthesized and optimized as kinase inhibitors, especially as inhibitors of the DYRKs (dual-specificity, tyrosine

regulated kinases) and CLKs (cdc2-like kinases) kinase families. Leucettamine B derived inhibitors are collectively named Leucettines [6, 7]. These inhibitors have a potential as drug candidates for the treatment of cognitive disorders associated with Down syndrome (DS) and Alzheimer's disease (AD), but also for some cancers, inflammation, diabetes, etc...

Leucettamine B was initially identified in the marine, calcareous sponge *Leucetta microraphis* [8]. The physiological function of this marine alkaloid is unknown, as is the biosynthetic pathway leading its production. Furthermore, whether leucettamine B is produced by the sponge itself or by some associated microorganisms remains to be determined. Interestingly leucettamine B shows a central 2-aminoimidazolin-4-one scaffold shared by several marine products produced by various marine sponges, most of which belonging to the class Calcarea, and by other marine invertebrates, such as ascidians and nudibranchs (Figure 1). Several extensive reviews on these marine alkaloids [9-11] and 2-aminoimidazoles in general [12] have been recently published. We thought it might be interesting to obtain some of these leucettamine B related natural products to evaluate them as potential kinase inhibitors. This was also an opportunity to review the sponge species producing such molecules, with particular emphasis on *Leucetta* and *Clathrina* species, as well as the wide scope of aminoimidazolones produced by marine organisms.

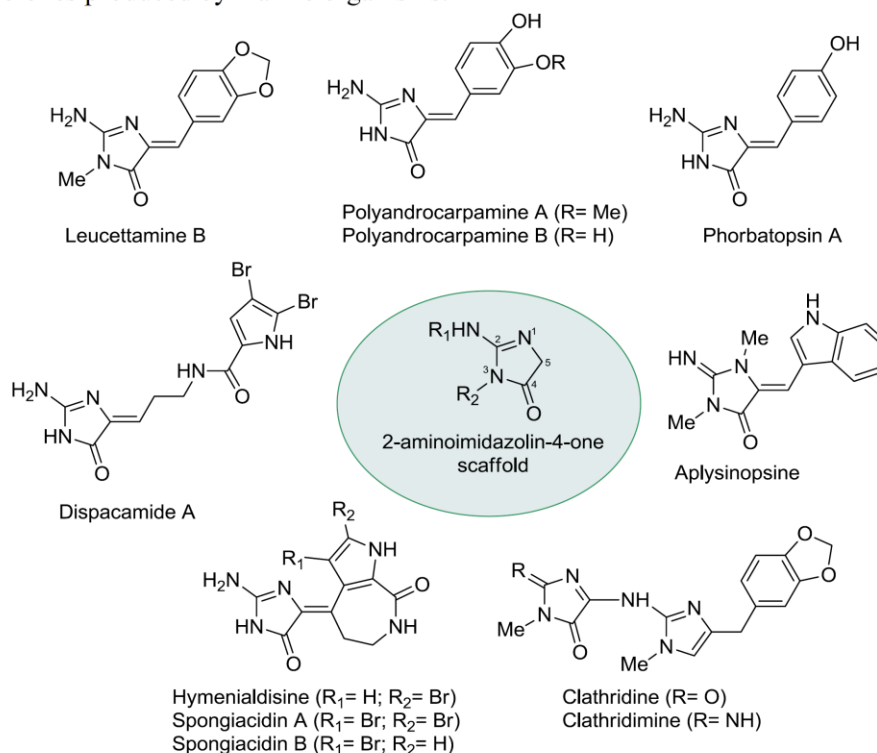


Figure 1. Structures of a selection of marine natural products sharing the 2-aminoimidazolin-4-one scaffold.

2. Results

2.1. Phylogeny of Calcareous sponges, with special emphasis of *Leucetta* and *Clathrina*.

Since most of the compounds described here are produced by marine calcareous sponges, we first present a phylogeny of these 2-aminoimidazolinones producing sponges, with specific focus on *Leucetta* and *Clathrina* species. Sponges (Phylum Porifera) are sessile, filter-feeding animals that utilize flagellate cells (choanocytes) to pump water through their bodies. They are morphologically very simple, as they do not have, for example, organs, sensorial cells or nervous system. They are considered the oldest present metazoan (600 Ma) [13]. Four classes of extant sponges are currently accepted: Demospongiae, Hexactinellida, Homoscleromorpha, and Calcarea.

The class Calcarea Bowerbank, 1864, consists of a monophyletic group of marine sponges whose skeleton is formed by Mg-calcite spicules, while the others have spicules made of silica [14]. This class is composed of two subclasses, both monophyletic - Calcinea Bidder, 1898 and Calcaronea Bidder, 1898 - which differ by cytological, embryological, ontogenetic and skeleton characteristics. In the Calcinea subclass, spicules are mainly regular (equiangular and equiradiate) and the first spicule to be synthesized during ontogeny is the triactine, while in Calcaronea, spicules are irregular and diactines are the first spicules to be produced. Moreover, the larvae in Calcinea is the calciblastula and the nucleus of the choanocytes is basal, while in Calcaronea the larvae is the amphiblastula and the nucleus of the choanocytes is apical. Calcareous sponges are considered viviparous and their larvae are lecytotropic. Calcinea has two orders, Clathrinida Hartman, 1958 and Murrayonida Vacelet, 1981, the former being the most diverse. The genera *Leucetta* Haeckel, 1872 and *Clathrina* Gray, 1867 are part of the Clathrinida order (see Supplementary data and Supplementary Figures S1-S4, and Supplementary Table S1 for detailed description and phylogeny of *Leucetta* and *Clathrina* species).

2.2. Polyandrocarpamines are potent inhibitors of the DYRK and CLK kinases

Leucettamine B [8] shares a 2-aminoimidazolinone scaffold with various marine natural products such as polyandrocarpamines [15, 16], dispacamide [17-19], aplysinopsine [20, 21], clathridine/clathridimine [8, 22], hymenialdisine/spongiacidin B [23-30] and phorbatopsin [31, 32] (Figure 1). A summary of all marine aminoimidazolones described so far, their natural sources and structures is presented in Supplementary Table S2 and Supplementary Figure S6.

We tested a selection of these 2-aminoimidazolinones (Figure 1) on a battery of 27 purified kinases (14 mammalian and 13 unicellular parasites (Supplementary Table S3)). Dose-response curves run with the active compounds provided IC₅₀ values that are reported in Table 1. As expected [29, 30] hymenialdisine and the closely related spongiacidin B were very potent inhibitors of most kinases (IC₅₀ values in the 1-10 nM range). Yet, they were not very selective, inhibiting essentially all kinases tested. With the exception of PfGSK-3, the *Plasmodium falciparum* orthologue of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) [33], and LmCK1, the *Leishmania major* orthologue of casein kinase 1 (CK1) [34], unicellular parasite kinases tended to be less sensitive than their mammalian counterparts.

Kinases	Leucettamine B	Leucettine L41	Polyandrocarpamine A	Polyandrocarpamine B	Aplysinsopine	Dispacamide	Hymenialdisine	Spongiacidin B	Clathridine	Clathridimine
CDK1/cyclin B	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0.005	0.031	>10	>10
CDK2/cyclin A	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0.011	0.068	>10	>10
CDK5/p25	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0.0061	0.042	>10	>10
CDK9/cyclin T	>10	>10	0.93	5.2	>10	>10	0.011	0.2	>10	>10
CK1δ/ε	>10	4.2	3.3	>10	>10	>10	0.0037	0.031	>10	>10
CLK1	0.1	0.03	1.0	2.7	>10	>10	0.003	0.022	6.9	7.2
CLK2	0.91	0.21	1.2	4.9	>10	>10	0.0041	0.0073	6.0	6.1
CLK3	9.7	2.4	2.6	8.6	>10	>10	0.0053	0.049	>10	>10
CLK4	0.12	0.03	0.32	0.82	>10	>10	0.0029	0.0036	3.9	3.5
DYRK1A	0.42	0.03	0.27	0.47	>10	>10	0.0033	0.78	7.8	5.2
DYRK1B	1.8	0.05	0.43	1.2	>10	>10	0.0032	0.0058	>10	5.6
DYRK2	0.49	0.08	0.42	0.76	>10	>10	0.0031	0.021	7.1	6.2
DYRK3	0.6	0.42	0.17	0.88	>10	>10	0.0049	0.044	>10	6.1
GSK-3α/β	7.3	1.1	>10	>10	>10	>10	0.0032	0.044	>10	>10
PfGSK-3	>10	8.5	>10	>10	>10	>10	0.0041	0.038	>10	>10
PfCLK1	0.79	0.42	0.65	3.1	>10	>10	0.011	0.085	>10	>10
LmCK1	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0.0025	0.025	>10	>10
LmCLK	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0.4	5.2	>10	>10
LmDYRK2	4.2	2.9	5.9	>10	>10	>10	0.38	9.0	>10	>10
LdDYRK1B	6.9	0.82	1.1	>10	>10	>10	0.042	0.5	>10	>10
LdDYRK3	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0.021	0.3	>10	7.9
LdDYRK4	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
TbCLK1	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0.53	0.71	>10	>10
TcCLK1	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0.51	1.1	>10	>10
CpLAMMER	1.8	0.1	0.17	0.2	>10	>10	0.016	0.13	>10	>10
GICLK	3.1	>10	0.95	2.2	>10	>10	0.012	0.12	>10	>10
TgCLK	4.1	>10	>10	>10	>10	>10	0.041	0.48	>10	>10

Table 1. Protein kinase selectivity of a selection of ten marine natural products sharing the 2-aminoimidazolin-4-one scaffold: leucettamine B and its synthetic leucettine L41 derivative, polyandrocarpamines A & B, aplysinsopine, dispacamide, hymenialdisine, spongiacidin B, clathridine and clathridimine. All compounds were tested at various concentrations against 27 purified kinases (14 mammalian and 13 unicellular parasites). IC₅₀ values, calculated from the dose-response curves, are reported in μM. IC₅₀ values below 1 μM are shown in bold.

Aplysinsopine, dispacamide, clathridine and clathridimine were essentially inactive in the kinase panel. As expected [6], leucettamine B was modestly active (sub-micromolar IC₅₀ values) and leucettine L41 was potent on members of the DYRKs and CLKs families. Again, little inhibitory activity was detected with kinases from unicellular parasites. Finally, both polyandrocarpamines A and B were found to display significantly selective inhibitory effects on DYRKs and somewhat less on CLKs (Table 1). To investigate the selectivity of polyandrocarpamines, polyandrocarpamine A was screened on the large-scale DiscoverX KinomeScan panel (Figure 2, Supplementary Table S4). This

interaction assay provides a semi-quantitative scoring view of the affinity of a compound for any of 442 human kinases [35]. This comprehensive screening approach confirmed the rather good selectivity of polyandrocarpamine A for DYRKs and detected additional affinity for CSNK2A1/A2, CLK1/4 (Table 2).

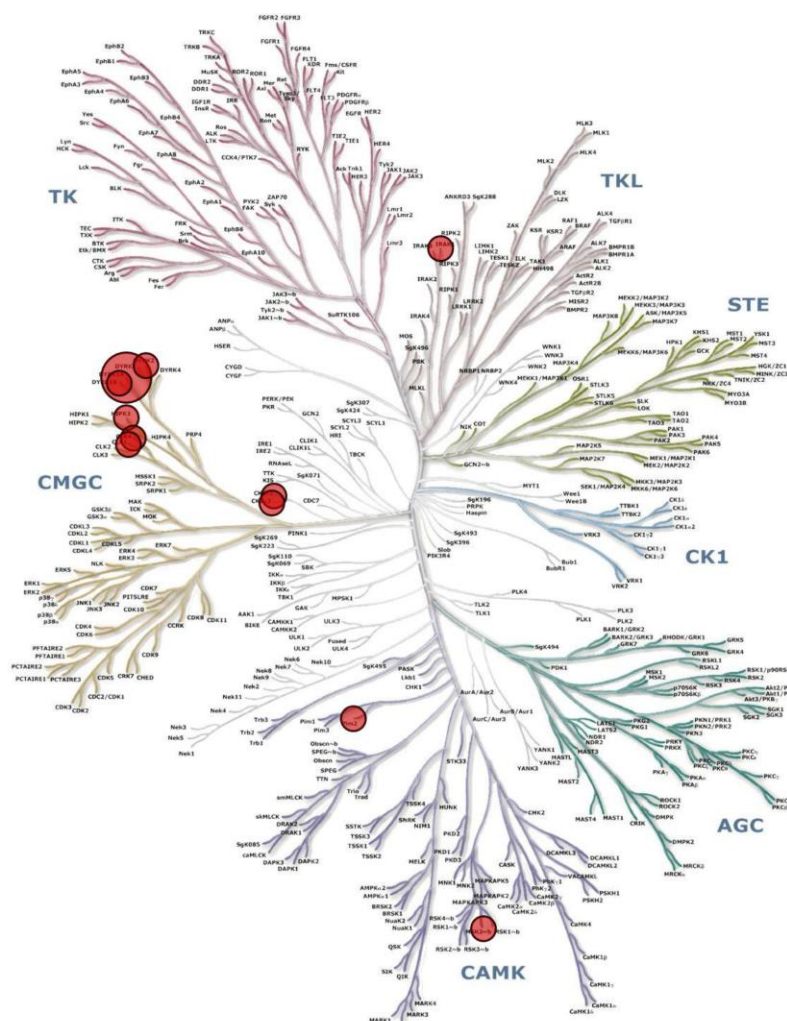


Figure 2. TREEspot™ kinase interaction map of polyandrocarpamine A with 442 human kinases (KinomeScan). Polyandrocarpamine A was tested at a 1 μ M final concentration in the kinase interaction panel. A semi-quantitative scoring of this primary screen was estimated. This score relates to a probability of a hit rather than strict affinity. Scores >10, between 1–10 and <1 indicate the probability of being a false positive is <20%, <10%, <5%, respectively. Results are presented in Table 2 and here as a TREEspot™ kinase interaction maps. Circles indicate the major hits and their size is proportional to the scores. All 442 values are provided in the Supplementary Table S4.

Kinases	Abbreviation	Score
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	DYRK1A	3
Casein kinase 2 α	CSNK2A1	12
Homeodomain interacting protein kinase 3	HIPK3	19
Proviral Integrations of Moloney virus 2	PIM2	21
Ribosomal protein S6 kinase alpha-4 (Kin.Dom.2-C-terminal)	RPS6KA4	22
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2	DYRK2	24
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B	DYRK1B	25
Casein kinase 2 α'	CSNK2A2	26
Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	IRAK1	28
Cdc2-like kinase 4	CLK4	30
Cdc2-like kinase 1	CLK1	32

Table 2. Protein kinase selectivity of polyandrocarpamine A in a kinase interaction assay (DiscoverX KinomeScan®). Polyandrocarpamine A was tested at 1 μ M on a 442 kinases interaction panel. A semi-quantitative scoring of this primary screen was obtained. This score relates to a probability of a hit rather than strict affinity. Scores >10, between 1 & 10 and <1 indicate the probability of being a false positive is <20%, <10%, <5%, respectively. The 11 best scores are presented. Full results are available in Supplementary Table S4.

To confirm the effects of the active products on native DYRK1A in a cellular context, we made use of a SH-SY5Y neuroblastoma cell line expressing human DYRK1A [36] and antibodies directed against cyclin D1 phosphorylated at Threonine 286, a reported DYRK1A phosphorylation site [36, 37] (Figure 3). SH-SY5Y-DYRK1A cells were exposed for 24 h to each product (30 μ M, except for hymenialdisine and leucettine L41 which were tested at 3 μ M), cells were harvested and their proteins resolved by SDS-PAGE, followed by Western blotting with antibodies against P-Thr286-cyclin D1, total cyclin D1 and GAPDH (loading control) (Figure 3). Phosphorylation of cyclin D1 at Thr286 was partially inhibited by polyandrocarpamine A (better than polyandrocarpamine B), leucettine L41 and hymenialdisine, confirming the potent effects on DYRK1A in a cellular context.

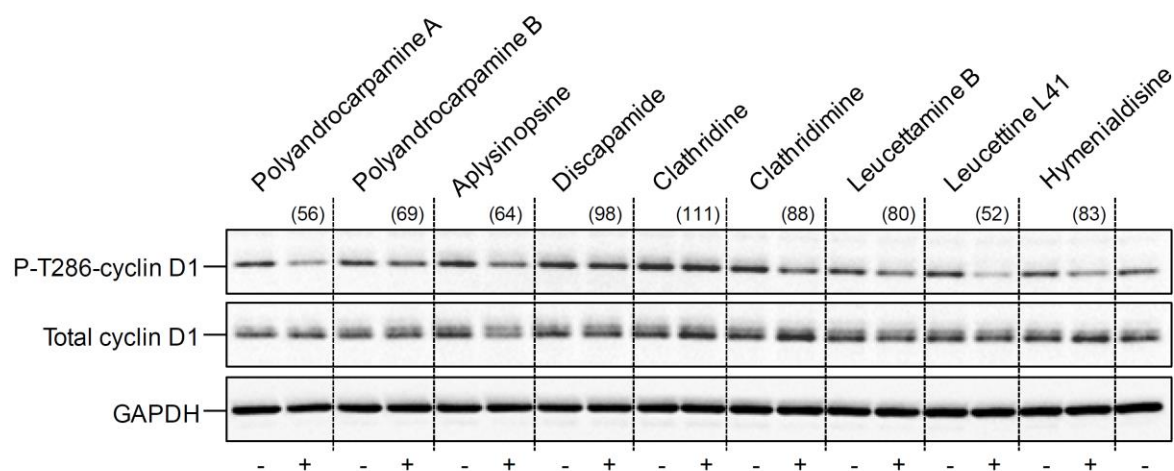


Figure 3. Inhibition of cyclin D1 Thr286 phosphorylation. SH-SY5Y cells expressing human DYRK1A were treated for 24 h with DMSO (-) or 30 μ M of each compound (+) (3 μ M for leucettine L41 and hymenialdisine). Proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies directed against P-T286-cyclin D1, total D1 or GAPDH (used as loading control). Numbers in parentheses indicate the level of cyclin D1 phosphorylation relative to that of control, DMSO-treated cells.

To extend these results we synthesized both polyandrocarpamines as well as a series of derivatives [38] (Figure 4) and tested them on a panel of 16 purified kinases. Synthesized (Table 3, PAC 1 and 2) and natural (Table 3, PAC 12 and 13) polyandrocarpamines showed very similar effects on the target kinases. In contrast, none of the synthetic analogues displayed significant efficacy in this kinase panel.

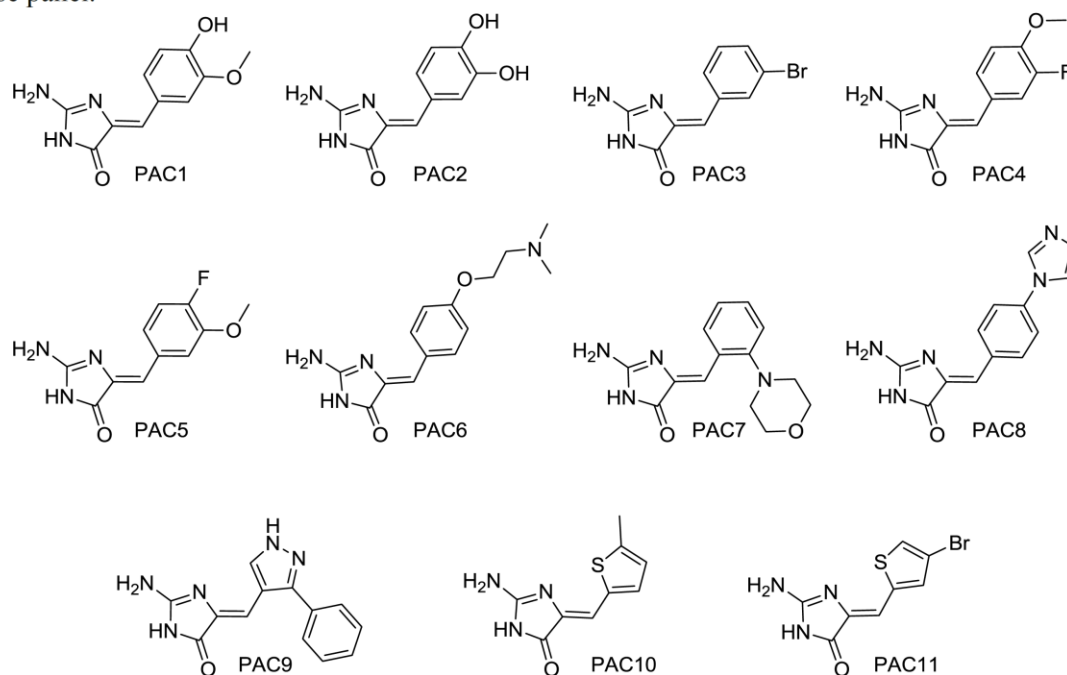


Figure 4. Structure of synthetic analogues & derivatives of polyandrocarpamines used in this study.

Kinases	PAC												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
CDK1/cyclin B	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
CDK2/cyclin A	>1	>1	≥1	≥1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
CDK5/p25	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
CDK9/cyclin T	1.1	2	>1	>1	≥1	>1	>1	0.5	>1	>1	>1	0.9	1.8
CK1δ/ε	5.2	>1	≥1	≥1	>1	>1	>1	>1	3.6	>1	>1	5	>1
CLK1	0.4	1	2.2	≥1	2.2	>1	>1	>1	≥1	>1	4.2	0.4	0.5
CLK2	1.2	2.5	6.3	>1	7.5	>1	>1	>1	>1	>1	≥1	0.6	2.4
CLK3	2.3	9.2	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	2.7	10
CLK4	0.4	0.9	2.3	≥1	2.4	>1	>1	>1	>1	>1	3.2	0.4	0.9
DYRK1A	0.2	0.7	2.1	4	1.3	>1	>1	>1	>1	3	2.1	0.3	0.5
DYRK1B	0.4	1.1	8.2	>1	6.1	>1	>1	>1	>1	>1	6.2	0.4	0.9
DYRK2	0.1	0.4	2.2	4.5	0.6	>1	>1	>1	>1	3.4	1.3	0.2	0.3
DYRK3	0.2	0.9	>1	5.1	5.7	>1	>1	>1	>1	>1	2.4	0.3	0.6
GSK-3α/β	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	2	>1	>1
PfGSK-3	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
LmCK1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	0.6	>1	>1	>1	>1

Table 3. Protein kinase selectivity of synthetic products derived from polyandrocarpamines A and B. All compounds were tested at various concentrations on 16 purified kinases (14 mammalian and 2 unicellular parasites). IC₅₀ values, calculated from the dose-response curves, are reported in μM. IC₅₀ values below 1 μM are shown in bold. PAC1 and PAC2, PAC12 and PAC13 are synthetic and natural polyandrocarpamines A and B, respectively.

3. Discussion

Calcareous sponges of the *Leucetta* and *Clathrina* genera and a few other marine invertebrates produce a wealth of related yet diverse 2-aminoimidazolinone alkaloids (Supplementary Table S2 and Supplementary Figure S6). The existence of these alkaloids in several Calcareous sponges raises several questions regarding their production. What is/are the biosynthetic pathway/s involved [see reference 19 for first hypothesis]? Are these molecules actually produced by the sponges or by associated microorganisms? In addition these molecules may derive from a plankton source taken up (and possibly metabolized) by these filter-feeders. The fact that polyandrocarpamines were identified in ascidians (*Polyandrocarpa* sp.) [15] and that most 2-aminoimidazolinones were discovered in calcareous sponges of the *Leucetta* and *Clathrina* genera (Supplementary Table S2) supports the hypothesis of microorganism-derived metabolites. However cellular localization of clathridimine revealed its presence in sponge cells rather than in associated bacteria [22]. Several 2-aminoimidazolinones were found in *Notodoris* nudibranchs and in the calcareous sponges they crawl and feed on [39–41]. Altogether these scattered results suggest possible transfers of 2-aminoimidazolinones, their precursors and/or metabolites from one organism to another.

Many questions remain open regarding the physiological/ecological functions of these natural products. Are they used as repellent for predators or to control the expansion of associated microorganisms? Do they have specific functions for the sponge/ascidian/nudibranch metabolism itself? What are their natural molecular and cellular targets? Are they synthesized as kinase inhibitors or do they target other enzymes or structural proteins? Some of these may have orthologues in humans. The biological source, functions and natural targets of marine 2-aminoimidazolinone alkaloids should be further investigated.

Only a few of these 2-aminoimidazolinones have been chemically synthesized (Supplementary Table S2, right column) and are thus relatively easy to access for biological studies of their pharmacological properties. Nevertheless they have already proved to be promising scaffolds for the design of potential therapeutic drug candidates. The identification of leucettamine B [6] and polyandrocarpamines A and B [this article] as potent and relatively selective inhibitors of disease-relevant kinases opens the way to the development of drug candidates for various applications [7, 42]. This could be guided by the crystal structures of leucettines in complex with various kinases which have been solved [7]. At ManRos Therapeutics we are currently developing leucettines as DYRK1A inhibitory drug candidates [6, 7, 42, 43] to address cognitive deficits associated with DS [Nguyen et al., in preparation] and AD [44, 45; Souchet et al., in preparation], but applications in cancer, inflammation and diabetes treatment should be investigated too.

Besides kinase inhibition, polyandrocarpamine derivatives have been recently identified as inhibitors of cystathionine β -synthase, another potential therapeutic target for DS [46]. 2-Aminoimidazolinones have been tested for evaluation of their antibacterial activity, anti-biofilm, antifungal, anti-cancer [47, 48], anti-tuberculosis, anti-protozoan, antiviral, anti-inflammatory, adrenergic, anti-histaminic, anti-cholinergic, anti-serotonergic, cardiac, immunosuppressive, leukotriene B₄ receptor antagonistic [49, 50] and AD drug activities [review in 12]. It would be of great interest to run more marine derived 2-aminoimidazolinone alkaloids on wider enzyme/cell screening

panels to identify novel targets and potentially novel therapeutic applications. Hopefully these molecules will add to the growing list of marine drugs and drug candidates developed in recent years [51, 52].

4. Experimental Section

4.1. DNA sequencing, alignment and phylogenetic analyses.

The methods used for molecular phylogenetic analyses of *Leucetta* and *Clathrina* species are detailed in the Supplementary Data.

4.2. Chemistry: purification or synthesis of polyandrocaramines A and B, and analogues.

For the purification of clathridine and clathridimine, specimens of *Clathrina clathrus* were collected by scuba diving in the northwestern Mediterranean Sea (Marseille, France) between 10 and 15 m depth. Lyophilized samples (4.2 g) were extracted with 1:1 CH₂Cl₂/MeOH (3 x 20 mL, sonication for 15 min) at room temperature. The 1:1 CH₂Cl₂/MeOH extract was concentrated under reduced pressure to yield a dark brown viscous oil (208.1 mg), which was chromatographed on a C₁₈ SPE column in a vacuum chamber (H₂O, H₂O /MeOH 1:3, MeOH, CH₂Cl₂, 100 mL of each). The fraction eluted with H₂O /MeOH, 1:3 (47.9 mg) was subjected to semi-preparative reversed-phase HPLC (Gemini C₆-phenyl 10 x 250 mm) with increasing amounts of CH₃CN/0.1% formic acid in H₂O /0.1% formic acid as eluent (flow rate: 5 mL/min, wavelength: 254 and 280 nm) and afforded clathridimine (4.6 mg, 0.11% of sponge dry weight) and clathridine (2.8 mg, 0.07% of sponge dry weight).

PAC1 to 11 were supplied by R.A.D. The synthesis, purification and spectroscopic characterization of this focused polyandrocaramine library has been described elsewhere [38].

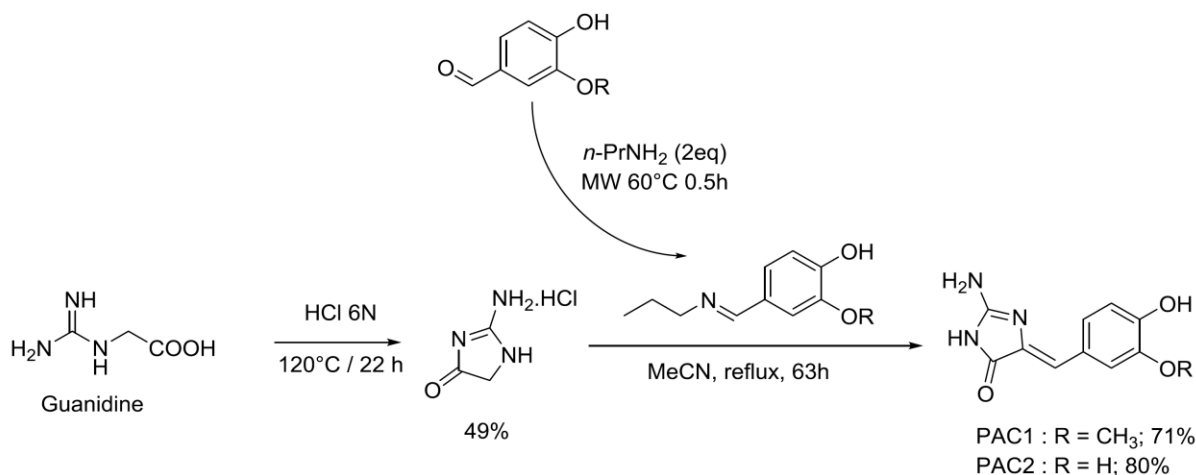
Aplysinsine and leucettamine B were synthesized according to a previously described protocol [53, 54, respectively]. Dispacamide was synthesized as described in [55].

The synthesis of polyandrocaramines A & B (PAC1 and PAC2) was performed from corresponding benzaldehyde derivatives, *n*-propylamine and 2-aminoimidazolin-4-one, the preparation of which was previously described in literature [55]. Guanidine (2.95 mmol, 1 eq) and HClaq 6N (9 mL) were heated at 120°C for 22 h. Water was removed under vacuum and the crude product was solubilized in hot ethanol (9 mL). Diethylether (6 mL) was added, then the mixture was cooled to 0°C. After 6 h, filtration was performed and the 2-aminoimidazolin-4-one was isolated as a white powder with a 49% yield. RMN ¹H (D₂O): δ 4.18 (s, 2H, H-1); RMN ¹³C (D₂O): δ 48.5 (C-1); 174.9 (C=O); [M-HCl]⁺ = 99.0427 (99.0433 C₃H₅N₃O); F = 200–202°C. PAC1 and PAC2 were then produced by mixing the corresponding benzaldehyde (vanillin or catechaldehyde 1.48 mmol, 1 eq) with *n*-propylamine (2.95 mmol, 2 eq). The imine formation was performed under micro-wave irradiation at 60°C for 30 min (maximized authorized power 60 W). Acetonitrile was added to the crude imine with 2-aminoimidazolin-4-one (1.48 mmol, 1 eq) and the mixture was stirred at reflux for 63 h. The solvent was removed under reduced pressure.

PAC1 was isolate as a beige powder with a 71% yield. RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,79 (s, 3H, OCH₃); 6,23 (s, 1H, C=CH); 6,76 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5); 7,10 (sl, 2H, NH₂); 7,35 (sl, 1H, H-6); 7,56 (sl, 1H, H-2); 9,24 (sl, 1H, OH); 10,38 (sl, 1H, NH); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 56,2 (OCH₃); 114,6 (C-2);

116,0 (C-5); 124,0 (C=CH); 127,6 (C-6); 147,1 (C-3); 147,9 (C-4); $[M]^+ = 233,0797$ (233,0800 $C_{11}H_{11}N_3O_3$); $F > 260^\circ C$.

PAC2 was isolated as a beige powder with a 80% yield. RMN 1H (DMSO-*d*6): δ 6,14 (s, 1H, C=CH); 6,70 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-5); 6,92 (s, 2H, NH₂); 7,27 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-6); 7,53 (s, 1H, H-2); 8,81 (s, 1H, NH); 9,19 (s, 1H, OH); 10,45 (s, 1H, OH); RMN ^{13}C (DMSO-*d*6): δ 112,5 (C=CH); 116,6 (C-5); 118,2 (C-2); 123,1 (C-6); 128,2 (C-1); 146,0 (C-3); 146,6 (C-4); $F > 260^\circ C$.



4.3. Biology

4.3.1. Buffers

Homogenization buffer: 25 mM MOPS, 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM *p*-nitrophenylphosphate, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM disodium phenylphosphate, 1X protease inhibitor cocktail, 0.2% Nonidet P-40 substitute.

Buffer A: 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA (MW 380.4), 1 mM DTT (MW 154.2), 25 mM Tris/HCl (MW 121.1) and 50 $\mu g/mL$ heparin.

Buffer C: 60 mM β -glycerophosphate, 30 mM *p*-nitrophenylphosphate, 25 mM MOPS pH 7.0, 5 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 0.1 mM sodium vanadate.

All chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), unless otherwise stated and the protease inhibitor cocktail was from Roche.

4.3.2. Production and purification of the parasitic kinases

The parasitic kinase genes (Supplementary Data, Table S3) were optimized for expression in *E. coli*, synthesized, and cloned in pGEX-6P-1 (GE Healthcare) with the type II restriction enzymes *Bam*HI and *Xho*I for glutathione S-transferase (GST) fusion at the N-terminus (GenScript). Plasmids were transformed into chemically competent *E. coli* BL21(DE3) which were grown overnight at $37^\circ C$ in 2xYT medium containing 100 $\mu g/mL$ ampicillin. These cultures were used to inoculate 1 L volumes of 2xYT medium (containing 100 $\mu g/mL$ ampicillin) in 5 L flasks. The cultures were allowed to grow at $37^\circ C$ before the temperature was decreased to $18^\circ C$. At an optical density (OD₆₀₀) of about 1.0, protein expression was induced overnight at $18^\circ C$ with 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The bacteria were harvested by centrifugation and were frozen at $-20^\circ C$.

Cells were resuspended in lysis buffer (PBS pH 7.4, 1% NP40, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) in the presence of protease inhibitor cocktail (Roche), and lysozyme was added to 1 mg/mL and incubated 1 h at 4°C with gentle agitation. Cells were then sonicated on ice before 6 mM MgCl₂ and 25 U/mL benzonase (Novagen) were added to degrade nucleic acids and decrease sample viscosity. After centrifugation at 4°C, the soluble fraction was collected and proteins were bound to Glutathione sepharose 4B beads (GE Healthcare). Beads were washed three times with lysis buffer and once with modified buffer C (25 mM MOPS pH 7.0, 60 mM β-glycerophosphate, 15 mM p-nitrophenylphosphate, 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM sodium vanadate). Proteins were eluted with elution buffer (buffer C containing 30 mM reduced glutathione, 15 % glycerol, and pH adjusted to 8.5).

4.3.3. Protein kinase assays

Kinase activities were assayed in buffer A or C at 30°C at a final ATP concentration of 15 μmol/L. Blank values were subtracted and activities were expressed in percent of the maximal activity, i.e. in the absence of inhibitors. Controls were performed with appropriate dilutions of DMSO.

The GS-1, CKS, CDK7/9 tide and RS peptide substrates were obtained from Proteogenix (Oberhausbergen, France).

4.2.3.1. CDK1/cyclin B (M phase starfish oocytes, native), **CDK2/cyclin A** and **CDK5/p25** (human, recombinant) were prepared as previously described [6, 7]. Their kinase activity was assayed in buffer A, with 1 mg histone H1/mL, in the presence of 15 μmol/L [γ-33P] ATP (3,000 Ci/mmol; 10 mCi/mL) in a final volume of 30 μL. After 30 min incubation at 30°C, the reaction was stopped by harvesting onto P81 phosphocellulose supernatant (Whatman) using a FilterMate harvester (Packard) and were washed in 1% phosphoric acid. Scintillation fluid was added and the radioactivity measured in a Packard counter.

3.2.3.2. CDK9/cyclin T (human, recombinant, expressed in insect cells) was assayed as described for CDK1/cyclin B, but using CDK7/9 tide (YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (8.1 μg/assay) as a substrate.

4.2.3.3. GSK-3α/β (porcine brain, native) and **PfGSK3** (*plasmodium falciparum*, recombinant, expressed in *E. coli* as GST fusion proteins) was assayed, as described for CDK1 with 0.5 mg BSA /mL + 1 mM DTT, using GS-1 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE) (pS stands for phosphorylated serine), a GSK-3 specific substrate [56].

4.2.3.4. CK1δ/ε (porcine brain, native) and **LmCK1** (leishmania major, recombinant, expressed in *E. coli* as HIS fusion proteins [34]) was assayed as described for CDK1 but in buffer C and using 25 μM CKS peptide (RRKHAAIGpSAYSITA), a CK1-specific substrate [57].

4.2.3.6. DYRK1A, 1B, 2 and 3 (Human, recombinant, expressed in *E. coli* as GST fusion proteins) were purified by affinity chromatography on glutathione-agarose and assayed as described for CDK1/cyclin B with 0.5 mg BSA /mL + 1 mM DTT and using Woodtide (KKISGRLSPIMTEQ) (1.5 μg/assay) as a substrate, a residue of transcription factor FKHR.

4.2.3.7. CLK1, 2, 3 and 4 (mouse, recombinant, expressed in *E. coli* as GST fusion proteins) were assayed as described for CDK1/cyclin B with 0.5 mg BSA /mL + 1 mM DTT and RS peptide (GRSRSRSRSR) (1 μg/assay) as a substrate.

4.2.3.8. Protozoan DYRKs and CLKs (recombinant, expressed in *E. coli*) were assayed as described for CDK1/cyclin B with 0.5 mg BSA /mL + 1 mM DTT and Woodtide or RS peptide for DYRKs or CLKs isoforms.

4.3.4. Kinase interaction panel (Ambit Biosciences/ DiscoverX)

Assays were performed essentially as described previously [35]. For most assays, kinase-tagged T7 phage strains were grown in parallel in 24-well blocks in an *E. coli* host derived from the BL21 strain. *E. coli* were grown to log-phase and infected with T7 phage from a frozen stock (multiplicity of infection ~0.1) and incubated with shaking at 32°C until lysis (~90 min). The lysates were centrifuged (6,000 x g) and filtered (0.2 µm) to remove cell debris. The remaining kinases were produced in HEK-293 cells and subsequently tagged with DNA for qPCR detection. Streptavidin-coated magnetic beads were treated with biotinylated small molecule ligands for 30 min at room temperature (RT) to generate affinity resins for kinase assays. The liganded beads were blocked with excess biotin and washed with blocking buffer (SeaBlock (Pierce), 1 % BSA, 0.05 % Tween 20, 1 mM DTT) to remove unbound ligand and to reduce non-specific phage binding. Binding reactions were assembled by combining kinases, liganded affinity beads, and test compounds in 1x binding buffer (20 % SeaBlock, 0.17x PBS, 0.05 % Tween 20, 6 mM DTT). An 11-point 3-fold serial dilution of each test compound was prepared in 100% DMSO at 100x final test concentration which and subsequently diluted to 1x in the assay. All reactions were performed in polystyrene 96-well plates in a final volume of 0.135 mL. The assay plates were incubated at RT with shaking for 1 h and the affinity beads were washed four times with wash buffer (1x PBS, 0.05 % Tween 20). The beads were then re-suspended in elution buffer (1x PBS, 0.05 % Tween 20, 0.5 µM non-biotinylated affinity ligand) and incubated at RT with shaking for 30 minutes. The kinase concentration in the eluates was measured by qPCR.

4.3.5. Thr286-cyclin D1 phosphorylation in SH-SY5Y cells

Cell treatments. SH-SY5Y cells conditionally expressing human DYRK1A [36], under the control of doxycycline (gift from Dr. Walter Becker) were cultured Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Gibco, c/o Invitrogen, Saint Aubin, France) containing 1% Penicillin Streptomycin mixture (Gibco) and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) in a humidified, 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were split routinely once a week. They were first rinsed with phosphate buffered saline (PBS, Gibco) and detached from the plate bottom using 2 mL Trypsin (Gibco) at 37°C for 3-4 min. Eight mL of fresh medium were added to the cell suspension and the mix was centrifuged for 3 min at 1,000 rpm. The cell pellet was resuspended in fresh medium before seeding (½ dilution) in new 150 mm plates. First, 1 µg/mL doxycycline was used to induce DYRK1A expression and cells were incubated 24 h in a humidified, 5% CO₂ incubator at 37°C. Drugs (0, 3 or 30 µM final) were then added with a final concentration of 0.1% DMSO and cells were incubated for an additional 24 h in a humidified, 5% CO₂ incubator at 37°C. Afterwards, cells were scrapped in medium and centrifuged for 5 min at 3,000 rpm at 4°C. The pellets were washed twice with PBS, centrifuge for 5 min at 10,000 g at 4°C, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C.

Western blot analysis. Cell pellets were lysed in homogenization buffer. Protein extracts were mixed (1:1 v/v) with sample buffer (2X NuPAGE LDS sample buffer, 200 mM DTT) and 20 µg of total

proteins were loaded on NuPAGE 4-12% Bis-Tris protein gels. Electrophoresis was run at 70 V in MOPS buffer for 4 h. Rapid blot transfers were performed at 2.5 A / 25 V for 7 min. Blotting membranes were blocked in milk (5% Regilait in Tris Buffered Saline with 0.1% Tween (TBST)) for 1 h. Blotting membranes were incubated overnight at 4°C with anti-cyclin D1 antibody (1:2,000 dilution; Cell Signaling, Leiden, The Netherlands) or anti-phospho T286-cyclin D1 antibody (1:2,000 dilution; Cell Signaling) or for 1 h at RT with anti-DYRK1A antibody (1:2,000 dilution; Abnova, Taoyuan City, Taiwan) or anti-GAPDH antibody (1:30,000 dilution; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Next, blotting membranes were incubated for 1 h at RT with goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies (Bio-Rad). Chemiluminescent detection was achieved with homemade ECL-Tris buffer (100 mM Tris pH 8.5, 0.009% H₂O₂, 0.225 mM p-coumaric acid, 1.25 mM luminol) with Fusion Fx7 camera software.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Walter Becker for providing the DYRK1A-expressing SH-SY5Y cell line. This research was supported by grants from the ‘Fonds Unique Interministériel’ (FUI) PHARMASEA and TRIAD projects (LM, JPB, FC), ‘Fondation Jérôme Lejeune’ (LM), ANR grant TRANSLEISH and EEC an FP7-KBBE-2012 grant (BlueGenics) (LM). M.C. is recipient of a CIFRE/ManRos Therapeutics PhD fellowship. M.K. is funded by a fellowship from the Brazilian National Research Council (CNPq) and research grants from the CNPq and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). R.A.D. acknowledges the National Health and Medical Research Council (NHMRC) for financial support (Grant APP1024314) and thanks the Australian Research Council (ARC) for support toward NMR and MS equipment (Grants LE0668477 and LE0237908), as well as financial support (Grant LP120200339).

Supplementary data available. This material is available free of charge via the internet at www.mdpi.org/marinedrugs.

References

1. Roskoski, R. Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* **2015**, *100*, 1-23.
2. Fischer, E.H.; Krebs, E.G. Conversion of phosphorylase *b* to phosphorylase *a* in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* **1955**, *216*, 121-132.
3. Wu, P.; Nielsen, T.E.; Clausen, M.H. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov Today* **2016**, *21*, 5-10.
4. Wu, P.; Nielsen, T.E.; Clausen, M.H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422-439.
5. Debdab, M.; Renault, S.; Eid, S.; Lozach, O.; Meijer, L.; Carreaux, F.; Bazureau, J.-P. An efficient method for the preparation of new analogs of leucettamine B under solvent-free microwave irradiation. *Heterocycles* **2009**, *78*, 1191-1203.

6. Debdab, M.; Carreaux, F.; Renault, S.; Soundararajan, M.; Fedorov, O.; Filippakopoulos, P.; Lozach, O.; Babault, L.; Tahtouh, T.; Baratte, B.; Ogawa, Y.; Hagiwara, M.; Eisenreich, A.; Rauch, U.; Knapp, S.; Meijer, L.; Bazureau, J.P. Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4172-4186.
7. Tahtouh, T.; Elkins, J.M.; Filippakopoulos, P.; Soundararajan, M.; Burgy, G.; Durieu, E.; Cochet, C.; Schmid, R.S.; Lo, D.C.; Delhommel, F.; Oberholzer, A.E.; Pearl, L.H.; Carreaux, F.; Bazureau, J.P.; Knapp, S.; Meijer, L. Selectivity, cocrystal structures, and neuroprotective properties of leucettines, a family of protein kinase inhibitors derived from the marine sponge alkaloid leucettamine B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9312-9330.
8. Chan, G.W.; Mong, S.; Hemling, M.E.; Freyer, A.J.; Offen, P.M.; De Brosse, C.W.; Sarau, H.M.; Westley, J.W. New leukotriene B4 receptor antagonist: leucettamine A and related imidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta microraphis*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 116-121.
9. Sullivan, J.D.; Giles, R.L.; Looper, R.E. 2-Aminoimidazoles from *Leucetta* Sponges: Synthesis and biology of an important pharmacophore. *Curr. Bioactive Compounds* **2009**, *5*, 39-78.
10. Koswatta, P.B.; Lovely C.J. Structure and synthesis of 2-aminoimidazole alkaloids from *Leucetta* and *Clathrina* sponges. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 511-528.
11. Roué, M.; Quévrain, E.; Domart-Coulon, I.; Bourguet-Kondracki, M.L. Assessing calcareous sponges and their associated bacteria for the discovery of new bioactive natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 739-751.
12. Žula, A.; Kikelj, D.; Ilaš, J. 2-Aminoimidazoles in medicinal chemistry. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1921-1943.
13. Yin, Z.; Zhu, M.; Davidson, E.H.; Bottjer, D.J.; Zhao, F. & Tafforeau, P. 2015. Sponge grade body fossil with cellular resolution dating 60 Myr before the Cambrian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E1453-1460.
14. Rossi, A.L.; Campos, A.P.C.; Barroso, M.M.S.; Klautau, M.; Archanjo, B.S.; Borojevic, R.; Farina, M.; Werckmann, J. Long-range crystalline order in spicules from the calcareous sponge *Paraleucilla magna* (Porifera, Calcarea). *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 3875-3884.
15. Davis, R.A.; Aalbersberg, W.; Meo, S.; Moreira da Rocha, R.; Ireland, C.M. The isolation and synthesis of polyandrocarpamines A and B. Two new 2-aminoimidazolone compounds from the Fijian ascidian, *Polyandrocarpa sp.* *Tetrahedron Lett.* **2002**, *58*, 3263-3269.
16. Davis, R.A.; Baron, P.S.; Neve, J.E.; Cullinane, C. A microwave-assisted stereoselective synthesis of polyandrocarpamines A and B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *50*, 880-882.
17. Lindel, T.; Hoffmann, H. Synthesis of dispacamide from the marine sponge *Agelas dispar*. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8935-8938.
18. Fresneda, P.M.; Molina, P.; Sanz, M.A. A convergent approach to midpacamide and dispacamide pyrrole-imidazole marine alkaloids. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 851-854.
19. Traver, N.; Al-Mourabit, A. A likely biogenetic gateway linking 2-aminoimidazolinone metabolites of sponges to proline: spontaneous oxidative conversion of the pyrrole-proline-

- guanidine pseudo-peptide to dispacamide A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10252-10253. Erratum in: *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10454.
20. Hollenbeak, K.H.; Schmitz, F.J. Aplysinopsin: antineoplastic tryptophan derivative from the marine sponge *Verongia spengelii*. *Lloydia* **1977**, *40*, 479-481.
 21. Bialonska, D.; Zjawiony, J.K. Aplysinopsins - marine indole alkaloids: chemistry, bioactivity and ecological significance. *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 166-183.
 22. Roué, M.; Domart-Coulon, I.; Ereskovsky, A.; Djediat, C.; Perez, T.; Bourguet-Kondracki, M.L. Cellular localization of clathridimine, an antimicrobial 2-aminoimidazole alkaloid produced by the Mediterranean calcareous sponge *Clathrina clathrus*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1277-1282.
 23. Cimino, G.; de Rosa, S.; de Stefano, S.; Mazzarella, L.; Puliti, R.; Sodano, G. Isolation & X-ray crystal structure of a novel bromo-compound from two marine sponges. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 767-768.
 24. Sharma, G.M.; Buyer, J.; Pomerantz, M.W. Characterization of a yellow compound isolated from the marine sponge *Phakellia flabellata*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, *10*, 435-436.
 25. Williams, D.H.; Faulkner, J. Isomers and tautomers of hymenialdisine and debromohymenialdisine. *Nat. Prod. Lett.* **1996**, *9*, 57-64.
 26. Xu, Y.Y.; Yakushijin, K.; Horne, D.A. Synthesis of C(11)N(5) Marine sponge alkaloids: (+/-)-hymenin, stevensine, hymenialdisine, and debromohymenialdisine. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 456-464.
 27. Papeo, G.; Poster, H.; Borghi, D.; Varasi, M. A new glycociamidine ring precursor: syntheses of (Z)-hymenialdisine, (Z)-2-debromohymenialdisine, and (+/-)-endo-2-debromohymenialdisine. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5641-5644.
 28. Nguyen, T.N.; Tepe, J.J. Preparation of hymenialdisine, analogues and their evaluation as kinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 3122-3143.
 29. Meijer, L.; Thunnissen, A. M.W.H.; White, A.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L.H.; Walter, J.; Cleverley, K.E.; Salinas, P.C.; Wu, Y.Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.M.; Kim, S.-H.; Pettit, G.R. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and casein kinase 1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. & Biol.* **2000**, *7*, 51-63.
 30. Wan, Y.; Hur, W.; Cho, C.Y.; Liu, Y.; Adrian, F.J.; Lozach, O.; Bach, S.; Mayer, T.; Fabbro, D.; Meijer, L.; Gray, N.S. Synthesis and target identification of hymenialdisine analogs. *Chem. & Biol.* **2004**, *11*, 247-259.
 31. Nguyen, T.D.; Nguyen, X.C.; Longeon, A.; Keryhuel, A.; Le, M.H.; Kim, Y.H.; Chau, V.M.; Bourguet-Kondracki, M.L. Antioxidant benzylidene 2-aminoimidazolones from the Mediterranean sponge *Phorbas topsenti*. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 9256-9259.
 32. Ling, Y.; Wang, Z.Q.; Xiao, Y.A.; Zhu, C.; Shen, L.; Wang, X.M.; Hui, Y.; Wang, X.Y. Benzylidene 2-aminoimidazolones derivatives: synthesis and in vitro evaluation of anti-tumor carcinoma activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2013**, *61*, 1081-1084.
 33. Droucheau, E.; Primot, A.; Thomas, V.; Mattei, D.; Knockaert, M.; Richardson, C.; Sallicandro, P.; Alano, P.; Jafarshad, A.; Baratte, B.; Kunick, C.; Parzy, D.; Pearl, L.; Doerig, C.; Meijer, L. *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase -3, molecular model, expression, intracellular

- localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta (Proteins and Proteomics - Special issue on Inhibitors of Protein Kinases)* **2004**, *1697*, 181-196.
34. Rachidi, N.; Taly, J.F.; Durieu, E.; Leclercq, O.; Aulner, N.; Prina, E.; Pescher, P.; Notredame, C.; Meijer, L.; Späth, G.F. Pharmacological assessment defines the *Leishmania donovani* casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1501-1515.
 35. Karaman, M.W.; Herrgard, S.; Treiber, D.K.; Gallant, P.; Atteridge, C.E.; Campbell, B.T.; Chan, K.W.; Ciceri, P.; Davis, M.I.; Edeen, P.T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J.P.; Lockhart, D.J.; Milanov, Z.V.; Morrison, M.J.; Pallares, G.; Patel, H.K.; Pritchard, S.; Wodicka, L.M.; Zarrinkar, P.P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127-132.
 36. Soppa, U.; Schumacher, J.; Florencio Ortiz, V.; Pasqualon, T.; Tejedor, F.J.; Becker, W. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 2084-2100.
 37. Najas, S.; Arranz, J.; Lochhead, P.A.; Ashford, A.L.; Oxley, D.; Delabar, J.M.; Cook, S.J.; Barallobre, M.J.; Arbonés, M.L. DYRK1A-mediated cyclin D1 degradation in neural stem cells contributes to the neurogenic cortical defects in Down syndrome. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 120-134.
 38. Baron, P.S.; Neve, J.E.; Camp, D.; Suraweera, L.; Lam, A.; Lai, J.; Jovanovic, L.; Nelson, C.; Davis, R.A. Design, synthesis and spectroscopic characterisation of a focused library based on the polyandrocarpamine natural product scaffold. *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51*, 358-363.
 39. Carmely, S.; Ilan, M.; Kashman, Y. 2-Aminoimidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta chagosensis*. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 2193-2200.
 40. Alvi, K. A.; Crews, P.; Loughhead, D.G. Structures and total synthesis of 2-aminoimidazoles from a *Notodoris* nudibranch. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1509-1515.
 41. Alvi, K.A.; Peters, B.M.; Hunter, L.M.; Crews, P. 2-Aminoimidazoles and their zinc complexes from indo-pacific *Leucetta* sponges and *Notodoris* nudibranchs. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 329-336.
 42. Nguyen, T.L.; Fruit, C.; Hérault, Y.; Meijer, L.; Besson, T. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, in press.
 43. Tahtouh, T.; Durieu, E.; Villiers, B.; Bruyere, C.; Nguyen, T.L.; Fant, X.; Ahn, K.H.; Khurana, L.; L'helgoual'ch, J.M.; Limanton, E.; Burgy, G.; Kendall, D.A.; Knapp, S.; Bazureau, J.P.; Carreaux, F.; Meijer, L. Structure/activity relationship in the leucettine family of kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2017**, submitted.
 44. Fant, X.; Durieu, E.; Chicanne, G.; Payrastra, B.; Sbrissa, D.; Shisheva, A.; Limanton, E.; Carreaux, F.; Bazureau, J.P.; Meijer, L. Cdc-like/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases Leucettine L41 induces mTOR-dependent autophagy: implication for Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* **2014**, *85*, 441-450.
 45. Naert, G.; Ferré, V.; Meunier, J.; Keller, E.; Malmström, S.; Givalois, L.; Carreaux, F.; Bazureau, J.P.; Maurice T. Leucettine L41, a DYRK1A-preferential DYRKs/CLKs inhibitor, prevents memory impairments and neurotoxicity induced by oligomeric A β 25-35 peptide administration in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2015**, *25*, 2170-2182.

46. Thorson, M.K.; Van Wagoner, R.M.; Harper, M.K.; Ireland, C.M.; Majtan, T.; Kraus, J.P.; Barrios, A.M. Marine natural products as inhibitors of cystathionine beta-synthase activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1064-1066.
47. Ling, Y.; Wang, ZQ.; Xiao, YA.; Zhu, C.; Shen, L.; Wang, XM.; Hui, Y.; Wang, XY. Benzylidene 2-aminoimidazolones derivatives: synthesis and in vitro evaluation of anti-tumor carcinoma activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2013**, *61*, 1081-1084.
48. Zhang, N.; Zhang, Z.; Wong, I.L.; Wan, S.; Chow, L.M.; Jiang, T. 4,5-Di-substituted benzyl-imidazol-2-substituted amines as the structure template for the design and synthesis of reversal agents against P-gp-mediated multidrug resistance breast cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 74-83.
49. Boehm, J.C.; Gleason, J.G.; Pendrak, I.; Sarau, H.M.; Schmidt, D.B.; Foley, J.J.; Kingsbury, W.D. Synthesis and LTB₄ receptor antagonist activities of the naturally occurring LTB₄ receptor antagonist Leucettamine A and related analogues. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3333-3340.
50. Chan, G. W.; Mong, S.; Hemling, M.E.; Freyer, A.J.; Offen, P.H.; DeBrosse, C.W.; Sarau, H.M.; Westley, J.W. New leukotriene B₄ receptor antagonist: Leucettamine A and related imidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta microraphis*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 116-121.
51. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Current status of marine-derived compounds as warheads in anti-tumor drug candidates. *Mar Drugs* **2017**, *15*, E99.
52. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current "state of play". *Planta Med.* **2016**, *82*, 775-789.
53. Djura, P.; Faulkner, D. J. Metabolites of the marine sponge *Dercitus* sp. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 735-737.
54. Roué, N.; Bergman, J. Synthesis of the marine alkaloid Leucettamine B. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 14729-14738.
55. Guihéneuf, S.; Paquin, L.; Carreaux, F.; Durieu, E.; Meijer, L.; Bazureau, J.P. An efficient approach to dispacamide A and its derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 978-987.
56. Primot, A.; Baratte, B.; Gompel, M.; Borgne, A.; Liabeuf, S.; Romette, J.L.; Costantini, F.; Meijer, L. Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilised axin. *Protein Expr. & Purif.* **2000**, *20*, 394-404.
57. Reinhardt, J.; Ferandin, Y.; Meijer, L. Purification CK1 by affinity chromatography on immobilised axin. *Protein Expr. & Purif.* **2007**, *54*, 101-109.

Abbreviations

AD, Alzheimer's disease; **CDKs**, cyclin-dependent kinases; **CK1**, casein kinase 1; **CK2**, casein kinase 2; **CLKs**, cdc2-like kinases; **DMEM**, Dulbecco's Modified Eagle Medium; **DMSO**, dimethylsulfoxide; **DS**, Down syndrome; **DTT**, dithiothreitol; **DYRKs**, dual-specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases; **GSH**, glutathione; **GSK-3**, glycogen synthase kinase-3; **GST**, glutathione-S-transferase; **IPTG**, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; **PBS**, phosphate-buffered saline; **RT**, room temperature.

Authors contributions

LM, BV, TT conceived and designed the experiments; NL, ED and TT ran the in vitro kinase assays; BV cloned and expressed the unicellular kinases; MC ran the SH-SY5Y experiments; RAD supplied the synthesized polyandrocarpamine derivatives PAC1 to PAC11; MR, MLBK and PP provided clathridine, clathridimine and hymenialdisine, spongiacidin, respectively; EL, SG, FC and JP synthesized and provided leucettamine B, polyandrocarpamine A/B, aplysinopsine and dispacamide A; MK analyzed the phylogeny of *Leucetta* and *Clathrina* sp. and provided a full description of the genera; EA and MLBK reviewed the 2-aminoimidazolone alkaloids; LM wrote the paper.

Conflict of interest

FC, JPB and LM are co-inventors on the leucettine patent. LM is CEO and CSO of ManRos Therapeutics which develops leucettines as DS and AD drug candidates.

© 2008 by MDPI (<http://www.mdpi.org>). Reproduction is permitted for noncommercial purposes.

SUPPLEMENTARY DATA

Marine derived 2-aminoimidazolinone alkaloids. Leucettamine B -related polyandrocarpamines inhibit mammalian and protozoan DYRK & CLK kinases.

Nadège LOAËC, Eletta ATTANASIO, Benoît VILLIERS, Emilie DURIEU, Tania TAHTOUH, Morgane CAM, Rohan A. DAVIS, Aline ALENCAR, Mélanie ROUE, Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI, Peter PROKSCH, Emmanuelle LIMANTON, Solène GUIHENEUF, François CARREAUX, Jean-Pierre BAZUREAU, Michelle KLAUTAU and Laurent MEIJER

SUPPLEMENTARY RESULTS

Phylogeny of calcareous sponges, with special emphasis of *Leucetta* and *Clathrina* 2

SUPPLEMENTARY MATERIAL & METHODS

3

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table S1. Analysed specimens 4
Supplementary Table S2. Aminoimidazole alkaloids from marine invertebrates 5
Supplementary Table S3. Kinase orthologues from unicellular parasites 6
Supplementary Table S4. DiscoverX KinomeScan® kinase selectivity panel 7

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure S1. *Leucetta microraphis* 12
Supplementary Figure S2. *Leucetta chagosensis* 13
Supplementary Figure S3. *Clathrina clathrus* 14
Supplementary Figure S4. Maximum likelihood tree 15
Supplementary Figure S5. Structure of aminoimidazole alkaloids 16

SUPPLEMENTARY REFERENCES

20

SUPPLEMENTARY RESULTS

Phylogeny of calcareous sponges, with special emphasis of *Leucetta* and *Clathrina*.

Given the importance of *Leucetta* and *Clathrina* in the production of various 2-aminoindazolinones, we provide here a full description of both genera and the three major species that have been investigated for 2-aminoindazolinones, namely *Leucetta microraphis* (Figure S1), *Leucetta chagosensis* (Figure S2) and *Clathrina clathrus* (Figure S3). We also provide a phylogenetic tree of all species that have been described in the Clathrinida order (Figure S4).

1. *Leucetta* Haeckel 1872

The family Leucettidae de Laubenfels, 1936 reunites two genera, *Leucetta* and *Pericharax* Poléjaeff, 1883, which are differentiated only by the presence of subcortical lacunae in the latter. Therefore, both *Pericharax* and *Leucetta* are sponges with a solid body and leuconoid aquiferous system. The choanoskeleton is well-developed and composed of regular triactines and/or tetractines (Borojevic *et al.*, 2002). *Leucetta* is a very abundant and cosmopolitan genus whose species are mainly distributed in tropical seas (Borojevic *et al.*, 2002). They are massive and more conspicuous than most calcareous sponges.

Leucetta microraphis Haeckel, 1872 (Figure S1)

Leucetta microraphis has already been reported as white, green (Dendy, 1892) and brownish-yellow or greenish-yellow (Wörheide & Hooper, 1999) in life (Figure S1, G). After fixation it becomes white to dark beige (Figure S1, A). Its body is massive and amorphous with single or multiple apical naked oscula. Surface is hispid due to the presence of many colossal triactines and texture is friable. The atrial cavity is reduced and the aquiferous system is leuconoid, with rounded choanocyty chambers. There is no differentiation between the cortical and the choanosomal skeletons. The cortical skeleton is thin and composed of colossal and abundant triactines tangentially disposed over small triactines. The choanoskeleton is dense, composed mainly of small triactines but also of several colossal triactines. Small tetractines surround the large exhalant canals and project their apical actines into them. The atrial skeleton is composed mainly of small triactines, but colossal triactines and small tetractines are also present.

SPICULES

Small triactines (Figure S1, D): regular (equiradial and equiangular). Actines are conical with sharp tips (120-193.7 (± 27.1)-250/ 20-20 (± 0)-20 μ m), n=30 (syntype PMJ 133).

Colossal triactines (Figure S1, E): regular (equiradial and equiangular). Actines are conical with sharp tips (655-1,036 (± 239.3)-1,450/ 75-158.3 (± 47)-225 μ m), n=30, (syntype PMJ 133).

Small tetractines (Figure S1, F): regular (equiradial and equiangular). Actines are conical with sharp tips (140-162.7 (± 27.8)-280/ 20-20 (± 0)-20 μ m), n=30, (syntype PMJ 133). The apical actine is shorter and thinner than the basal ones. It is cylindrical and slightly curved near the tip.

HABITAT AND DISTRIBUTION

Leucetta microraphis is a common species in the Indo-Pacific, where it can be found in exposed and light-protected areas, such as crevices and steep walls (Wörheide & Hooper, 1999). The distribution of *L. microraphis* has already been considered cosmopolitan, including the Indo-Pacific, Atlantic, Mediterranean, Red Sea and Antarctica (see Wörheide & Hooper, 1999). However, in 2009, Valderrama *et al.* (2009) showed that what had been called *L. microraphis* in the Atlantic was in fact *L. floridana*. Presently, *L. microraphis* is considered to be present only in the Indo-Pacific, but even this more restricted distribution may still be hiding other species. Its currently accepted distribution is Australia, New Zealand, New Caledonia, French Polynesia and Madagascar. Although Haeckel (1872) had not made clear where the type locality of *Leucetta primigenia* var. *microraphis* is, since Lendenfeld (1885) elevated it to the species category, Australia is considered as its type locality.

Leucetta chagosensis Dendy, 1913 (Figure S2)

Leucetta chagosensis (the “lemon sponge”) is bright yellow alive (Figure S2, G) and brown after fixation (Figure S2, A). It is massive and globose, but according to the original description, it can be encrusting. It has one to some few apical oscula surrounded by membrane. Surface is smooth but texture is friable. Subcortical cavities are present. The atrial cavity is reduced and the aquiferous system is leuconoid with sub-spherical choanocyty chambers. The skeleton is composed mainly of small triactines, which are present everywhere, while colossal triactines are present only on the cortex and very rare small tetractines can be found only in the atrium.

SPICULES

Small triactines (Figure S2, D): regular (equiradial and equiangular). Actines are conical and sharp (100-172.3 (± 27.1)-210/ 10-17 (± 4.7)-20 μ m), n=30 (Holotype, BMNH 1920.12.9.51).

Colossal triactines (Figure S2, E): regular (equiradiate and equiangular). Actines are conical and sharp (330-482.9 (± 102.3)-630/ 40-55.7 (± 14.8)-80 μm), n=8 (Holotype, BMNH 1920.12.9.51).

Small tetractines (Figure S2, F): regular (equiradiate and equiangular). Actines are conical and sharp (100-120.6 (± 22.1)-190/ 10-15 (± 3.5)-20 μm), n=25, Holotype. The apical actine is slightly thinner and much shorter than the basal ones (60-68.2 (± 8)-80/ 8-8.2 (± 0.4)-10 μm), n=4 (Holotype, BMNH 1920.12.9.51).

HABITAT AND DISTRIBUTION

Leucetta chagosensis is a very abundant sponge both in protected and in illuminated areas. It was already reported to the Indian Ocean (Chagos Archipelago - type locality; Madagascar, Northern Red Sea, Japan (Okinawa), Indonesia, Australia (Queensland and Fremantle), New Caledonia and French Polynesia (Dendy, 1913; Wörheide & Hooper, 1999; 2008; Borojevic & Klautau, 2000). Phylogeographical studies showed, however, that populations of this species are highly structured and this wide distribution may be concealing cryptic species (Wörheide *et al.*, 2002; 2008).

2. *Clathrina* Minchin, 1900

Clathrina is the most diverse genus of the family Clathrinidae Minchin, 1900. It comprises delicate clathroid species whose skeleton is composed only of triactines (Rossi *et al.*, 2011; Klautau *et al.*, 2013). It is a widespread genus, present in all oceans and latitudes, however, most of its species have a restricted distribution.

Clathrina clathrus (Schmidt, 1864) (Figure S3)

Clathrina clathrus is a yellow sponge (Figure S3, A) that becomes beige after fixation. It is a very common species in the Mediterranean and Adriatic Seas (Klautau & Valentine, 2003; Imesek *et al.*, 2014). Its body is formed by loosely anastomosed tubes and the few oscula are organised in water-collecting tubes. The aquiferous system is asconoid and the skeleton is composed only of triactines without organisation.

SPICULES

Triactines (Figure S3, B): Regular (equiradiate and equiangular). Actines are cylindrical, undulated with rounded tips (85-92 (± 4.3)-100/ 7.3 (± 0.5) μm), n=20, (Syntype, measurements from Klautau & Valentine, 2003).

HABITAT AND DISTRIBUTION

Clathrina clathrus is a very delicate species that lives in light protected habitats, such as caves and crevices. It has already been considered as a cosmopolitan species, but currently its accepted distribution is restricted to the whole Mediterranean Sea and to the Northwestern coast of the Atlantic. In the past, all yellow clathrinids were identified as *C. clathrus*, however, a genetic study showed that Mediterranean and Southwestern Atlantic populations of yellow clathrinids were not conspecific (Solé-Cava *et al.*, 1991). Since then, molecular and morphological studies have proved the existence of several different species of yellow clathrinids in the world (Wörheide & Hooper, 1999; Borojevic & Klautau, 2000). However, all of them can be grouped in the same monophyletic clade (Rossi *et al.*, 2011; Klautau *et al.*, 2013).

3. Remarks

Clathrina clathrus, *L. microraphis* and *L. chagosensis* group within the subclass Calcinea, but the phylogenetic tree of Calcinea shows three main groups, one that reunites sponges without tetractines (*Clathrina*) and two of sponges with tetractines (all the other genera) (Rossi *et al.*, 2011; Klautau *et al.*, 2013) (Figure S5). *Clathrina clathrus* groups in the clade of *Clathrina*, more specifically in a clade of yellow clathrinids only. It is a sister group of *C. aurea* from the Western Atlantic (Brazil). *Leucetta microraphis* and *L. chagosensis* group in the clade of *Leucetta*, but separately from each other. *Leucetta microraphis* is more related to *L. potiguar* and *L. floridana* from the Western Atlantic, while *L. chagosensis* is more related to *L. pyriformis* and *L. antarctica*, both from Antarctica.

SUPPLEMENTARY MATERIAL & METHODS

DNA sequencing, alignment and phylogenetic analyses

The analysed region was the internal transcribed spacer (ITS), including 18S partial, ITS1, 5.8S, ITS2 and 28S partial. All sequences were obtained from the GenBank (Table S1). Sequences were aligned with the Q option of the MAFFT program (Kato & Standley, 2013), which takes into consideration the secondary structure of the ITS. Scoring matrix was PAM/k_{1/4}2, gap penalty 1.53 and offser value _{1/4}0. As an appropriate outgroup is not available, we root the tree with the mid-point rooting method. Final alignment contained 1,096 bp.

A maximum likelihood tree was generated using the MEGA 6.0 platform (Tamura *et al.*, 2013). The substitution model was the general time reversal (GTR). Partial deletion was chosen and 1,000 bootstrap pseudo-replicates (Felsenstein, 1985) were performed on the ML tree.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table S1. Analyzed (molecular phylogeny) specimens with collection sites, voucher numbers and GenBank accession numbers.

Species	Collection site	Voucher number	GenBank (ITS)
<i>Arturia</i> cf. <i>hirsuta</i>	Cabo Verde	ZMAPor07061	KC843431
<i>Ascaltis reticulum</i>	Mediterranean Sea	UFRJPor6258	HQ588973
<i>Ascandra contorta</i>	Mediterranean Sea	UFRJPor6327	HQ588970
<i>Ascandra corallicola</i>	Norway	UFRJPor6329	HQ588994
<i>Ascandra falcata</i>	Mediterranean Sea	UFRJPor5856	HQ588962
<i>Borojevia aspinga</i>	Brazil	UFRJPor5245	HQ588998
<i>Borojevia brasiliensis</i>	Brazil	UFRJPor5214	HQ588978
<i>Borojevia cerebrum</i>	Mediterranean Sea	UFRJPor6322	HQ588964
<i>Clathrina aurea</i>	Brazil	MNRJ5170	HQ588960
<i>Clathrina aurea</i>	Brazil	MNRJ8990	HQ588958
<i>Clathrina aurea</i>	Brazil	MNRJ8998	HQ588968
<i>Clathrina clathrus</i>	Mediterranean Sea	UFRJPor6315	HQ588974
<i>Clathrina clathrus</i>	Mediterranean Sea	UFRJPor6325	HQ588965
<i>Clathrina clathrus</i>	Mediterranean Sea	UFRJPor6326	HQ588972
<i>Clathrina conferta</i>	Brazil	MNRJ8991	HQ588959
<i>Clathrina conferta</i>	Brazil	MNRJ8997	HQ588957
<i>Clathrina coriacea</i>	Norway	UFRJPor6330	HQ588986
<i>Clathrina cylindracea</i>	Brazil	UFRJPor 5413	HQ588993
<i>Clathrina fjordica</i>	Chile	MNRJ 8143	HQ588984
<i>Clathrina luteoculcitella</i>	Australia	QMG 313684	HQ588989
<i>Ernstia</i> sp. nov. 1	Brazil	UFRJPor6621	KC843433
<i>Ernstia</i> sp. nov. 14	Indonesia	ZMAPor08390	KC843451
<i>Ernstia</i> sp. nov. 2	Brazil	UFRJPor6617	KC843434
<i>Ernstia tetractina</i>	Brazil	UFRJPor5183	HQ589000
<i>Leucascus simplex</i>	French Polynesia, Moorea	BMOO16283	KC843454
<i>Leucetta antarctica</i>	Antarctica	MNRJ13798	KC849700
<i>Leucetta chagosensis</i>	Australia	QMG313774	AM850505
<i>Leucetta chagosensis</i>	Australia	QMG313944	AM850528
<i>Leucetta chagosensis</i>	Australia	QMG313946	AM850529
<i>Leucetta floridana</i>	Caribbean	UFRJPor5357	EU781970
<i>Leucetta floridana</i>	Caribbean	UFRJPor5359	EU781969
<i>Leucetta floridana</i>	Caribbean	UFRJPor5360	EU781968
<i>Leucetta microraphis</i>	Australia, Wistari Reef	QMG313659	AJ633874
<i>Leucetta microraphis</i>	Australia, Wistari Reef	QMG315140	AJ633871
<i>Leucetta potiguar</i>	Brazil	UFPEPor547	EU781986
<i>Leucetta potiguar</i>	Brazil	UFPEPor569	EU781987
<i>Leucetta potiguar</i>	Brazil	UFPEPor588	EU781988
<i>Leucetta pyriformis</i>	Antarctica	MNRJ13843	KC843457

Supplementary Table S2. Aminoimidazole alkaloids from marine invertebrates: natural products and total synthesis. All products are produced by marine sponges, except 13, 15, 41 (nudibranch) and 65, 66 (ascidian).

#	Product	Species	References	Total synthesis
1	Leucettidine	<i>Leucetta microraphis</i>	Cardellina et al. 1981	
2	Naamine A	<i>Leucetta chagosensis</i> <i>Leucetta avocado</i>	Carmely et al. 1987	
3	Naamine B	<i>Leucetta chagosensis</i>	Carmely et al. 1989	
4	Naamine C	<i>Leucetta chagosensis</i>	Fu et al. 1997	
5	Naamine D	<i>Leucetta cf. chagosensis</i>	Dunbar et al. 2000	
6	5 N,N-Dimethyl naamine D	<i>Leucetta avocado</i>	Crews et al. 2003	
7	Naamine E	<i>Leucetta chagosensis</i>	Gross et al. 2002	
8	Naamine F	<i>Leucetta chagosensis</i>	Hassan et al. 2004	
9	Naamine G	<i>Leucetta chagosensis</i>	Hassan et al. 2004	Koswatta & Lovely, 2010a
10	Isonaamine A	<i>Leucetta chagosensis</i>	Carmely et al. 1987	Molina et al. 1999; Ermolat'ev et al., 2008
11	Isonaamine B	<i>Leucetta chagosensis</i>	Fu et al. 1998	
12	Isonaamine C	<i>Leucetta chagosensis</i>	Gross et al. 2002	Nakamura et al. 2003; Ermolat'ev et al. 2008; Lima et al., 2011
13	Dorimidazole A	<i>Notodoris gardineri</i>	Alvi et al. 1991	Alvi et al. 1991; Molina et al. 1999
14	Dorimidazole B	<i>Notodoris gardineri</i>	Hassan et al. 2009	Zavesky et al. 2014
15	Preclathridine A	<i>Notodoris gardineri</i>	Alvi et al. 1993	Kawasaki et al. 1996; Molina et al. 1999; Koswatta & Lovely, 2009; Zavesky et al. 2014
16	Preclathridine B	<i>Leucetta chagosensis</i>	Hassan et al. 2009	Zavesky et al. 2014
17	Leucettamine A	<i>Leucetta microraphis</i>	Chan et al. 1993	Boehm et al. 1993
18	Naamidine A	<i>Leucetta chagosensis</i>	Carmely et al. 1987, 1989	Aberle et al. 2006; Gibbons et al. 2015
19	Naamidine B	<i>Leucetta chagosensis</i>	Carmely et al. 1989	
20	Naamidine C	<i>Leucetta chagosensis</i>	Carmely et al. 1989	
21	Naamidine D	<i>Leucetta chagosensis</i>	Carmely et al. 1989	
22	Naamidine E	<i>Leucetta sp.</i>	Caroll et al. 1993	
23	Naamidine F	<i>Leucetta sp.</i>	Caroll et al. 1993	
24	Naamidine G	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	Koswatta & Lovely, 2010b
25	Naamidine H	<i>Leucetta chagosensis</i>	Tsukamoto et al. 2007	Koswatta & Lovely, 2010a
26	Naamidine I	<i>Leucetta chagosensis</i>	Tsukamoto et al. 2007	
27	Pyronaamidine	<i>Leucetta sp.</i>	Akee et al. 1990	
28	(2E,9E)-pyronaamidine 9-(N-methylimine)	<i>Leucetta sp. cf. chagosensis</i>	Plubrukarn et al. 1997	
29	14-hydroxynaamidine A	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	
30	14-hydroxynaamidine G	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	
31	14-methoxynaamidine A	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	
32	14-methoxynaamidine G	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	
33	14-oxonaamidine G	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	
34	Isonaamidine A	<i>Leucetta chagosensis</i>	Carmely et al. 1987, 1989	
35	Isonaamidine B	<i>Leucetta chagosensis</i>	Carmely et al. 1989	
36	Isonaamidine C	<i>Leucetta sp.</i>	Copp et al. 1998	
37	Isonaamidine D	<i>Leucetta cf. chagosensis</i>	Fu et al. 1998	
38	Isonaamidine E	<i>Leucetta chagosensis</i>	Gross et al. 2002	Lima et al. 2011
39	Leucettamidine	<i>Leucetta microraphis</i>	Chan et al. 1993	
40	Clathridine A	<i>Clathrina clathrus</i>	Ciminiello et al. 1989	Koswatta & Lovely, 2009
41	Clathridine B	<i>Notodoris gardineri</i>	Alvi et al. 1993	
42	Clathridine C	<i>Leucetta sp.</i>	Caroll et al. 1993	
43	Clathridimine	<i>Clathrina clathrus</i>	Roué et al. 2010	
44	(9E)-Clathridine-9-N-(2-sulfoethyl)imine	<i>Leucetta microraphis</i>	He et al. 1992	
45	(Clathridine) ₂ Zn	<i>Clathrina clathrus</i>	Ciminiello et al. 1989, 1990	
46	(Isonaamidine C) ₂ Zn	<i>Leucetta sp.</i>	Alvi et al. 1993	
47	Naamidine A+A	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	
48	Naamidine G+G	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	
49	Naamidine A+G	<i>Leucetta sp.</i>	Mancini et al. 1995	
50	Isonaamidine B+B	<i>Leucetta cf. chagosensis</i>	Fu et al. 1998	
51	Isonaamidine B+D	<i>Leucetta cf. chagosensis</i>	Fu et al. 1998	
52	Kealiquinone	<i>Leucetta sp.</i>	Akee et al. 1990	Das et al. 2013
53	2-deoxy-2-aminokealiquinone	<i>Leucetta chagosensis</i>	Fu et al. 1997	Das et al. 2013
54	Spirocalcaridine A	<i>Leucetta sp.</i>	Edrada et al. 2003	
55	Spirocalcaridine B	<i>Leucetta sp.</i>	Edrada et al. 2003	
56	Kealiinine A	<i>Leucetta chagosensis</i>	Hassan et al. 2004	Das et al. 2012
57	Kealiinine B	<i>Leucetta chagosensis</i>	Hassan et al. 2004	Das et al. 2012; Gibbons et al. 2012
58	Kealiinine C	<i>Leucetta chagosensis</i>	Hassan et al. 2004	Das et al. 2012; Gibbons et al. 2012
59	Leucettamine B	<i>Leucetta microraphis</i>	Chan et al. 1993	Roué & Bergman, 1999; Chérouvier et al. 2002; Debdab et al. 2009; Selvaraju & Sun, 2015
60	Leucettamine C	<i>Leucetta avocado</i>	Crews et al. 2003	

61	Calcaridine A	<i>Leucetta</i> sp.	Edrada et al. 2003	Koswatta et al. 2008
62	Spiroleucettadine	<i>Leucetta</i> sp.	Ralifo & Crews, 2004; White et al. 2008	Aberle et al. 2007
63	Phorbatopsin A	<i>Phorbas topsenti</i>	Nguyen et al. 2012	Ling et al. 2013
64	Phorbatopsin B	<i>Phorbas topsenti</i>	Nguyen et al. 2012	
65	Phorbatopsin C	<i>Phorbas topsenti</i>	Nguyen et al. 2012	
66	Polyandrocarpamine A	<i>Polyandrocarpa</i> sp.	Davis et al. 2002	Davis et al. 2008
67	Polyandrocarpamine B	<i>Polyandrocarpa</i> sp.	Davis et al. 2002	Davis et al. 2008
68	Leucosolenamine A	<i>Leucosolenia</i> sp.	Ralifo et al. 2007	
69	Leucosolenamine B	<i>Leucosolenia</i> sp.	Ralifo et al. 2007	

Supplementary Table S3. Kinase orthologues from unicellular parasites cloned, expressed and tested in this study. *Pf*, *Plasmodium falciparum*; *Lm*, *Leishmania major*. *Ld*, *Leishmania donovani*; *Tb*, *Trypanosoma brucei*; *Tc*, *Trypanosoma cruzi*; *Cp*, *Cryptosporidium parvum*; *Gl*, *Giardia lamblia*; *Tg*, *Toxoplasma gondii*.

Kinase	Parasite	Protein accession number
LmCK1.2	<i>Leishmania major</i>	XP_003722496.1
LmDYRK2	<i>Leishmania major</i>	XP_001685943.1
LmCLK	<i>Leishmania major</i>	XP_001681214.1
LdDYRK3	<i>Leishmania donovani</i>	XP_003864768.1
LdDYRK4	<i>Leishmania donovani</i>	XP_003860718.1
LdDYRK1B	<i>Leishmania donovani</i>	XP_003859543.1
TbCLK1	<i>Trypanosoma brucei</i>	XP_829303.1
TcCLK1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_821361.1
PfGSK-3	<i>Plasmodium falciparum</i>	XP_001351197.1
PfCLK1 (PfLAMMER)	<i>Plasmodium falciparum</i>	XP_001348605.1
CpLAMMER	<i>Cryptosporidium parvum</i>	XP_001388249.1
GlCLK	<i>Giardia lamblia</i>	XP_001708093.1
TgCLK	<i>Toxoplasma gondii</i>	EEE24592.1

Supplementary Table S4. DiscoverX KinomeScan® Kinase Selectivity Panel (442 kinases). Enzymes were prepared and interactions assays were run in the presence of 1 μ M polyandrocarpamine A, as described in Karaman et al. (2008). A semi-quantitative scoring of this primary screen was estimated. This score relates to a probability of a hit rather than strict affinity. Scores > 10, between 1 - 10 and < 1 indicate the probability of being a false positive is < 20 %, < 10 %, < 5 %, respectively. Scores \leq 10 are underlined in green.

Kinase	Score		
AAK1	100	BRSK1	100
ABL1(E255K)-phosphorylated	100	BRSK2	100
ABL1(F317I)-nonphosphorylated	92	BTK	100
ABL1(F317I)-phosphorylated	86	CAMK1	100
ABL1(F317L)-nonphosphorylated	100	CAMK1D	100
ABL1(F317L)-phosphorylated	98	CAMK1G	100
ABL1(H396P)-nonphosphorylated	95	CAMK2A	98
ABL1(H396P)-phosphorylated	100	CAMK2B	90
ABL1(M351T)-phosphorylated	100	CAMK2D	100
ABL1(Q252H)-nonphosphorylated	100	CAMK2G	99
ABL1(Q252H)-phosphorylated	100	CAMK4	94
ABL1(T315I)-nonphosphorylated	67	CAMKK1	100
ABL1(T315I)-phosphorylated	85	CAMKK2	94
ABL1(Y253F)-phosphorylated	100	CASK	100
ABL1-nonphosphorylated	90	CDC2L1	100
ABL1-phosphorylated	100	CDC2L2	100
ABL2	87	CDC2L5	100
ACVR1	100	CDK11	100
ACVR1B	81	CDK2	91
ACVR2A	100	CDK3	100
ACVR2B	99	CDK4-cyclinD1	96
ACVRL1	100	CDK4-cyclinD3	98
ADCK3	100	CDK5	100
ADCK4	98	CDK7	100
AKT1	100	CDK8	100
AKT2	100	CDK9	88
AKT3	100	CDKL1	100
ALK	100	CDKL2	100
AMPK-alpha1	100	CDKL3	100
AMPK-alpha2	87	CDKL5	100
ANKK1	100	CHEK1	100
ARK5	71	CHEK2	100
ASK1	100	CIT	100
ASK2	100	CLK1	32
AURKA	100	CLK2	45
AURKB	100	CLK3	69
AURKC	99	CLK4	30
AXL	100	CSF1R	87
BIKE	70	CSK	100
BLK	100	CSNK1A1	100
BMPR1A	100	CSNK1A1L	100
BMPR1B	42	CSNK1D	70
BMPR2	95	CSNK1E	87
BMX	100	CSNK1G1	100
BRAF	100	CSNK1G2	100
BRAF(V600E)	96	CSNK1G3	84
BRK	100	CSNK2A1	12
		CSNK2A2	26

CTK	100	FER	100
DAPK1	79	FES	96
DAPK2	58	FGFR1	100
DAPK3	50	FGFR2	100
DCAMKL1	98	FGFR3	100
DCAMKL2	100	FGFR3(G697C)	83
DCAMKL3	94	FGFR4	98
DDR1	100	FGR	100
DDR2	69	FLT1	100
DLK	100	FLT3	100
DMPK	100	FLT3(D835H)	94
DMPK2	99	FLT3(D835Y)	100
DRAK1	42	FLT3(ITD)	100
DRAK2	51	FLT3(K663Q)	100
DYRK1A	3	FLT3(N841I)	100
DYRK1B	25	FLT3(R834Q)	100
DYRK2	24	FLT4	100
EGFR	99	FRK	100
EGFR(E746-A750del)	100	FYN	100
EGFR(G719C)	95	GAK	100
EGFR(G719S)	100	GCN2(Kin.Dom.2,S808G)	90
EGFR(L747-E749del, A750P)	100	GRK1	100
EGFR(L747-S752del, P753S)	100	GRK4	100
EGFR(L747-T751del,Sins)	92	GRK7	100
EGFR(L858R)	93	GSK3A	100
EGFR(L858R,T790M)	100	GSK3B	100
EGFR(L861Q)	100	HCK	100
EGFR(S752-I759del)	100	HIPK1	52
EGFR(T790M)	93	HIPK2	50
EIF2AK1	100	HIPK3	19
EPHA1	100	HIPK4	85
EPHA2	100	HPK1	100
EPHA3	87	HUNK	100
EPHA4	83	ICK	100
EPHA5	100	IGF1R	100
EPHA6	100	IKK-alpha	100
EPHA7	100	IKK-beta	100
EPHA8	100	IKK-epsilon	89
EPHB1	89	INSR	90
EPHB2	79	INSRR	81
EPHB3	100	IRAK1	28
EPHB4	100	IRAK3	98
EPHB6	97	IRAK4	46
ERBB2	100	ITK	94
ERBB3	100	JAK1(JH1domain-catalytic)	72
ERBB4	99	JAK1(JH2domain-pseudokinase)	92
ERK1	100	JAK2(JH1domain-catalytic)	97
ERK2	100	JAK3(JH1domain-catalytic)	84
ERK3	82	JNK1	100
ERK4	100	JNK2	100
ERK5	100	JNK3	93
ERK8	67	KIT	87
ERN1	100	KIT(A829P)	91
FAK	94	KIT(D816H)	100

KIT(D816V)	100	MRCKB	100
KIT(L576P)	99	MST1	70
KIT(V559D)	91	MST1R	100
KIT(V559D,T670I)	85	MST2	100
KIT(V559D,V654A)	100	MST3	100
LATS1	100	MST4	100
LATS2	100	MTOR	84
LCK	100	MUSK	56
LIMK1	100	MYLK	98
LIMK2	96	MYLK2	95
LKB1	100	MYLK4	96
LOK	100	MYO3A	100
LRRK2	100	MYO3B	88
LRRK2(G2019S)	100	NDR1	100
LTK	100	NDR2	91
LYN	89	NEK1	100
LZK	100	NEK11	100
MAK	91	NEK2	100
MAP3K1	100	NEK3	100
MAP3K15	100	NEK4	100
MAP3K2	100	NEK5	95
MAP3K3	100	NEK6	100
MAP3K4	100	NEK7	100
MAP4K2	97	NEK9	100
MAP4K3	78	NIM1	100
MAP4K4	98	NLK	100
MAP4K5	100	OSR1	100
MAPKAPK2	100	p38-alpha	100
MAPKAPK5	100	p38-beta	81
MARK1	100	p38-delta	100
MARK2	100	p38-gamma	100
MARK3	100	PAK1	100
MARK4	100	PAK2	70
MAST1	100	PAK3	100
MEK1	100	PAK4	100
MEK2	100	PAK6	100
MEK3	98	PAK7	79
MEK4	100	PCTK1	100
MEK5	78	PCTK2	100
MEK6	100	PCTK3	100
MELK	100	PDGFRA	100
MERTK	100	PDGFRB	94
MET	100	PDPK1	100
MET(M1250T)	97	PFCDPK1(P.falciparum)	100
MET(Y1235D)	100	PFPK5(P.falciparum)	100
MINK	100	PFTAIRE2	100
MKK7	89	PFTK1	100
MKNK1	63	PHKG1	100
MKNK2	100	PHKG2	85
MLCK	100	PIK3C2B	100
MLK1	100	PIK3C2G	84
MLK2	100	PIK3CA	100
MLK3	100	PIK3CA(C420R)	100
MRCKA	100	PIK3CA(E542K)	100

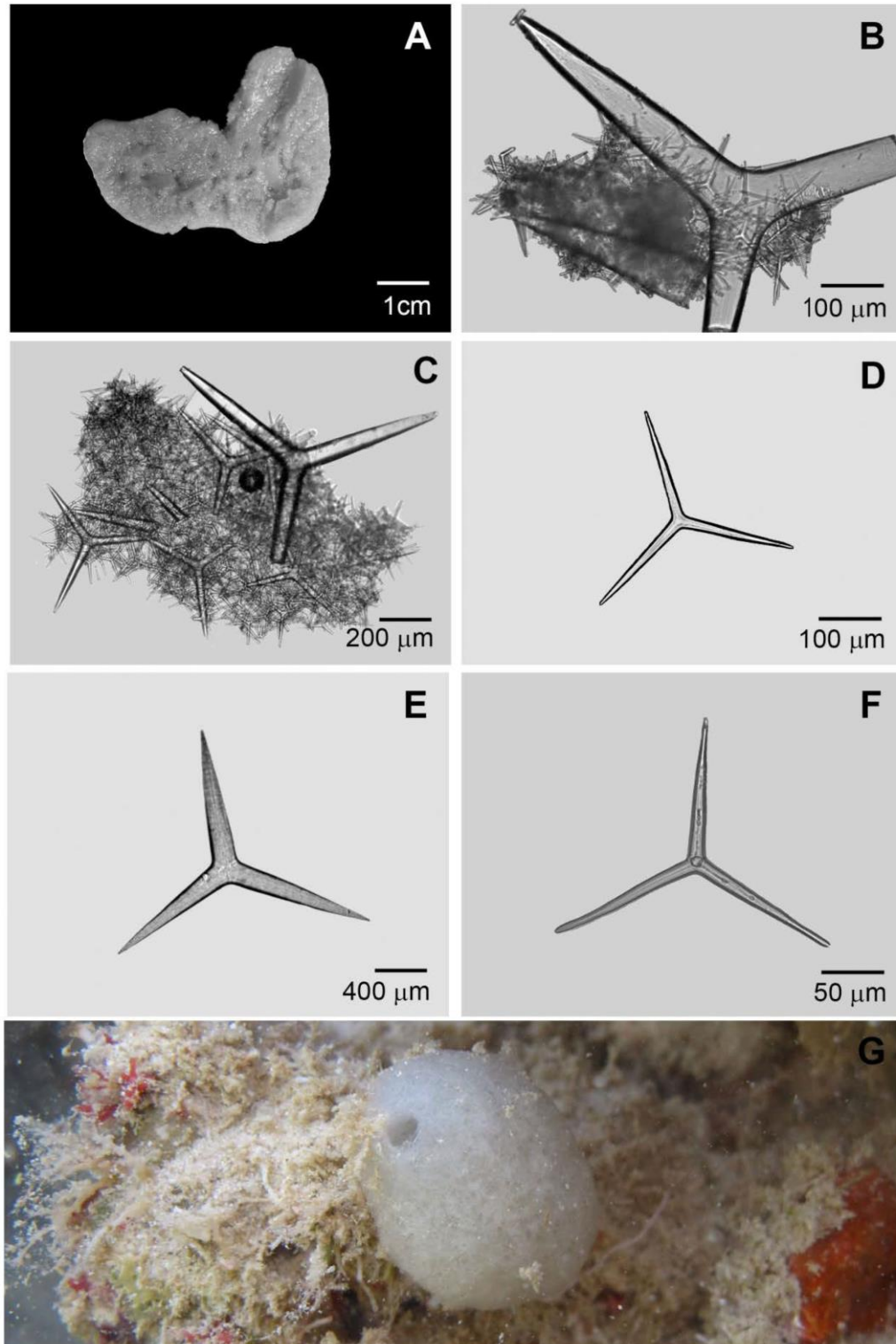
PIK3CA(E545A)	88	RIPK5	83
PIK3CA(E545K)	100	ROCK1	71
PIK3CA(H1047L)	100	ROCK2	93
PIK3CA(H1047Y)	100	ROS1	100
PIK3CA(I800L)	99	RPS6KA4(Kin.Dom.1-N-terminal)	100
PIK3CA(M1043I)	93	RPS6KA4(Kin.Dom.2-C-terminal)	22
PIK3CA(Q546K)	81	RPS6KA5(Kin.Dom.1-N-terminal)	100
PIK3CB	100	RPS6KA5(Kin.Dom.2-C-terminal)	73
PIK3CD	100	RSK1(Kin.Dom.1-N-terminal)	81
PIK3CG	100	RSK1(Kin.Dom.2-C-terminal)	100
PIK4CB	100	RSK2(Kin.Dom.1-N-terminal)	92
PIM1	68	RSK3(Kin.Dom.1-N-terminal)	94
PIM2	21	RSK3(Kin.Dom.2-C-terminal)	100
PIM3	38	RSK4(Kin.Dom.1-N-terminal)	100
PIP5K1A	88	RSK4(Kin.Dom.2-C-terminal)	94
PIP5K1C	100	S6K1	100
PIP5K2B	100	SBK1	100
PIP5K2C	100	SgK110	100
PKAC-alpha	100	SGK3	100
PKAC-beta	100	SIK	100
PKMYT1	100	SIK2	94
PKN1	100	SLK	100
PKN2	100	SNARK	100
PKNB(M.tuberculosis)	75	SNRK	100
PLK1	96	SRC	100
PLK2	100	SRMS	100
PLK3	100	SRPK1	100
PLK4	100	SRPK2	100
PRKCD	100	SRPK3	100
PRKCE	100	STK16	100
PRKCH	77	STK33	100
PRKCI	100	STK35	95
PRKCQ	100	STK36	96
PRKD1	91	STK39	100
PRKD2	92	SYK	100
PRKD3	98	TAK1	100
PRKG1	100	TAOK1	76
PRKG2	93	TAOK2	100
PRKR	98	TAOK3	87
PRKX	90	TBK1	100
PRP4	100	TEC	98
PYK2	100	TESK1	100
QSK	100	TGFBR1	100
RAF1	100	TGFBR2	100
RET	100	TIE1	81
RET(M918T)	100	TIE2	98
RET(V804L)	100	TLK1	94
RET(V804M)	100	TLK2	100
RIOK1	100	TNIK	100
RIOK2	100	TNK1	100
RIOK3	93	TNK2	100
RIPK1	100	TNNI3K	98
RIPK2	99	TRKA	95
RIPK4	100	TRKB	100

TRKC	82
TRPM6	100
TSSK1B	100
TTK	100
TXK	100
TYK2(JH1domain-catalytic)	100
TYK2(JH2domain-pseudokinase)	100
TYRO3	100
ULK1	94
ULK2	100
ULK3	100
VEGFR2	100

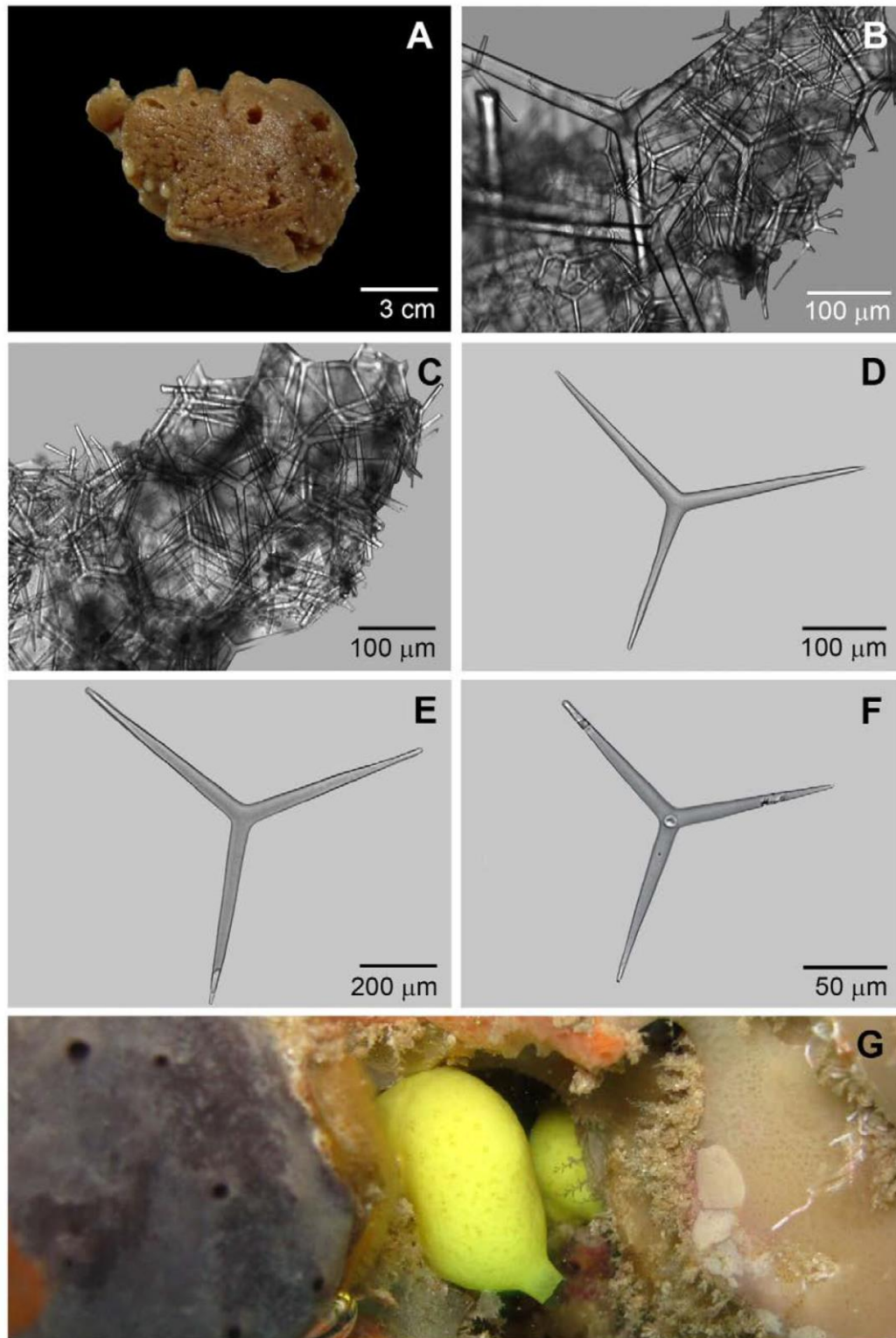
VRK2	100
WEE1	100
WEE2	100
YANK1	100
YANK2	94
YANK3	100
YES	100
YSK1	100
YSK4	100
ZAK	95
ZAP70	100

SUPPLEMENTARY FIGURES

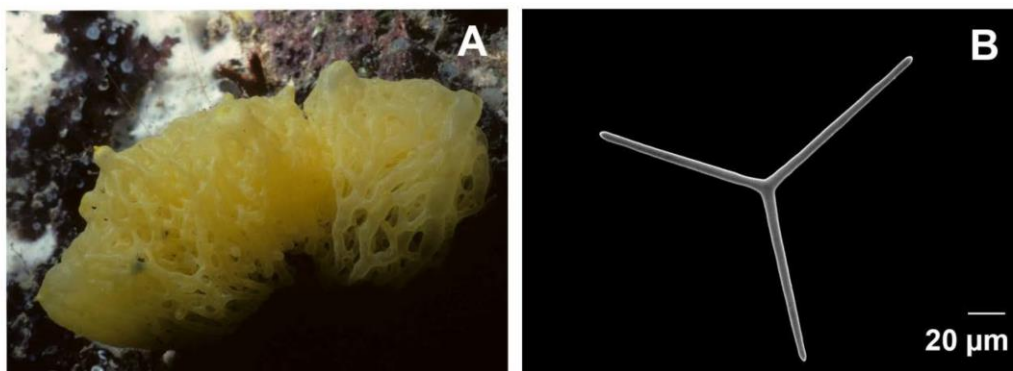
Supplementary Figure S1. *Leucetta microraphis* (syntype PMJ 133). **A.** Sponge after fixation. **B.** Tangential section of the cortex. **C.** Tangential section of the atrium. **D.** Small triactine. **E.** Colossal triactine. **F.** Small tetractine. **G.** Sponge *in vivo* (not the syntype - photo by A. Padua).

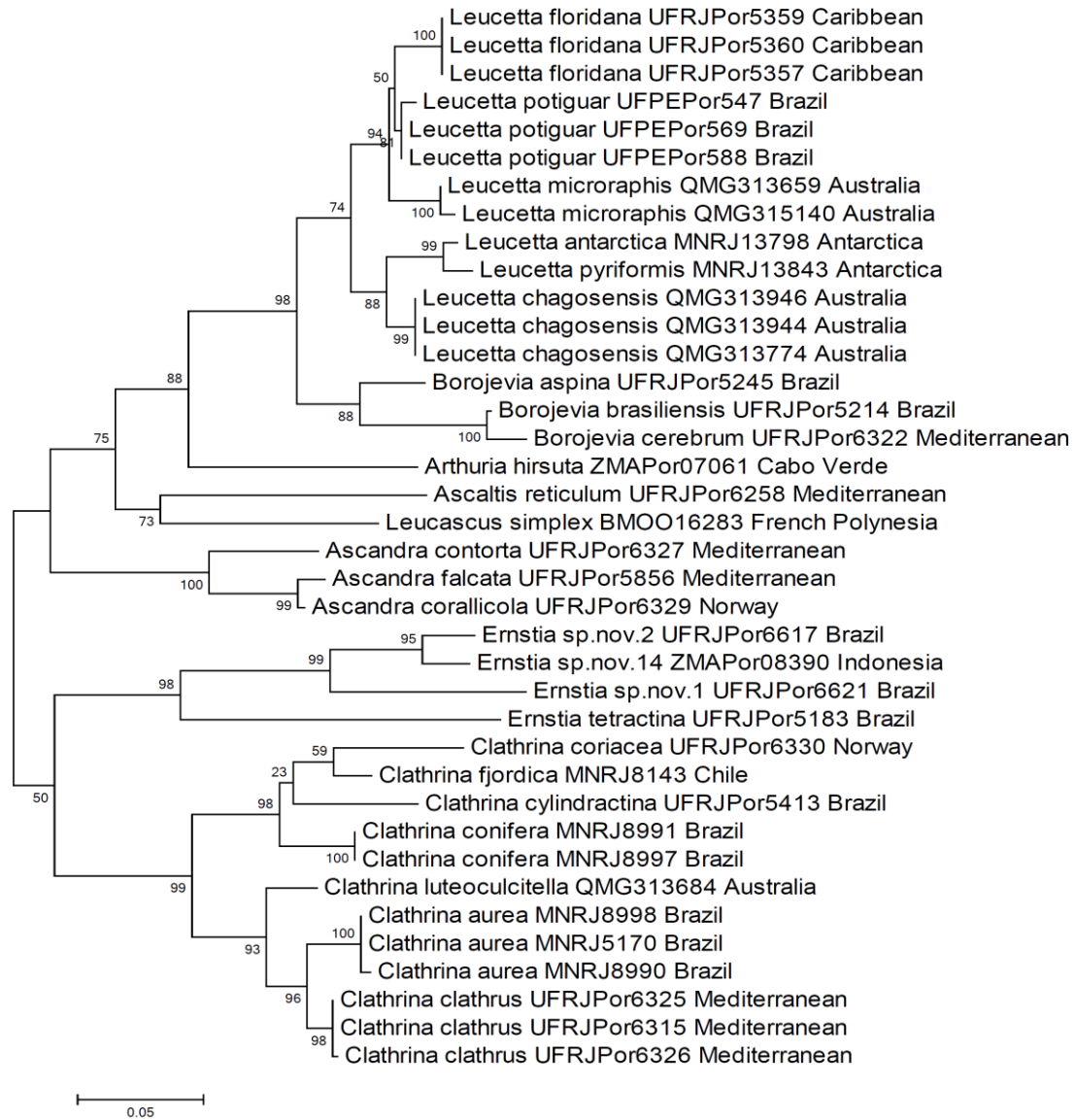


Supplementary Figure S2. *Leucetta chagosensis* (holotype BMNH 1920.12.9.51). **A.** Sponge after fixation. **B.** Tangential section of the cortex. **C.** Tangential section of the atrium. **D.** Small triactine. **E.** Colossal triactine. **F.** Small tetractine. **G.** Sponge *in vivo* (not the holotype - photo by A. Padua)

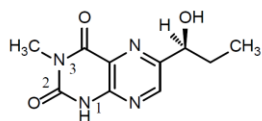


Supplementary Figure S3. *Clathrina clathrus*. A. Sponge *in vivo* (photo by J. Vacelet). **B.** Triactine.

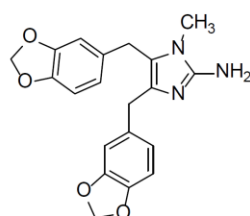
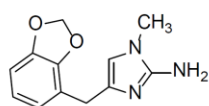
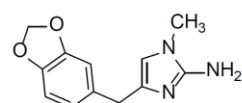
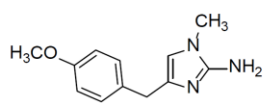
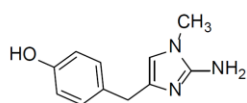
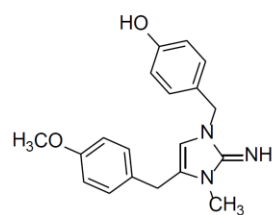
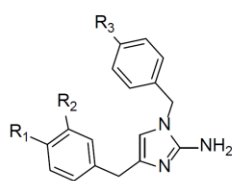
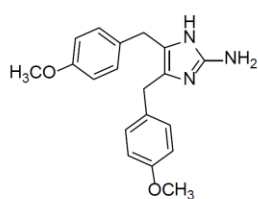
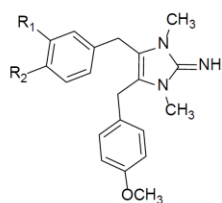
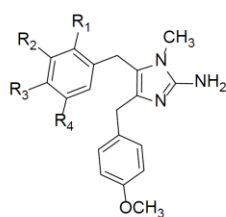


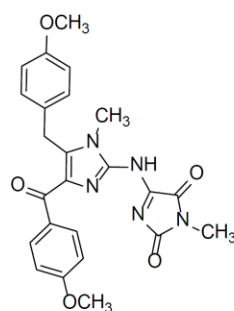
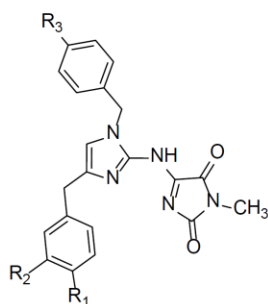
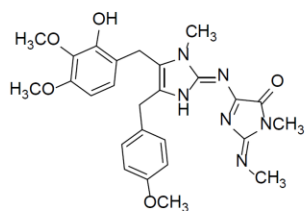
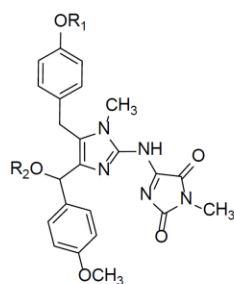
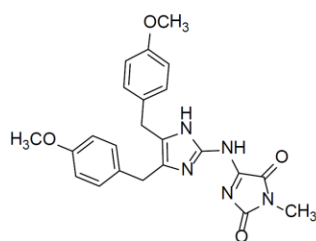
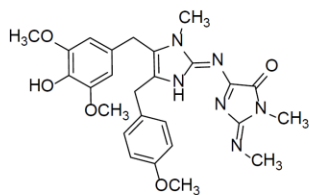
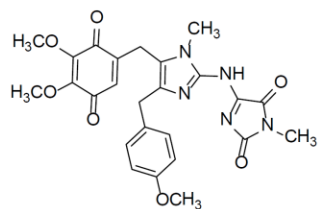
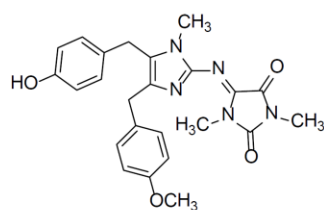
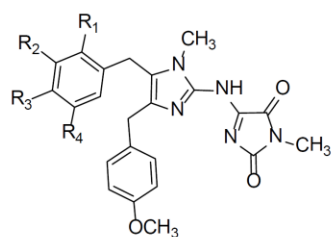
Supplementary Figure S4. Maximum likelihood tree of the nuclear ITS marker of Clathrinida species (subclass Calcinea).

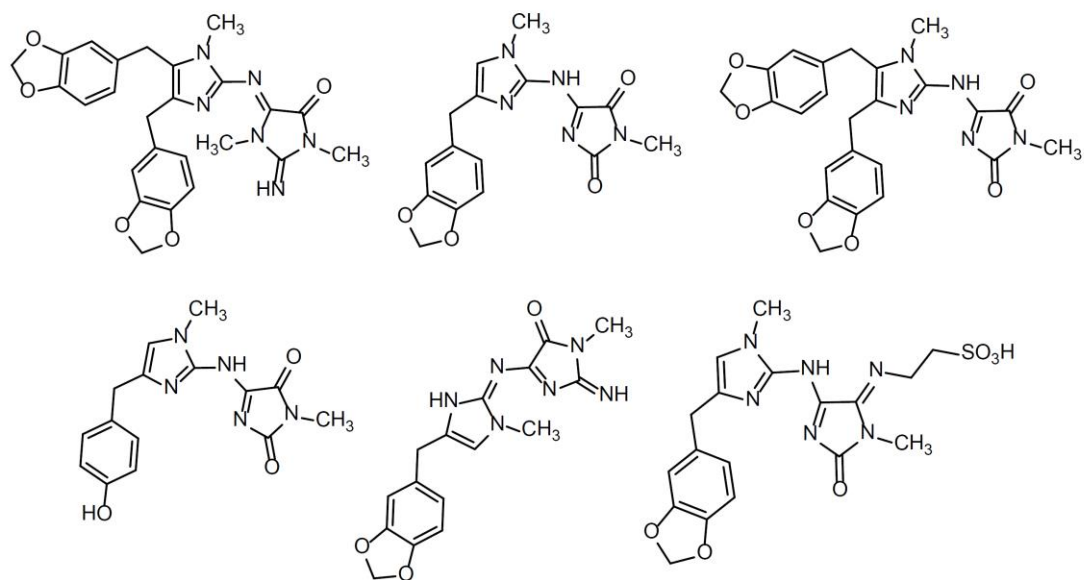
Supplementary Figure S5. Structure of aminoimidazole alkaloids from calcareous sponges and a few other invertebrates. Organized according to the classification of Roué et al. (2012).



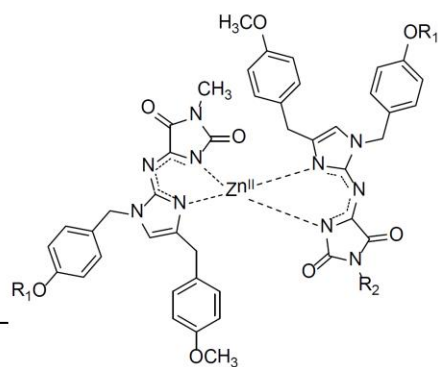
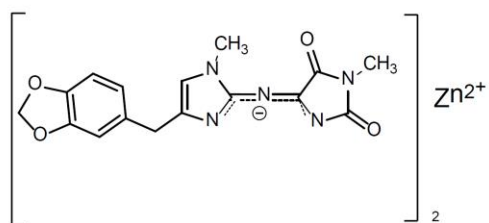
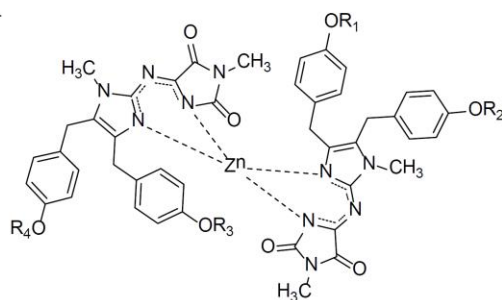
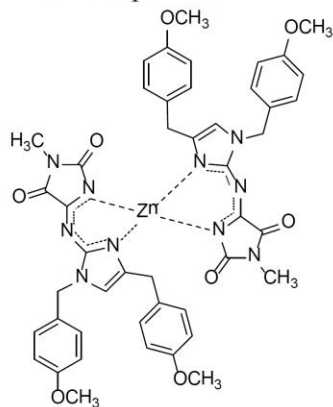
Category I. 2-Aminoimidazole alkaloids

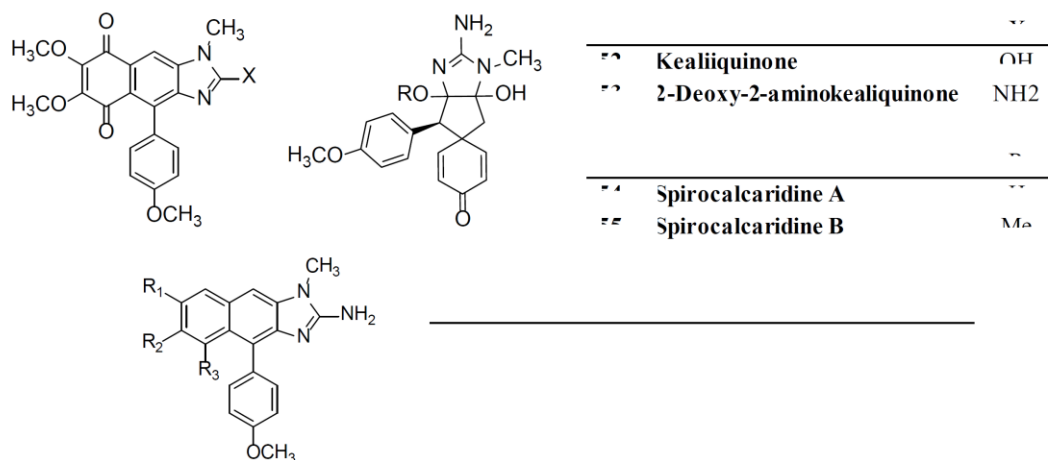
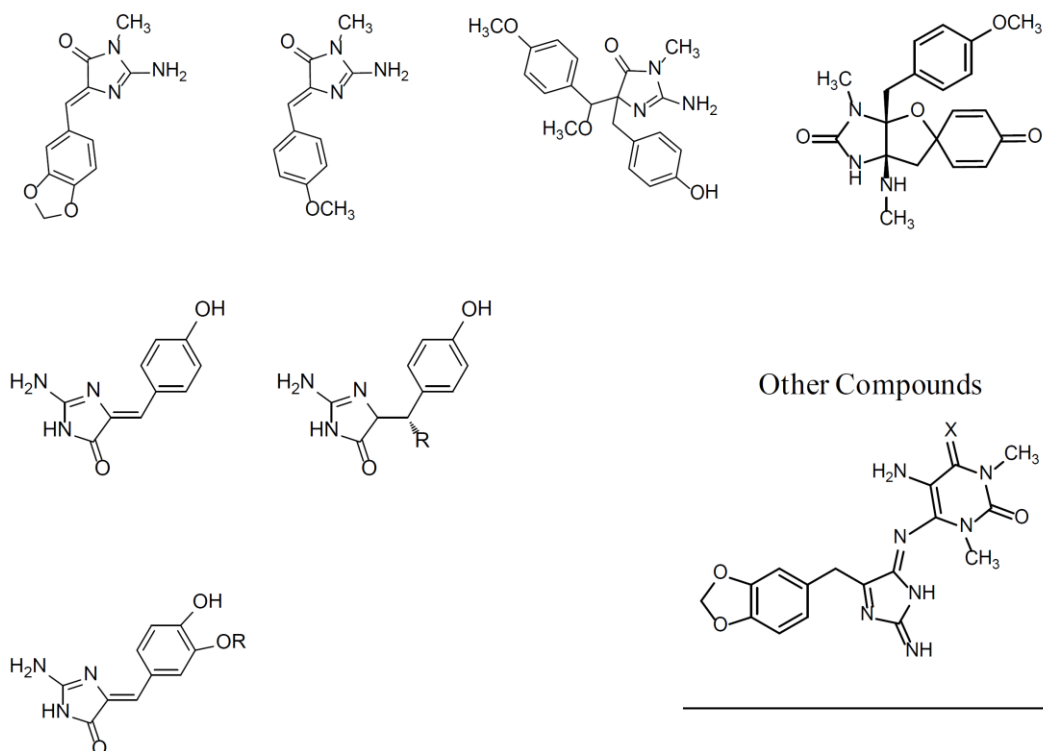


Category II. 2-Aminoimidazole alkaloids functionalized on the 2-amino group.



Zinc complexes



Category III . 2-Aminoimidazole alkaloids fused in a tetracyclic system.**Category IV. 2-Aminoimidazolone alkaloids**

SUPPLEMENTARY REFERENCES

- Aberle, N. S.; Lessene, G.; Watson, K. G. A concise total synthesis of naamidine A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 419-421.
- Aberle, N.; Ovenden, S.P.B.; Lessene, G.; Watson, K.G.; Smith, B.J. Spiroleucettadine: synthetic studies and investigations towards structural revision. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2199-2203.
- Akee, R.K.; Carroll, T.R.; Yoshida, W.Y.; Scheuer, P.J.; Stout, T.J.; Clardy, J. Two imidazole alkaloids from a sponge. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1944-1946.
- Alvi, K. A.; Crews, P.; Loughhead, D.G. Structures and total synthesis of 2-aminoimidazoles from a *Notodoris* nudibranch. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1509-1515.
- Alvi, K.A.; Peters, B.M.; Hunter, L.M.; Crews, P. 2-Aminoimidazoles and their zinc complexes from indo-pacific *Leucetta* sponges and *Notodoris* nudibranchs. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 329-336.
- Boehm, J.C.; Gleason, J.G.; Pendrak, I.; Sarau, H.M.; Schmidt, D.B.; Foley, J.J.; Kingsbury, W.D. Synthesis and LTB₄ receptor antagonist activities of the naturally occurring LTB₄ receptor antagonist Leucettamine A and related analogues. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3333-3340.
- Borojevic, R.; Klautau, M. Calcareous sponges from New Caledonia. *Zoosystema* **2000**, *22*, 187-201.
- Borojevic, R.; Boury-Esnault, N.; Manuel, M.; Vacelet, J. Order *Clathrinida* Hartman, 1958. In: Hooper, J.N.A. & van Soest, R.W.M., editors. *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. **2002**, pp. 1141-52.
- Cardellina, J.H.; Meinwald, J. Leucettidine, a novel pteridine from the calcareous sponge *Leucetta microraphis*. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4782-4784.
- Carmely, S.; Ilan, M.; Kashman, Y. 2-Aminoimidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta chagosensis*. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 2193-2200.
- Carmely, S.; Kashman, Y. Naamines and naamidines, novel imidazole alkaloids from the calcareous sponge *Leucetta chagosensis*. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3003-3006.
- Carroll, A.R.; Bowden, B.F.; Coll, J.C. New imidazole alkaloids from the *Sponge Leucetta sp.* and the associated predatory nudibranch *Notodoris gardineri*. *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 1229-1234.
- Chan, G. W.; Mong, S.; Hemling, M.E.; Freyer, A.J.; Offen, P.H.; DeBrosse, C.W.; Sarau, H.M.; Westley, J.W. New leukotriene B₄ receptor antagonist: Leucettamine A and related imidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta microraphis*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 116-121.
- Chérourvri, J.R.; Carreaux, F.; Bazureau, J.P. Microwave-mediated solventless synthesis of new derivatives of marine alkaloid Leucettamine B. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3581-3584.
- Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mangoni, A. Clathridine and its zinc complex, novel metabolites from the marine sponge *Clathrina clathrus*. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3873-3878.
- Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Di Blasio, B.; Pavone, V. Structure of clathridine zinc complex, a metabolite of the marine sponge *Clathrina clathrus*. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4387-4392.
- Copp, B.R.; Fairchild, C.R.; Cornell, L.; Casazza, A.M.; Robinson, S.; Ireland, C.M. Naamidine A is an antagonist of the epidermal growth factor receptor and an *in vivo* active antitumor agent. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3909-3911.
- Crews, P.; Clark, D.P.; Tenney, K. Variation in the alkaloids among indo-pacific *Leucetta* sponges. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 177-182.
- Das, J.; Bhan, A.; Mandal, S.S.; Lovely, C.J. Total syntheses and cytotoxicity of kealiiquinone, 2-deoxy-2-aminokealiiquinone and analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6183-6187.
- Das, J.; Koswatta, P.B.; Jones, J.D.; Yousufuddin, M.; Lovely, C.J. Total syntheses of kealiinines A-C. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6210-6213.
- Davis, R.A.; Aalbersberg, W.; Meo, S.; Moreira da Rocha, R.; Ireland, C.M. The isolation and synthesis of polyandrocarpamines A and B. Two new 2-aminoimidazolone compounds from the Fijian ascidian, *Polyandrocarpa sp.* *Tetrahedron Lett.* **2002**, *58*, 3263-3269.
- Davis, R.A.; Baron, P.S.; Neve, J.E.; Cullinane, C. A microwave-assisted stereoselective synthesis of polyandrocarpamines A and B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *50*, 880-882.
- Debdab, M.; Renault, S.; Eid, S.; Lozach, O.; Meijer, L.; Carreaux, F.; Bazureau, J.-P. An efficient method for the preparation of new analogs of leucettamine B under solvent-free microwave irradiation. *Heterocycles* **2009**, *78*, 1191-1203.
- Dendy, A. Synopsis of the Australian *Calcarea Heterocoela* with a proposed classification of the group and descriptions of some new genera and species. *Proc. Roy. Soc. Victoria* **1892**, *5*, 69-116.
- Dendy, A. The Percy Sladen trust expedition to the Indian Ocean in 1905 (V). I. Report on the calcareous sponges collected by HMS 'Sealark' in the Indian Ocean. *Trans.Linnean Soc. London* **1913**, *16*, 1-29.
- Dunbar, D.C.; Rimoldi, J.M.; Clark, A.M.; Kelly, M.; Hamann, M.T. Anti-cryptococcal and nitric oxide synthase inhibitory imidazole alkaloids from the calcareous sponge *Leucetta cf chagosensis*. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8795-8798.

- Edrada, R.A.; Stessman, C.C.; Crews, P. Uniquely modified imidazole alkaloids from a calcareous *Leucetta* sponge. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 939-942.
- Ermolat'ev, D.S.; Alifanov, V.L.; Rybakov, V.B.; Babaev, E.V.; Van der Eycken, E.V. A concise microwave-assisted synthesis of 2-aminoimidazole marine sponge alkaloids of the isonaamines Series. *Synthesis* **2008**, *13*, 2083-2088.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fu, X.; Barnes, J.R.; Do, T.; Schmitz, F.J. New imidazole alkaloids from the sponge *Leucetta chagosensis*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 497-498.
- Fu, X.; Schmitz, F.J.; Tanner, R.S.; Kelly-Borges, M. New imidazole alkaloids and zinc complexes from the Micronesian sponge *Leucetta* cf. *chagosensis*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 384-386.
- Gibbons, J.B.; Gligorich, K.M.; Welm, B.E.; Looper R.E. Synthesis of the reported structures for kealiinines B and C. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4734-4737.
- Gibbons, J.B.; Salvant, J.M.; Vaden, R.M.; Kwon, K.H.; Welm, B.E.; Looper, R.E. Synthesis of Naamidine A and Selective Access to N(2)-Acyl-2-aminoimidazole Analogues. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 10076-10085.
- Gross, H.; Kehraus S.; König, G.M.; Woerheide, G.; Wright, A.D. New and biologically active imidazole alkaloids from two sponges of the genus *Leucetta*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1190-1193.
- Haeckel, E. Die kalkschwämme. Eine monographie, Vols 1-3. **1872**, Berlin: Reimer.
- Hassan, W.H.B.; Al-Taweel A.M.; Proksch P. Two new imidazole alkaloids from *Leucetta chagosensis* sponge. *Saudi Pharmaceutical J.* **2009**, *17*, 295– 298.
- Hassan, W.; Edrada, R.; Ebel, R.; Wray, V.; Berg, A.; van Soest, R.; Wiryowidagdo, S.; Proksch, P. New imidazole alkaloids from the Indonesian sponge *Leucetta chagosensis*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 817-822.
- He, H.; Faulkner, D. J.; Lee, A. Y.; Clardy, J. A new imidazole alkaloid from the marine sponge *Leucetta microrhaphis*. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2176-2178.
- Imesek, M.; Plese, B.; Pfannkuchen, M.; Godrijan, J.; Pfannkuchen, D. M.; Klautau, M.; Cetkovic, H. Integrative taxonomy of four *Clathrina* species of the Adriatic Sea, with the first formal description of *Clathrina rubra* Sarà, 1958. *Organisms Diversity & Evolution* **2014**, *14*, 21-29.
- Karaman, M.W.; Herrgard, S.; Treiber, D.K.; Gallant, P.; Atteridge, C.E.; Campbell, B.T.; Chan, K.W.; Ciceri, P.; Davis, M.I.; Edeen, P.T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J.P.; Lockhart, D.J.; Milanov, Z.V.; Morrison, M.J.; Pallares, G.; Patel, H.K.; Pritchard, S.; Wodicka, L.M.; Zarrinkar, P.P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127-132.
- Katoh, S.; Standley, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability (Outlines version 7). *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772-780.
- Kawasaki, I.; Taguchi, N.; Yoneda, Y.; Yamashita, M.; Ohta, S. Highly effective procedure for introduction of amino group into the 2-position of imidazole ring. *Heterocycles* **1996**, *43*, 1375-1379.
- Klautau, M.; Azevedo, F.; Córdor-Luján, B.; Rapp, H.T.; Collins, A.; Russo, C.A. A molecular phylogeny for the order *Clathrinida* rekindles and refines Haeckel's taxonomic proposal for calcareous sponges. *Integr. Comp. Biol.* **2013**, *53*, 447-461.
- Klautau, M.; Valentine, C. Revision of the genus *Clathrina* (Porifera, Calcarea). *Zool. J. Linnean Soc.* **2003**, *139*, 1-62.
- Koswatta, P.B.; Lovely, C.J. Expedient total syntheses of preclathridine A and clathridine A *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 4998–5000.
- Koswatta, P.B.; Lovely, C.J. Concise total synthesis of naamine G and naamidine H. *Chem. Commun.* **2010a**, *46*, 2148-2150.
- Koswatta, P.B.; Lovely, C.J. Total Syntheses of naamidine G and 14-methoxynaamidine G. *Tetrahedron Lett.* **2010b**, *51*, 164-166.
- Koswatta, P.B.; Sivappa, R.; Dias, H.V.; Lovely, C.J. Total synthesis of (+/-)-calcaridine A and (+/-)-epi-calcaridine A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5055-5058.
- von Lendenfeld, R. A monograph of the Australian sponges. III. The *Calcispongiae*. *Proc. Linnean Soc. New South Wales* **1885**, *9*, 1083-1150.
- Lima, H.M.; Garcia-Barboza, B.J.; Khatibi, N.N.; Lovely, C.J. Total syntheses of isonaamine C and isonaamidine E. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5725-5727.
- Ling, Y.; Wang, Z.Q.; Xiao, Y.A.; Zhu, C.; Shen, L.; Wang, X.M.; Hui, Y.; Wang, X.Y. Benzylidene 2-aminoimidazolones derivatives: synthesis and in vitro evaluation of anti-tumor carcinoma activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2013**, *61*, 1081-1084.
- Mancini, I.; Guella, G.; Debitus, C.; Pietra, F. Novel naamidine-type alkaloids and mixed-ligand zinc(II) complexes from a calcareous sponge, *Leucetta* sp., of the Coral Sea. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 1178-1184.
- Molina, P.; Fresneda, P.M.; Sanz, M.A. Synthesis of marine alkaloids isonaamine A, dorimidazole A, and preclathridine A. Imminophosphorane-mediated preparation of 2-amino-1,4-disubstituted imidazoles from α -azido esters. *J. Org. Chem* **1999**, *64*, 2540-2544.

- Nakamura, S.; Kawasaki, I.; Yamashita, M.; Ohta, S. 1-Methyl-3-trimethylsilylparabanic acid as an effective reagent for the preparation of N-substituted (1-methyl-2,5-dioxo-1,2,5H-imidazolin-4-yl)amines and its application to the total synthesis of isonaamidines A and C, antitumor imidazole alkaloids. *Heterocycles* **2003**, *60*, 583-598.
- Nguyen, T.D.; Nguyen, X.C.; Longeon, A.; Keryhuel, A.; Le, M.H.; Kim, Y.H.; Chau, V.M.; Bourguet-Kondracki, M.L. Antioxidant benzylidene 2-aminoimidazolones from the Mediterranean sponge *Phorbas topsenti*. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 9256-9259.
- Plubrukarn, A.; Smith, D.W.; Cramer, R.E.; Davidson, B.S. (2*E*,9*E*)-pyronaamidine 9-(*N*-methylimine), a new imidazole alkaloid from the Northern Mariana islands sponge *Leucetta* sp. cf. *chagosensis*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 712-715.
- Ralifo, P.; Tenney, K.; Valeriote, F.A.; Crews, P. A distinctive structural twist in the aminoimidazole alkaloids from a calcareous marine sponge: isolation and characterization of leucosolenamines A and B. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 33-38.
- Ralifo, P.; Crews, P. A new structural theme in the imidazole-containing alkaloids from a calcareous *Leucetta* sponge. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9025-9029.
- Rossi, A.L.; Russo, C.A.M.; Solé-Cava, A.M.; Rapp, H.T.; Klautau, M. Phylogenetic signal in the evolution of body colour and spicule skeleton in calcareous sponges. *Zool. J. Linnean Soc.* **2011**, *163*, 1026-1034.
- Roué, M., Domart-Coulon I., Ereskovsky A., Djediat C., Perez T., Bourguet-Kondracki M. Cellular localization of clathridimine, an antimicrobial 2-aminoimidazole alkaloid produced by the Mediterranean calcareous sponge *Clathrina clathrus*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1277-1282.
- Roué, M., Quévrain, E., Domart-Coulon, I., Bourguet-Kondracki, M.L. Assessing calcareous sponges and their associated bacteria for the discovery of new bioactive natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 739-751.
- Roué, N.; Bergman, J. Synthesis of the marine alkaloid Leucettamine B. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 14729-14738.
- Selvaraju, M.; Sun, C.M. Unprecedented one-pot chemocontrolled entry to thioxoimidazolidinones and aminoimidazolones: synthesis of kinase inhibitor leucettamine B. *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 182-189.
- Solé-Cava, A.M.; Klautau, M.; Boury-Esnault, N.; Borojevic, R.; Thorpe, J.P. Genetic evidence for cryptic speciation in allopatric populations of 2 cosmopolitan species of the calcareous sponge genus *Clathrina*. *Marine Biol.* **1991**, *111*, 381-386.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis (Version 6.0). *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725-2729.
- Tsukamoto, S.; Kawabata, T.; Kato, H.; Ohta, T.; Rotinsulu, H.; Mangindaan, R.E.P.; van Soest, R.W.M.; Ukai, K.; Kobayashi, H.; Namikoshi, M. Naamidines H and I, cytotoxic imidazole alkaloids from the Indonesian marine sponge *Leucetta chagosensis*. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1658-1660.
- Valderrama, D.; Rossi, A.L.; Solé-Cava, A.M.; Rapp, H.T.; Klautau, M. Revalidation of *Leucetta floridana* (Haeckel, 1872) (*Porifera*, *Calcarea*): a widespread species in the tropical western Atlantic. *Zool. J. Linnean Soc.* **2009**, *157*, 1-16.
- White, K.N.; Amagata, T.; Oliver, A.G.; Tenney, K.; Wenzel, P.J.; Crews, P. Structure revision of spiroleucettadine, a sponge alkaloid with a bicyclic core meager in H-atoms. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8719-8722.
- Wörheide, G.; Epp, S.L.; Macis, L. Deep genetic divergences among Indo-Pacific populations of the coral reef sponge *Leucetta chagosensis* (*Leucettidae*): founder effects, vicariance, or both? *BMC Evol. Biol.* **2008**, *8*, 24.
- Wörheide, G.; Hooper, J.N.A. *Calcarea* from the Great Barrier Reef. 1: Cryptic *Calcinea* from Heron Island and Wistari Reef (Capricorn-Bunker Group). *Memoirs Queensland Mus.* **1999**, *43*, 859-891.
- Wörheide, G.; Hooper, J.N.A.; Degnan, B.M. Phylogeography of western Pacific *Leucetta* 'chagosensis' (*Porifera*: *Calcarea*) from ribosomal DNA sequences: implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). *Mol. Ecol.* **2002**, *11*, 1753-1768.
- Zavesky, B.P.; Babij, N.R.; Wolfe, J.P. Synthesis of substituted 2-aminoimidazoles via Pd-catalyzed alkyne carboamination reactions. Application to the synthesis of preclathridine natural products. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4952-4955.

III. Inhibition pharmacologique de CDK5, une protéine kinase impliquée dans les traumatismes crâniens, les AVC et la maladie d'Alzheimer

Une collaboration entre ManRos Therapeutics et le SUNY Downstate Medical Center de New York a permis de débiter un projet portant sur l'implication de CDK5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) dans les traumatismes crâniens. Lors de ces lésions, une hyperphosphorylation de la protéine Tau sur certains sites spécifiques, a priori induite par CDK5, conduit à des déficits de la mémoire ainsi qu'à des formes de démence. La roscovitine, un inhibiteur de CDK5 développé par ManRos Therapeutics, semble corriger ces dysfonctionnements et, par conséquent, limiter les risques de démence. Mon travail a consisté à compléter les travaux réalisés *in vivo* aux Etats-Unis en analysant *in vitro*, sur une lignée cellulaire surexprimant la protéine Tau humaine, les effets de la roscovitine en termes de phosphorylation de Tau et de survie cellulaire.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer le temps de traitement nécessaire pour visualiser l'effet de la roscovitine sur les phosphorylations de Tau. Pour cela nous avons réalisé une cinétique de 1 à 24 heures avec trois doses de roscovitine (figure 30). Un traitement de 6 heures semble optimal afin d'estimer l'inhibition de CDK5 et d'apprécier son effet dose-dépendant.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'efficacité d'inhibition de CDK5 par la roscovitine via la phosphorylation de Tau au niveau de la Ser202 et de la Thr231 (figure 31). La roscovitine inhibe les deux sites de phosphorylation testés, avec une IC₅₀ observée de 10,8 μ M et 31,3 μ M pour pT231 et pS202 respectivement. Cela confirmerait donc le fait que ces deux sites soient principalement phosphorylés par CDK5.

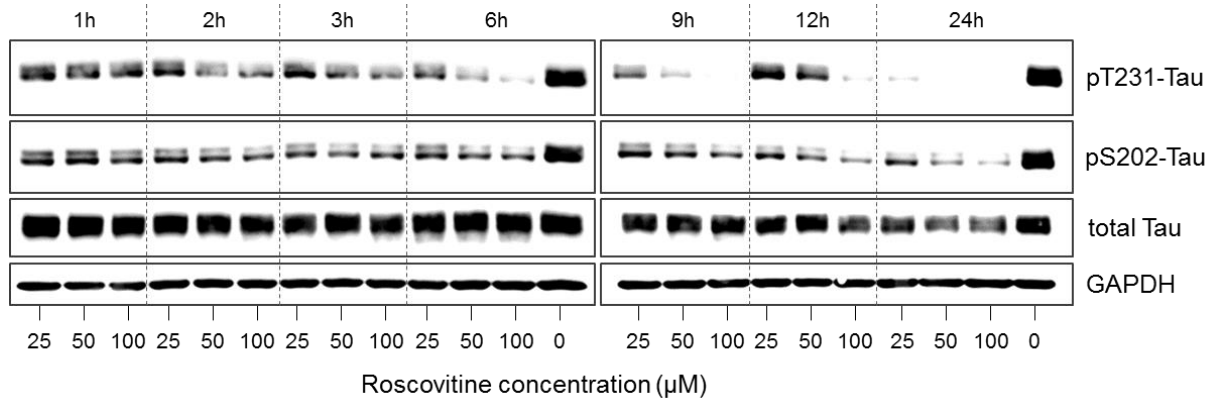


Figure 30 : Cinétique de la down-régulation de la phosphorylation de Tau par 3 doses de roscovitine. Les cellules SH-SY5Y-P301L ont été exposées pendant 1 à 24 heures à 0, 25, 50 ou 100 μM de roscovitine. Le niveau de phosphorylation de la Thr231 et de la Thr202 de Tau, ainsi que l'expression de Tau totale a été évaluée par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

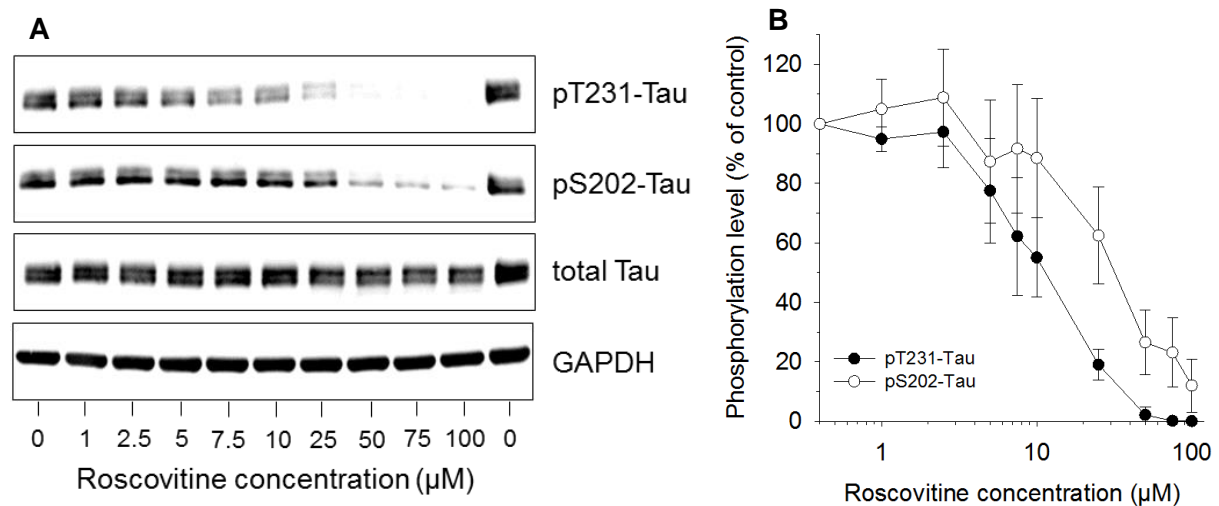


Figure 31 : La down-régulation de la phosphorylation de Tau, de manière dose-dépendante, est induite par la roscovitine. Les cellules SH-SY5Y-P301L ont été exposées pendant 6 heures à une gamme de concentration de roscovitine. Le niveau de phosphorylation de la Thr231 et de la Thr202 de Tau, ainsi que l'expression de Tau totale ont été évalués par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge (A). La quantification des phosphorylations de Tau (moyenne, avec écart-type standard de 3 expériences indépendantes) a été normalisée par la quantification de Tau totale, puis comparée à la quantification moyenne des contrôles DMSO (B).

Afin de vérifier que les phosphorylations de Tau observées sont spécifiques des CDK, nous avons testé plusieurs inhibiteurs de différentes familles de kinases (figure 32). Il semblerait que la phosphorylation de la Thr231 soit relativement spécifique de CDK5, tandis que celle de la Ser202 est aussi inhibée par IC261, un inhibiteur de

CK1 (mais inhibant CDK5 à plus forte dose : IC₅₀ à 16 μ M et 4,5 mM pour CK1 et CDK5 respectivement selon la littérature).

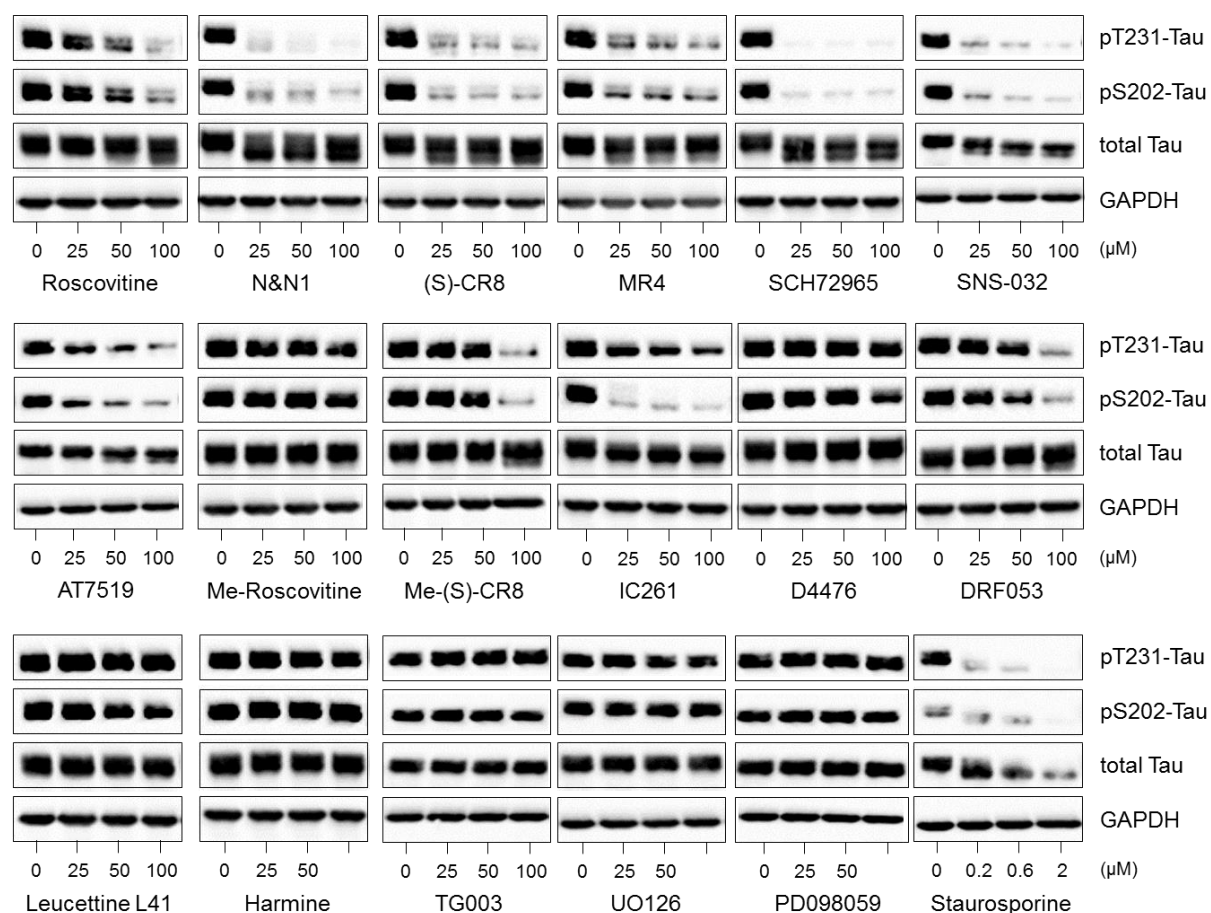


Figure 32 : La phosphorylation de Tau n'est pas induite par des kinases autres que celles ciblées par la roscovitine ou le S-CR8. Les cellules SH-SY5Y-P301L ont été exposées pendant 6 heures à des inhibiteurs pharmacologiques de CDK (roscovitine, N&N1, (S)-CR8, MR4, SCH72965, SNS-032, AT7519), CK1 (IC261, D4476, DRF053), DYRK/CLK (Leucettine L41, harmine, TG003), MEK1 (UO126, PD098059), à un inhibiteur de kinases général (staurosporine) ou à des inhibiteurs de kinase inactifs dérivés de la roscovitine (N6-méthyl-roscovitine) ou du (S)-CR8 (N6-méthyl-(S)-CR8). Tous les inhibiteurs ont été testés à 25, 50 et 100 μ M, excepté la staurosporine (0,2, 0,6 et 2 μ M). Le niveau de phosphorylation de la Thr231 et de la Thr202 de Tau, ainsi que l'expression de Tau totale ont été évalués par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

Pour aller plus loin, nous avons ensuite testé l'effet de la roscovitine et de deux de ses dérivés de manière dose-dépendante (figure 33). Le (S)-CR8 et le N-N1 sont plus efficaces que la roscovitine quant à l'inhibition des phosphorylations de Tau au niveau de ses Thr231 et Ser202. Cependant, cet effet est corrélé à une toxicité assez importante de ces molécules au-delà de 25 μ M.

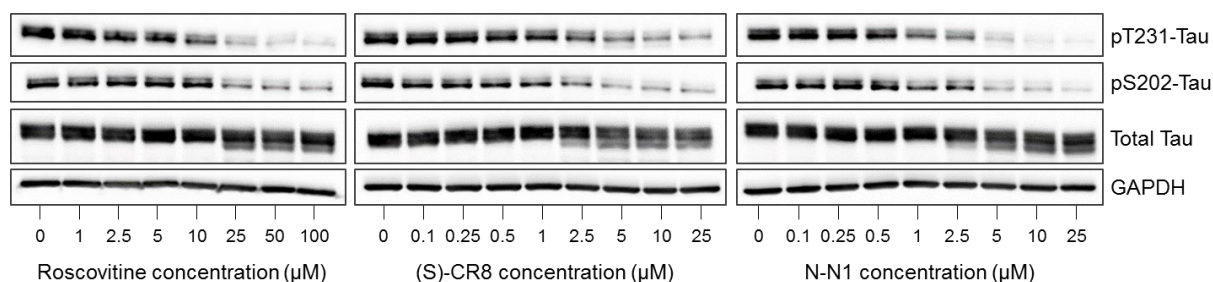


Figure 33 : La down-régulation de la phosphorylation de Tau, de manière dose-dépendante, est induite par les kinases inhibées par la roscovitine, le (S)-CR8 et le N-N1. Les cellules SH-SY5Y-P301L ont été exposées pendant 6 heures à une gamme de concentration de roscovitine, de (S)-CR8 ou de N-N1. Le niveau de phosphorylation de la Thr231 et de la Thr202 de Tau, ainsi que l'expression de Tau totale ont été évalués par western blotting. L'expression de la GAPDH a été contrôlée en tant que témoin de charge.

CDK5 est une protéine indispensable au développement neuronal,^{359,360} à la plasticité synaptique, à l'apprentissage et à la mémoire.^{361–363} L'interaction de CDK5 avec p35 ou p39 est essentielle à son activation.^{364–366} Les lésions neurotoxiques, tels que les amyloïdes β augmentent la concentration de calcium intracellulaire,³⁶⁷ provoquant l'activation de la caplain responsable du clivage de p35 en p25,^{368–372} engendrant alors une activité aberrante et anormale de CDK5. Ce même schéma, résultant en une neurotoxicité, est également observé suite à une ischémie et contribue aux AVC.³⁷³ Les patients souffrants de traumatismes crâniens montrent certaines caractéristiques communes avec les patients présentant des maladies dégénératives : l'accumulation de peptides amyloïdes β , de Tau, de presenilin 1, α -synuclein.^{374,375} Par ailleurs, un seul épisode de traumatisme modéré à sévère pourrait être suffisant pour faciliter le développement de maladies neurodégénératives. En effet, les traumatismes crâniens induisent la formation de p25, et donc une activation aberrante de CDK5/p25, induisant alors une phosphorylation aberrante des protéines Tau et Retinoblastoma (Rb). L'atténuation de l'activité de CDK5 permet de réduire le volume des lésions et de maintenir les réponses neurophysiologiques. CDK5 contribuerait donc à la progression des traumatismes crâniens et cibler son activation aberrante serait une cible appropriée pour une thérapie.³⁷⁶ En ciblant CDK5, la roscovitine permet une diminution de la phosphorylation de Tau au niveau de deux sites impliqués dans le processus d'enchevêtrement neurofibrillaire. De plus, les tests, réalisés aux Etats-Unis, sur les souris sont prometteurs. Cependant, la roscovitine n'est pas très sélective et son action inhibitrice sur des kinases autres que CDK5 pourrait conduire à des effets

indésirables. Par conséquent, le développement d'un inhibiteur spécifique de CDK5 est un enjeu pour ManRos Therapeutics.

Conclusion & perspectives

I. Implication des pesticides dans la production de peptides amyloïdes

De nombreux produits naturels et synthétiques ont été testés quant à leur potentiel alzheimerigène. Parmi eux, deux familles de pesticides ont été étudiées plus en détail : les triazines et les pyrazoles. Plusieurs tests cellulaires ont démontré la capacité de certains de ces pesticides à induire la production de formes longues de peptides amyloïdes ; ces derniers étant bien connus pour leur tendance à s'agréger, formant ainsi des oligomères toxiques et impliqués dans les processus menant à la MA. Le mécanisme d'action de ces pesticides pourrait impliquer des effets sur la γ -sécrétase ou sur son micro-environnement. En effet ces composés induisent la production d'A β 42, augmentant alors le ratio A β 42/A β 40, et un mécanisme similaire a été observé sur d'autres substrats de la γ -sécrétase. Des études plus approfondies sur le fipronil, un insecticide de la famille des pyrazoles, et quelques-uns de ses métabolites et photoproduits, ont montré leur implication dans la modification du clivage d'APP par une γ -sécrétase purifiée. Des analyses protéomiques et phosphoprotéomiques sur les effets cellulaires du fipronil sulfone, métabolite majoritaire du fipronil, ont été entrepris. Cette molécule semble jouer un rôle dans les voies de signalisation impliquées dans la MA, le cycle cellulaire et le stress oxydatif. Un examen plus approfondi de ces données permettrait, éventuellement, de découvrir des pistes intéressantes quant aux mécanismes menant à l'apparition, au développement et à l'accélération de la MA.

Par ailleurs, les études sur les animaux ont montré une biotransformation du fipronil en fipronil sulfone et une accumulation de ce dernier dans le sang, le cerveau et principalement dans les tissus adipeux. Une étude, à plus long terme, sur le point de débiter, vise à analyser la capacité du fipronil à induire, *in vivo*, la production de long peptides A β dans le cerveau. Le comportement des animaux sera également examiné. Cela permettrait d'en apprendre plus sur les risques encourus suite à l'exposition à cet insecticide, ainsi que de mettre au point un modèle chimio-induit de la MA.

Ces pesticides, faisant partie des composés chimiques auxquels nous sommes exposés régulièrement (le « Human Chemical Exposome ») pourraient constituer

une partie des facteurs environnementaux contribuant à l'apparition, au développement et à l'accélération de la MA. C'est pourquoi il est important de poursuivre ces études afin de prévenir des dangers possibles liés à l'utilisation de ces produits.

II. Inhibition pharmacologique de DYRK1A, une protéine kinase impliquée dans la maladie d'Alzheimer

L'inhibition pharmacologique de DYRK1A est un enjeu de ManRos Therapeutics afin de développer un traitement contre la MA et la T21. Beaucoup de molécules, parmi les leucettines, les RCZ et les polyandrocarpamines ont été testées. L'action de certaines sur l'activité de DYRK1A est indubitable mais leur manque de spécificité ou de capacité à passer la membrane plasmique sont des problèmes majeurs. Les tests de relation structure-activité aboutissant à l'optimisation des inhibiteurs de DYRK1A sont toujours en cours au sein de l'entreprise et avec l'aide de quelques collaborations.

Même si l'interaction entre la L41 et DYRK1A a été démontrée, les autres cibles de cet inhibiteur ne sont pas toutes connues. Afin d'identifier ces cibles, deux types d'analyses protéiques ont déjà débuté : d'une part, une analyse par spectrométrie de masse examinant le protéome ainsi que le phosphoprotéome modifié par l'exposition à la leucettine L41, et d'autre part, une analyse par micro-array sur un panel d'anticorps et de phospho-anticorps. Ces études aideront à la compréhension du mécanisme d'action de la leucettine L41 et de ses dérivés, ainsi qu'à l'optimisation de la structure chimique des prochaines leucettines, afin qu'elles soient plus actives, plus sélectives et moins toxiques.

III. Inhibition pharmacologique de CDK5, une protéine kinase impliquée dans les traumatismes crâniens, les AVC et la maladie d'Alzheimer

Les traumatismes crâniens touchent entre 7,3 et 811 personnes sur 100 000 en un an selon les pays ; l'Europe Occidentale étant la région la moins impactée, à l'opposé de la Nouvelle-Zélande. Le nombre de personnes hospitalisées en France pour un traumatisme crânien est estimé à 120 000 par an, d'après l'association « UNAFTC », et à un million aux Etats-Unis. Les AVC, quant à eux, représentent la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence après la MA, et la deuxième cause de mortalité. Le nombre de cas par an en France est estimé à plus de 130 000, plus de 795 000 aux Etats-Unis et environ 15 millions dans le monde dont 5 millions en décèdent et 5 autres millions en auront des séquelles à vie. Le nombre annuel mondial de personnes touchées par les AVC est estimé à 23 millions en 2030. CDK5 étant impliquée dans ces deux pathologies ainsi que dans la MA, le développement d'un inhibiteur de cette kinase est une piste intéressante.

Un modèle murin de traumatisme crânien, mis au point par des collaborateurs à New York, démontre l'efficacité de la roscovitine quant à l'amélioration des capacités neurologiques suite à un tel incident. Nos tests cellulaires confirment la faculté de la roscovitine à diminuer les sites de phosphorylation de Tau impliqués dans ces pathologies. Cependant, l'action inhibitrice de la roscovitine sur des kinases autres que CDK5 pourrait conduire à des effets indésirables. Par conséquent, le développement d'un inhibiteur spécifique de CDK5 serait un enjeu pour ManRos Therapeutics.

Matériels et méthodes

I. Culture cellulaire

Les cellules Neuro2a-APP₆₉₅ (**N2a-APP₆₉₅**, don du Dr. Marc Flajolet, Rockefeller Institut, New York, USA) sont cultivées dans du DMEM (*Dulbecco's minimal essential medium*) / OptiMEM (1:1 v/v, Gibco®), supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal décomplémenté (FBS, Gibco®) et 200 µg/mL de Geneticin G418 (HyClone Laboratories, Inc.®), dans un incubateur à 37°C, à 5% de CO₂, en atmosphère humide. Les cellules sont diluées tous les 2-3 jours. Brièvement, le milieu usagé est retiré, puis les cellules sont rincées deux fois au PBS. Elles sont ensuite décollées avec du Versene (Gibco®) pendant 5 min à température ambiante, puis récoltées et centrifugées 3 min à 1000 rpm. Le culot est resuspendu dans du milieu de culture et les cellules sont réensemencées au 1/8.

Les cellules **SH-SY5Y** (don du Dr. Jean Bernard, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) sont cultivées dans du DMEM-F12 (Gibco®), supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (FBS, Gibco®) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Gibco®), dans un incubateur à 37°C, à 5% de CO₂, en atmosphère humide. Les cellules sont diluées tous les 4-5 jours. Brièvement, le milieu usagé est retiré, puis les cellules sont rincées une fois au PBS. Elles sont ensuite décollées avec du la Trypsine (Gibco®) pendant 3 min à 37°C, puis récoltées et centrifugées 3 min à 1000 rpm. Le culot est resuspendu dans du milieu de culture et les cellules sont réensemencées au 1/3.

Les cellules **SH-SY5Y-D1A** et **SH-SY5Y-KD** (don du Dr. Walter Becker, Institute of Pharmacology and Toxycology, Aachen University, Germany), ainsi que les **SH-SY5Y-Tau4R** et **SH-SY5Y-P301L** (don du Pr. Fred Van Leuven, Department of Human Genetics, KU Leuven, Belgium), sont cultivées de la même façon.

Les cellules **HT22** (Salk Institute, La Jolla, USA) et **CHO-7PA2** sont cultivées dans du DMEM (Gibco®), supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (FBS, Gibco®) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Gibco®), dans un incubateur à 37°C, à 5% de CO₂, en atmosphère humide. Les cellules sont diluées tous les 2-3 jours. Brièvement, le milieu usagé est retiré, puis les cellules sont rincées une fois au PBS. Elles sont ensuite décollées avec du la Trypsine

(Gibco®) pendant 3 min à 37°C, puis récoltées et centrifugées 3 min à 1000 rpm. Le culot est resuspendu dans du milieu de culture et les cellules sont réensemencées au 1/10.

II. Western blot

Traitement des cellules

Les cellules sont ensemencées à $1,5 \cdot 10^6$ cellules/P60 dans leurs milieux de culture respectifs, puis sont incubées la nuit à 37°C, à 5% de CO₂, en atmosphère humide. Les composés testés sont ajoutés dans le milieu pour une concentration finale en DMSO à 0,1% et les cellules sont incubées pendant des périodes variables à 37°C, à 5% de CO₂, en atmosphère humide.

Extraction et dosage protéique

Le milieu est retiré et les cellules sont rincées au PBS, puis grattées dans 500 µL de PBS supplémenté en inhibiteurs de protéases (inhibitor cocktail, Roche). Elles sont ensuite centrifugées 10 min à 21100 g à 4°C. Le culot cellulaire est lysé dans du tampon PY [25 mM MOPS (Sigma), 15 mM EGTA (Sigma), 15 mM Magnesium chloride (MgCl₂, Sigma), 60 mM β-glycerophosphate (C₃H₇Na₂O₆P, Sigma), 15 mM p-nitrophenylphosphate (pNPP, Sigma), 2 mM DL-Dithithreitol (DTT, Sigma), 1 mM Orthovanadate de sodium (Na₃VO₄, Sigma), 1 mM Sodium fluoride (NaF, Sigma), 1 mM Di sodium phenylphosphate (Na₂PP, Sigma), 1X Inhibiteur de protéases (Roche), pH 7,2] supplémenté avec 0,1% de Nonidet P-40. Après avoir vortexé les extraits cellulaires 10 sec, ils sont centrifugés 10 min à 21100 g à 4°C, et la concentration protéique des surnageants est déterminée par un dosage « DC protein assay » (adapté de Lowry *et al.* (1951), Bio-Rad).

Préparation des échantillons, électrophorèse et transfert

Les extraits protéiques sont dilués au 1/2 dans du tampon de dépôt 2X (Novex™ NuPAGE™ LDS sample buffer, Life Technologies) et dénaturés 3 min à 95°C. Les échantillons (20 µg de protéines totales) sont déposés sur des gels pré-coulés (Novex™ NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris, Invitrogen). La migration des protéines est réalisée dans un tampon MOPS (Novex™ NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer,

Invitrogen) et le transfert est effectué sur une membrane de nitrocellulose (0,2 μ M, Trans-Blot® Turbo™ Nitrocellulose Transfer Packs, Bio-Rad). La membrane est alors bloquée afin de limiter les interactions aspécifiques à l'aide d'une incubation d'1h dans 5% lait (Régilait®) solubilisé dans du TBST (TBS (Fisher Scientific®) contenant 0,1% de Tween-20 (Sigma)).

Incubation des anticorps et révélation

Les anticorps primaires sont incubés sur la nuit à 4°C ou 2h à température ambiante. Les anticorps secondaires (Bio-Rad) sont incubés 1h à température ambiante. Enfin, les membranes sont révélées à l'aide d'une solution d'ECL maison (100 mM Tris, 1,25 mM Luminol, 225 μ M Acide Coumaric, 0,009% eau oxygénée) et d'un système de chimioluminescence (Fusion FX7, Vilber Lourmat).

Projet	Anticorps	Fabricant	Dilution	Temps d'incubation
DYRK1A	Tau totale	Abcam	1/3000	La nuit
	pT212-Tau	Abcam	1/2000	La nuit
	AT8 (pS202/T205-Tau)	Innogenetics	1/2000	La nuit
	Cycline D1	Cell Signaling	1/2000	La nuit
	pT286-Cycline D1	Cell Signaling	1/2000	La nuit
	DYRK1A	Abnova	1/2000	2h
	GAPDH	Bio-Rad	1/30000	2h
CDK5	Tau totale	Fournis par le Dr. Rubenstein	1/1000	2h
	pT231-Tau		1/500	2h
	pS202-Tau		1/500	2h

III. Capture ELISA

Préparation des échantillons

Les cellules N2aAPP₆₉₅ sontensemencées à 10000 cellules/puits, dans 100 μ L de milieu modifié (0,5% de FBS) dans des plaques 96 puits et incubées pendant la nuit. Les cellules sont ensuite traitées avec les différents composés à tester, dilués dans du milieu frais (quantité identique de DMSO (Sigma) pour chaque traitement), puis incubées pendant 18h à 37°C et 5% de CO₂.

Capture ELISA

Les quantités de peptides A β 38, A β 40 et A β 42 sont mesurés à l'aide d'une technique de capture ELISA utilisant une combinaison d'anticorps monoclonal 6E10 (BioLegend®) dirigé contre la partie NTF du peptide A β (acides aminées 1-16), et

d'anticorps polyclonaux biotinylés dirigés spécifiquement contre A β 38, A β 40 ou A β 42 (fournis par le Dr. PD Mehta, IBR, Staten Island, USA). Brièvement, l'anticorps 6E10 est dilué dans un tampon carbonate-bicarbonate (15,10 mM de carbonate de sodium (Na₂CO₃, Sigma®), 35,11 mM de bicarbonate de sodium (NaHCO₃, Sigma®), pH 9,6). 100 μ L de cette solution sont ensuite déposés dans chacun des puits de la plaque de microtitration (Nunc®, Maxisorp™) et incubés la nuit à 4°C. Les puits sont lavés 3 fois avec 300 μ L de PBST (PBS (PBS Tablets, Gibco®) contenant 0,05% de Tween-20 (Sigma®)), et bloqués pendant 1h avec 200 μ L de BSA (Sigma®) à 1% dans du PBST afin d'éviter toutes liaisons aspécifiques. Après une étape de lavage, 60 μ L des échantillons sont mis en contact et incubés 2h à température ambiante puis la nuit à 4°C. Les puits sont de nouveau lavés de la même façon avant d'y ajouter 100 μ L d'anticorps polyclonal biotinylé (dirigé contre A β 38, A β 40 ou A β 42), dilué dans du PBST contenant 0,5% de BSA, et incubé 75 min à température ambiante. Suite à une autre étape de lavage, 100 μ L d'une solution à 0,2 μ g/mL de streptavidine couplée HRP (Streptavidin-PolyHRP, Thermo Scientific® Pierce®), diluée dans du PBS contenant 1% de BSA, sont ajoutés dans les puits et incubés 45 min à température ambiante. Après un dernier lavage, 100 μ L d'O-phénylènediamine dichlorhydrate (1 tablette (OPD tablets, Invitrogen®) solubilisée dans 12 mL de tampon citrate (490,15 mM d'acide citrique monohydrate (C₆H₈O₇, H₂O, Sigma®), 50,71 mM de phosphate de sodium dibasic dodecahydrate (Na₂HPO₄, 12H₂O, Sigma®), 0,03% d'eau oxygénée (H₂O₂, Sigma®), pH 5,0)) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée 15 min à température ambiante, à l'obscurité et la réaction est arrêtée avec 100 μ L d'acide sulfurique 1N. La densité optique est ensuite mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioTek Instrument, EI 800, Gen 5 software).

IV. Test de viabilité cellulaire

Les composés testés proviennent de Sigma®, sauf indication contraire mentionnée dans les articles.

Préparation des cellules en comparaison au test de capture ELISA

Les cellules N2aAPP₆₉₅ sontensemencées à 10000 cellules/puits, dans 100 µL de milieu modifié (0,5% de FBS) dans des plaques 96 puits et incubées pendant la nuit. Les cellules sont ensuite traitées avec les différents composés à tester, dilués dans du milieu frais (quantité identique de DMSO pour chaque traitement), puis incubées pendant 18h à 37°C et 5% de CO₂.

Préparation des cellules pour les tests classiques de viabilité cellulaire

Les cellules sontensemencées à 10000 cellules/puits (N2a-APP₆₉₅), 5000 cellules/puits (HT22) ou 50000 cellules/puits (SH-SY5Y-Tau4R) dans 100 µL de milieu dans des plaques 96 puits et incubées pendant la nuit. Les cellules sont ensuite traitées avec les différents composés à tester, dilués dans du milieu frais (quantité identique de DMSO pour chaque traitement), puis incubées pendant le temps désiré à 37°C et 5% de CO₂.

Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide d'un test MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega®). La solution contient un composé tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] et un réactif de couplage d'électrons (phenazine ethosulfate; PES). Ensuite, 20 µL de réactif MTS sont ajoutés dans chaque puits contenant 100 µL de milieu de culture puis incubés pendant 1h30 (N2a-APP₆₉₅, HT22) ou 3h (SH-SY5Y-Tau4R) à 37°C, 5% de CO₂, en atmosphère humide. La densité optique est ensuite mesurée à 490Δ630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioTek Instrument, El 800, Gen 5 software).

V. Analyse de spectrométrie de masse

Les cellules N2aAPP₆₉₅ ont été détachées de la plaque avec du Versene, centrifugées pendant 3 min à 1000 tr/min et mises en suspension dans 10 ml de milieu. Les cellules ont été comptées etensemencées dans des plaques de 100 mm de diamètre à 8.10⁶ cellules/plaque. Le milieu utilisé était du DMEM/OptiMEM (1:1) complété par 0,5% de FBS. Le deuxième jour, les cellules ont été traitées avec 5 mL de milieux frais contenant 1 µM de DAPT ou DMSO comme témoin. Après 1 heure, 5

ou 20 μ M de fipronil sulfone ou DMSO ont été ajoutés à une concentration finale de DMSO de 0,2 % (0,1% pour DAPT + 0,1% pour fipronil sulfone) pendant 18 h. Le troisième jour, le milieu a été recueilli dans des tubes de 15 mL (1 tube par condition). Les tubes ont été homogénéisés et 200 μ L ont été réservés pour l'analyse ELISA (test de capture ELISA). Les 4,8 mL restants ont été congelés dans l'azote liquide, conservés à -80°C et analysés par spectrométrie de masse. Les cellules ont été rincées dans 5 mL de PBS, grattées dans 1 mL de PBS supplémenté en inhibiteurs de protéases et centrifugées 10 min à 21100 g à 4°C. Les culots cellulaires ont été congelés dans l'azote liquide, conservés à -80 ° C et analysés par spectrométrie de masse. Le même protocole a été suivi pour les cellules traitées à l'affin-5, au dipropetryn et au terbutryn, à l'exception de l'absence de prétraitement au DAPT, et donc une concentration finale de 0.1% de DMSO.

L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée par une collaboration à Southampton, en Angleterre. Après réception des listes de protéines (indiquées par leur numéro d'accension Uniprot), nous les avons examinées et comparées entre elles. L'analyse fonctionnelle a été réalisée à l'aide de la plateforme « DAVID analysis ». Les voies de signalisation, les processus biologiques, les compartiments cellulaires et les fonctions moléculaires ressortant de ces analyses ont été sélectionnés de la manière suivante : $p\text{-value} < 0.01$, $\text{FDR} < 0.05$ et $\text{Fold enrichment} > 1.5$. (FDR = False Discovery Rate)

Bibliographie

Revues scientifiques

1. BERRIOS, G. E. Alzheimer's disease: a conceptual history. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **5**, 355–365 (1990).
2. Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer ' s disease. *Lancet* **349**, 1906–1909 (1997).
3. Cipriani, G., Dolciotti, C., Picchi, L. & Bonuccelli, U. Alzheimer and his disease: A brief history. *Neurol. Sci.* **32**, 275–279 (2011).
4. Kraepelin, E. *Memoirs*. (Springer Berlin Heidelberg, 1987). doi:10.1007/978-3-642-71924-0
5. Reisberg, B., Ferris, S. H., DeLeon, M. J., D, E. & Crook, T. The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am. J. Psychiatry* **139**, 1136–1139 (1982).
6. Dubois, B. *et al.* Revising the definition of Alzheimer's disease: A new lexicon. *Lancet Neurol.* **9**, 1118–1127 (2010).
7. Morris, J. C. Early-stage and preclinical Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **19**, 163–5 (2005).
8. Sperling, R. A. *et al.* Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **7**, 280–292 (2011).
9. Sperling, R. A. *et al.* Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimer's Dement.* **7**, 367–385 (2011).
10. Albert, M. S. *et al.* The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **7**, 270–279 (2011).

11. McKhann, G. M. *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **7**, 263–269 (2011).
12. Jack, C. R. *et al.* Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain* **133**, 3336–3348 (2010).
13. Craig-Schapiro, R. *et al.* YKL-40: A novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* **68**, 903–912 (2010).
14. Villemagne, V. L. *et al.* Longitudinal Assessment of Ab and Cognition in Aging and Alzheimer Disease. *Ann. Neurol.* **69**, 181–192 (2011).
15. Yamada, K. *et al.* In Vivo Microdialysis Reveals Age-Dependent Decrease of Brain Interstitial Fluid Tau Levels in P301S Human Tau Transgenic Mice. *J. Neurosci.* **31**, 13110–13117 (2011).
16. Hort, J. *et al.* EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **17**, 1236–1248 (2010).
17. Dubois, B. *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* **13**, 614–629 (2014).
18. Walhovd, K. B. *et al.* Combining MR imaging, positron-emission tomography, and CSF biomarkers in the diagnosis and prognosis of Alzheimer disease. *AJNR.American J. Neuroradiol.* **31**, 347–354 (2010).
19. Mapstone, M. *et al.* Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* **advance on**, 415–418 (2014).
20. Klunk, W. E. *et al.* Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* **55**, 306–319 (2004).
21. Maruyama, M. *et al.* Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* **79**, 1094–1108 (2013).
22. Albert, M. & Hane, F. *Hyperpolarized and Inert Gas MRI: From Technology to Application in Research and Medicine.* (Elsevier, 2016).
23. Robinson, M., Lee, B. Y. & Hane, F. T. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J. Alzheimer's Dis. Preprint*, 1–14 (2017).
24. Qiu, C., Kivipelto, M. & Von Strauss, E. Epidemiology of Alzheimer's disease:

- Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* **11**, 111–128 (2009).
25. Ferri, C. P. *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet (London, England)* **366**, 2112–7 (2005).
 26. Wimo, A., Winblad, B., Aguero-Torres, H. & von Strauss, E. The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **17**, 63–7 (2003).
 27. Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K. & Arrighi, H. M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* **3**, 186–91 (2007).
 28. Sosa-Ortiz, A. L., Acosta-Castillo, I. & Prince, M. J. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.* **43**, 600–8 (2012).
 29. Prince, M. *et al.* World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International. *Alzheimer's Dis. Int.* (2015).
 30. Ankri, J. Epidémiologie des démences et de la maladie d'Alzheimer. *Bull. Epidémiologique Hebd.* **5**, 42–4 (2006).
 31. Alzheimer's Association. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* 13:325-373 (2017).
 32. Panegyres, P. K. & Chen, H.-Y. Differences between early and late onset Alzheimer's disease. *Am. J. Neurodegener. Dis.* **2**, 300–6 (2013).
 33. Suh, Y.-H. & Checler, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* **54**, 469–525 (2002).
 34. Shukla, V., Skuntz, S. & Pant, H. C. Deregulated Cdk5 activity is involved in inducing Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.* **43**, 655–62 (2012).
 35. Norton, S., Matthews, F. E., Barnes, D. E., Yaffe, K. & Brayne, C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet. Neurol.* **13**, 788–94 (2014).
 36. Barnes, D. E. & Yaffe, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet. Neurol.* **10**, 819–28 (2011).
 37. Li, J. *et al.* Vascular risk factors promote conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology* **76**, 1485–1491 (2011).
 38. Shoelson, S. E., Herrero, L. & Naaz, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology* **132**, 2169–2180 (2007).

39. de Heredia, F. P., Gómez-Martínez, S. & Marcos, A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* **71**, 332–8 (2012).
40. Korf, E. S. C., White, L. R., Scheltens, P. & Launer, L. J. Brain aging in very old men with type 2 diabetes: the Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes Care* **29**, 2268–2274 (2006).
41. Xu, W. L., Von Strauss, E., Qiu, C. X., Winblad, B. & Fratiglioni, L. Uncontrolled diabetes increases the risk of Alzheimer's disease: A population-based cohort study. *Diabetologia* **52**, 1031–1039 (2009).
42. Baker, L. D. *et al.* Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Arch Neurol* **68**, 51–57 (2011).
43. Francis, H. & Stevenson, R. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite* **63**, 119–128 (2013).
44. Sotiropoulos, I. *et al.* Stress Acts Cumulatively To Precipitate Alzheimer's Disease-Like Tau Pathology and Cognitive Deficits. *J. Neurosci.* **31**, 7840–7847 (2011).
45. Carroll, J. C. *et al.* Chronic Stress Exacerbates Tau Pathology , Neurodegeneration , and Cognitive Performance through a Mechanism in a Transgenic Mouse Model of Tauopathy. *J. Neurosci.* **31**, 14436–14449 (2011).
46. Cohen, S. *et al.* Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5995–9 (2012).
47. Killin, L. O. J., Starr, J. M., Shiue, I. J. & Russ, T. C. Environmental risk factors for dementia: a systematic review. *BMC Geriatr.* **16**, 175 (2016).
48. Littlejohns, T. J. *et al.* Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Neurology* **83**, 920–8 (2014).
49. Yegambaram, M., Manivannan, B., Beach, T. G. & Halden, R. U. Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: A Review. *Curr. Alzheimer Res.* **12**, 116–146 (2015).
50. Baldi, I. *et al.* Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *Am. J. Epidemiol.* **157**, 409–14 (2003).
51. Hayden, K. M. *et al.* Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: The Cache County Study. *Neurology* **74**, 1524–1530 (2010).
52. Parrón, T., Requena, M., Hernández, A. F. & Alarcón, R. Association between

- environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **256**, 379–385 (2011).
53. Tyas, S. L., Manfreda, J., Strain, L. A. & Montgomery, P. R. Risk factors for Alzheimer's disease: a population-based, longitudinal study in Manitoba, Canada. *Int. J. Epidemiol.* **30**, 590–7 (2001).
 54. Mostafalou, S. & Abdollahi, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* **91**, 549–599 (2017).
 55. Abdollahi, M. & Karami-Mohajeri, S. A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **258**, 309–14 (2012).
 56. Karami-Mohajeri, S., Nikfar, S. & Abdollahi, M. A systematic review on the nerve-muscle electrophysiology in human organophosphorus pesticide exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* **33**, 92–102 (2014).
 57. Stehr, C. M., Linbo, T. L., Incardona, J. P. & Scholz, N. L. The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. *Toxicol. Sci.* **92**, 270–8 (2006).
 58. Lee, S.-J. *et al.* Acute illnesses associated with exposure to fipronil--surveillance data from 11 states in the United States, 2001-2007. *Clin. Toxicol. (Phila)*. **48**, 737–44 (2010).
 59. Limon, A., Reyes-Ruiz, J. M. & Miledi, R. Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10071–6 (2012).
 60. Lambert, J. C. *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **45**, 1452–8 (2013).
 61. Castellano, J. M. *et al.* Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci. Transl. Med.* **3**, 89ra57 (2011).
 62. Braskie, M. N. *et al.* Common Alzheimer's Disease Risk Variant within the CLU Gene Affects White Matter Microstructure in Young Adults. *J. Neurosci.* **31**, 6764–6770 (2011).
 63. Naj, A. C. *et al.* Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **43**, 436–441 (2011).
 64. Logue, M. W. *et al.* A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans. *Arch. Neurol.* **68**, 1569–1579 (2011).

65. Griciuc, A. *et al.* Alzheimer's disease risk gene cd33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* **78**, 631–643 (2013).
66. Guerreiro, R. *et al.* *TREM2* Variants in Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **368**, 117–127 (2013).
67. Jonsson, T. *et al.* Variant of *TREM2* Associated with the Risk of Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 121114152813005 (2012). doi:10.1056/NEJMoa1211103
68. Zhang, Y. *et al.* Genetic reduction of striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP) reverses cognitive and cellular deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19014–19019 (2010).
69. Bhaskar, K. *et al.* Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* **68**, 19–31 (2010).
70. Lee, J. H. *et al.* Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* **141**, 1146–1158 (2010).
71. Neely, K. M., Green, K. N. & LaFerla, F. M. Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy-lysosome system in a γ -secretase-independent manner. *J. Neurosci.* **31**, 2781–2791 (2011).
72. Rao, J. S., Keleshian, V. L., Klein, S. & Rapoport, S. I. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl. Psychiatry* **2**, e132 (2012).
73. Gräff, J. *et al.* An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* **483**, 222–6 (2012).
74. Beckett, M. W., Arden, C. I. & Rotondi, M. A. A meta-analysis of prospective studies on the role of physical activity and the prevention of Alzheimer's disease in older adults. *BMC Geriatr.* **15**, 9 (2015).
75. Macpherson, H., Teo, W.-P., Schneider, L. A. & Smith, A. E. A Life-Long Approach to Physical Activity for Brain Health. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 147 (2017).
76. Raichlen, D. A. & Alexander, G. E. Adaptive Capacity: An Evolutionary Neuroscience Model Linking Exercise, Cognition, and Brain Health. *Trends Neurosci.* **40**, 408–421 (2017).
77. Abbott, R. D. *et al.* Walking and dementia in physically capable elderly men. *J. Am. Med. Assoc.* **292**, 1447–53 (2004).

78. Erickson, K. I. *et al.* Physical activity predicts gray matter volume in late adulthood: The Cardiovascular Health Study. *Neurology* **i**, WNL.0b013e3181f88359 (2010).
79. Erickson, K. I. *et al.* Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3017–22 (2011).
80. Morris, M. C. *et al.* Association of Seafood Consumption, Brain Mercury Level, and. *Jama* **60612**, 489–497 (2016).
81. Perim Baldo, M. *et al.* Adherence to a Mediterranean-Style Diet and effects on Cognition in Adults: A Qualitative evaluation and Systematic Review of Longitudinal and Prospective Trials. *Front. Nutr.* **3**, 1–13 (2016).
82. Stern, Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **11**, 1006–1012 (2012).
83. Jonsson, T. *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96–9 (2012).
84. Yuede, C. M. *et al.* Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **35**, 426–32 (2009).
85. Rovio, S. *et al.* Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **4**, 705–711 (2005).
86. Verghese, J. *et al.* Leisure activities and the risk of amnesic mild cognitive impairment in the elderly. *Neurology* **66**, 821–827 (2006).
87. Wilkins, H. M. & Swerdlow, R. H. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res. Bull.* (2016). doi:10.1016/j.brainresbull.2016.08.009
88. Matsui, T. *et al.* Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1161**, 116–123 (2007).
89. Sandbrink, R., Masters, C. & Beyreuther, K. APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **777**, 281–287 (1996).
90. Esch, F. S. *et al.* Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **248**, 1122–1124 (1990).
91. Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S. & Glynn, P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem. J.* **317** (Pt 1, 45–50 (1996).
92. Edwards, D. R., Handsley, M. M. & Pennington, C. J. The ADAM

- metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* **29**, 258–89 (2008).
93. Lichtenthaler, S. F. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: Molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J. Neurochem.* **116**, 10–21 (2011).
 94. Allinson, T. M. J., Parkin, E. T., Turner, A. J. & Hooper, N. M. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res.* **74**, 342–352 (2003).
 95. Hussain, I. *et al.* Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 419–27 (1999).
 96. Sinha, S. *et al.* Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537–40 (1999).
 97. Vassar, R. *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735–41 (1999).
 98. Yan, R. *et al.* Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533–7 (1999).
 99. Lin, X. *et al.* Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1456–60 (2000).
 100. Haass, C. *et al.* Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322–5 (1992).
 101. Seubert, P. *et al.* Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* **361**, 260–3 (1993).
 102. Citron, M., Teplow, D. B. & Selkoe, D. J. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* **14**, 661–70 (1995).
 103. Yu, G. *et al.* Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* **407**, 48–54 (2000).
 104. Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B. & Selkoe, D. J. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* **268**, 3021–4 (1993).
 105. Haass, C., Capell, A., Citron, M., Teplow, D. B. & Selkoe, D. J. The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 6186–92 (1995).
 106. Knops, J. *et al.* Cell-type and amyloid precursor protein-type specific inhibition

- of A beta release by bafilomycin A1, a selective inhibitor of vacuolar ATPases. *J. Biol. Chem.* **270**, 2419–22 (1995).
107. Koo, E. H. & Squazzo, S. L. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 17386–9 (1994).
 108. Haass, C. *et al.* The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* **1**, 1291–6 (1995).
 109. Roher, A. E. *et al.* Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **268**, 3072–83 (1993).
 110. Citron, M. *et al.* Inhibition of amyloid beta-protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron* **17**, 171–9 (1996).
 111. Cole, S. L. & Vassar, R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol. Neurodegener.* **2**, 22 (2007).
 112. Sisodia, S. S. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6075–9 (1992).
 113. Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W. & Lee, V. M. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* **275**, 2568–75 (2000).
 114. De Strooper, B., Iwatsubo, T. & Wolfe, M. S. Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006304 (2012).
 115. Dries, D. R. & Yu, G. Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 132–46 (2008).
 116. Laudon, H. *et al.* A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J. Biol. Chem.* **280**, 35352–60 (2005).
 117. Spasic, D. *et al.* Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 26569–77 (2006).
 118. Thinakaran, G. *et al.* Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* **17**, 181–90 (1996).
 119. Francis, R. *et al.* aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling,

- gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell* **3**, 85–97 (2002).
120. LaVoie, M. J. *et al.* Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J. Biol. Chem.* **278**, 37213–22 (2003).
 121. Fraering, P. C. *et al.* Detergent-dependent dissociation of active gamma-secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex. *Biochemistry* **43**, 323–33 (2004).
 122. Steiner, H., Winkler, E. & Haass, C. Chemical cross-linking provides a model of the gamma-secretase complex subunit architecture and evidence for close proximity of the C-terminal fragment of presenilin with APH-1. *J. Biol. Chem.* **283**, 34677–86 (2008).
 123. Takami, M. *et al.* gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J. Neurosci.* **29**, 13042–52 (2009).
 124. Chen, G. *et al.* Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.* 1–31 (2017). doi:10.1038/aps.2017.28
 125. von Rotz, R. C. *et al.* The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J. Cell Sci.* **117**, 4435–48 (2004).
 126. Pardossi-Piquard, R. *et al.* Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* **46**, 541–54 (2005).
 127. Miller, B. C. *et al.* Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6221–6 (2003).
 128. Van Nostrand, W. E. & Porter, M. Plasmin cleavage of the amyloid beta-protein: alteration of secondary structure and stimulation of tissue plasminogen activator activity. *Biochemistry* **38**, 11570–6 (1999).
 129. Tucker, H. M. *et al.* The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J. Neurosci.* **20**, 3937–46 (2000).
 130. Bertram, L. *et al.* Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* **290**, 2302–3 (2000).

131. Ertekin-Taner, N. *et al.* Linkage of plasma Abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science* **290**, 2303–4 (2000).
132. Glenner, G. G. & Wong, C. W. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 885–890 (1984).
133. Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487–498 (1991).
134. Saitoh, T. *et al.* Secreted form of amyloid β protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* **58**, 615–622 (1989).
135. Mattson, M. P. *et al.* Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron* **10**, 243–254 (1993).
136. Hesse, L., Beher, D., Masters, C. L. & Multhaup, G. The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.* **349**, 109–116 (1994).
137. Barrett, P. J. *et al.* The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science* **336**, 1168–71 (2012).
138. Cirrito, J. R. *et al.* In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J. Neurosci.* **23**, 8844–8853 (2003).
139. Selkoe, D. J. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **924**, 17–25 (2000).
140. Serpell, L. C. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1502**, 16–30 (2000).
141. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 384–96 (2014).
142. Lu, J.-X. *et al.* Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell* **154**, 1257–68 (2013).
143. Kaye, R. *et al.* Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486–9 (2003).
144. Ono, K., Condon, M. M. & Teplow, D. B. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14745–

- 50 (2009).
145. Sandberg, A. *et al.* Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15595–15600 (2010).
146. Saito, T. *et al.* Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat. Neurosci.* **14**, 1023–1032 (2011).
147. Hane, F. T., Lee, B. Y. & Leonenko, Z. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. *J. Alzheimer's Dis.* **57**, 1–28 (2017).
148. Verdier, Y. & Penke, B. Binding Sites of Amyloid β -Peptide in Cell Plasma Membrane and Implications for Alzheimer ' s Disease. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 19–31 (2004).
149. Mutisya, E. M., Bowling, A. C. & Beal, M. F. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **63**, 2179–84 (1994).
150. Eskici, G. & Axelsen, P. H. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **51**, 6289–311 (2012).
151. Sarell, C. J., Wilkinson, S. R. & Viles, J. H. Substoichiometric levels of Cu²⁺ ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid- β from Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **285**, 41533–40 (2010).
152. Greenough, M. A., Camakaris, J. & Bush, A. I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **62**, 540–55 (2013).
153. Bush, A. I. *et al.* Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* **265**, 1464–7 (1994).
154. Frederickson, C. J., Koh, J.-Y. & Bush, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 449–62 (2005).
155. Wang, Q., Walsh, D. M., Rowan, M. J., Selkoe, D. J. & Anwyl, R. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well a. *J. Neurosci.* **24**, 3370–8 (2004).
156. Lin, H., Bhatia, R. & Lal, R. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* **15**, 2433–44 (2001).
157. Sokolov, Y. *et al.* Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure. *J. Gen. Physiol.* **128**, 637–47 (2006).

158. Hane, F., Drolle, E., Gaikwad, R., Faught, E. & Leonenko, Z. Amyloid- β aggregation on model lipid membranes: an atomic force microscopy study. *J. Alzheimers. Dis.* **26**, 485–94 (2011).
159. Roberson, E. D. *et al.* Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **316**, 750–4 (2007).
160. Geng, J., Zhao, C., Ren, J. & Qu, X. Alzheimer's disease amyloid beta converting left-handed Z-DNA back to right-handed B-form. *Chem. Commun. (Camb)*. **46**, 7187–9 (2010).
161. Roberson, E. D. *et al.* Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **31**, 700–11 (2011).
162. Soscia, S. J. *et al.* The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* **5**, e9505 (2010).
163. Jaunmuktane, Z. *et al.* Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* **525**, 247–50 (2015).
164. Ridley, R. M., Baker, H. F., Windle, C. P. & Cummings, R. M. Very long term studies of the seeding of beta-amyloidosis in primates. *J. Neural Transm.* **113**, 1243–51 (2006).
165. Murphy, D. B. & Borisy, G. G. Association of high-molecular-weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 2696–700 (1975).
166. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. & Kirschner, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1858–62 (1975).
167. Wang, Y. & Mandelkow, E. Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 5–21 (2016).
168. Kanaan, N. M. *et al.* Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J. Neurosci.* **31**, 9858–68 (2011).
169. Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1887–902 (1995).
170. Mandell, J. W. & Banker, G. a. A spatial gradient of tau protein phosphorylation

- in nascent axons. *J. Neurosci.* **16**, 5727–40 (1996).
171. Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y. & Iwatsubo, T. Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* **8**, 2797–801 (1997).
 172. Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M. & Hernandez, F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* **84**, 361–84 (2004).
 173. Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R. & Anderton, B. H. Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J. Neurochem.* **74**, 1587–95 (2000).
 174. Wang, J.-Z., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 59–68 (2007).
 175. Yu, Y. *et al.* Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J. Neurochem.* **108**, 1480–94 (2009).
 176. Billingsley, M. L. & Kincaid, R. L. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem. J.* **323** (Pt 3, 577–91 (1997).
 177. Goedert, M. & Spillantini, M. G. A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**, 777–81 (2006).
 178. Goedert, M. NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science* **349**, 1255555 (2015).
 179. Crary, J. F. *et al.* Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol.* **128**, 755–66 (2014).
 180. KIDD, M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**, 192–3 (1963).
 181. Khlistunova, I. *et al.* Inducible expression of tau repeat domain in cell models of tauopathy: Aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J. Biol. Chem.* **281**, 1205–1214 (2006).
 182. Santacruz, K. *et al.* Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309**, 476–81 (2005).

183. Oddo, S. *et al.* Reduction of soluble A β and tau, but not soluble A β alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J. Biol. Chem.* **281**, 39413–39423 (2006).
184. Smith, M. A. Alzheimer disease. *Int. Rev. Neurobiol.* **42**, 1–54 (1998).
185. Cras, P. *et al.* Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* **89**, 291–5 (1995).
186. Jack, C. R. *et al.* Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet. Neurol.* **12**, 207–16 (2013).
187. Clavaguera, F. *et al.* Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* **11**, 909–13 (2009).
188. Liu, L. *et al.* Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One* **7**, e31302 (2012).
189. Irwin, D. J. *et al.* Acetylated tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Brain* **135**, 807–18 (2012).
190. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4913–7 (1986).
191. Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. & Ferreira, A. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6364–9 (2002).
192. Lasagna-Reeves, C. a. *et al.* Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **26**, 1946–59 (2012).
193. Maeda, S. *et al.* Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* **46**, 3856–61 (2007).
194. Walsh, D. M. & Selkoe, D. J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* **101**, 1172–84 (2007).
195. Ittner, L. M. & Götz, J. Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 65–72 (2011).
196. Sydow, A. *et al.* Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J. Neurosci.* **31**, 2511–25 (2011).
197. Lewis, J. *et al.* Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice

- expressing mutant tau and APP. *Science* **293**, 1487–91 (2001).
198. Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J. & Nitsch, R. M. Formation of neurofibrillary tangles in P301 τ transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* **293**, 1491–5 (2001).
 199. Bertram, L. & Tanzi, R. E. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1449–57 (2005).
 200. Do, T. D. *et al.* Interactions between amyloid- β and Tau fragments promote aberrant aggregates: implications for amyloid toxicity. *J. Phys. Chem. B* **118**, 11220–30 (2014).
 201. Braak, H. & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**, 239–59 (1991).
 202. Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P. & Kivipelto, M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet. Neurol.* **9**, 702–16 (2010).
 203. Kosasa, T., Kuriya, Y., Matsui, K. & Yamanishi, Y. Inhibitory effect of orally administered donepezil hydrochloride (E2020), a novel treatment for Alzheimer's disease, on cholinesterase activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **389**, 173–9 (2000).
 204. Seltzer, B. Donepezil: an update. *Expert Opin. Pharmacother.* **8**, 1011–23 (2007).
 205. Witt, A., Macdonald, N. & Kirkpatrick, P. Memantine hydrochloride. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 109–10 (2004).
 206. Wenk, G. L., Parsons, C. G. & Danysz, W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behav. Pharmacol.* **17**, 411–24 (2006).
 207. Danysz, W. & Parsons, C. G. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 324–52 (2012).
 208. Mitani, Y. *et al.* Differential effects between γ -secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *J. Neurosci.* **32**, 2037–50 (2012).
 209. May, P. C. *et al.* Robust central reduction of amyloid- β in humans with an orally available, non-peptidic β -secretase inhibitor. *J. Neurosci.* **31**, 16507–16 (2011).
 210. Atwal, J. K. *et al.* A therapeutic antibody targeting BACE1 inhibits amyloid- β

- production in vivo. *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011).
211. Chai, X. *et al.* Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression. *J. Biol. Chem.* **286**, 34457–67 (2011).
 212. Hatami, A., Albay, R., Monjazebe, S., Milton, S. & Glabe, C. Monoclonal antibodies against A β 42 fibrils distinguish multiple aggregation state polymorphisms in vitro and in Alzheimer disease brain. *J. Biol. Chem.* **289**, 32131–43 (2014).
 213. Orgogozo, J.-M. *et al.* Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* **61**, 46–54 (2003).
 214. Garber, K. Genentech's Alzheimer's antibody trial to study disease prevention. *Nat. Biotechnol.* **30**, 731–2 (2012).
 215. Adolfsson, O. *et al.* An effector-reduced anti- β -amyloid (A β) antibody with unique a β binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A β . *J. Neurosci.* **32**, 9677–89 (2012).
 216. Winblad, B. *et al.* Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet. Neurol.* **11**, 597–604 (2012).
 217. Sevigny, J. *et al.* The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **537**, 50–6 (2016).
 218. Alavez, S., Vantipalli, M. C., Zucker, D. J. S., Klang, I. M. & Lithgow, G. J. Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. *Nature* **472**, 226–9 (2011).
 219. Yao, J. *et al.* Inhibition of amyloid-beta (Abeta) peptide-binding alcohol dehydrogenase-Abeta interaction reduces Abeta accumulation and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **31**, 2313–20 (2011).
 220. Manczak, M. *et al.* Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons. *J. Alzheimers. Dis.* **20 Suppl 2**, S609-31 (2010).
 221. Galasko, D. R. *et al.* Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Arch. Neurol.* **69**, 836–41 (2012).

222. McClean, P. L., Parthasarathy, V., Faivre, E. & Hölscher, C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **31**, 6587–94 (2011).
223. Craft, S. *et al.* Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnestic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch. Neurol.* **69**, 29–38 (2012).
224. Zwillig, D. *et al.* Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell* **145**, 863–74 (2011).
225. Spilman, P. *et al.* Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **5**, e9979 (2010).
226. Currais, A. *et al.* Amyloid proteotoxicity initiates an inflammatory response blocked by cannabinoids. *NPJ aging Mech. Dis.* **2**, 16012 (2016).
227. Bakker, A. *et al.* Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnestic mild cognitive impairment. *Neuron* **74**, 467–74 (2012).
228. Laxton, A. W. *et al.* A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **68**, 521–34 (2010).
229. Leinenga, G. & Götz, J. Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci. Transl. Med.* **7**, 278ra33 (2015).
230. Salloway, S. *et al.* Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **370**, 322–33 (2014).
231. Doody, R. S. *et al.* Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **370**, 311–21 (2014).
232. Hane, F. T. *et al.* Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *J. Alzheimer's Dis.* **Preprint**, 1–21 (2017).
233. Cheek, S., Ginalski, K., Zhang, H. & Grishin, N. V. A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct. Biol.* **5**, 6 (2005).
234. Ubersax, J. a & Ferrell, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 530–41 (2007).
235. Krebs, E. G. An accidental biochemist. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, xii–xxxii (1998).
236. Hanks, S. K. & Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**,

- 576–96 (1995).
237. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–34 (2002).
 238. Lindberg, R. A., Quinn, A. M. & Hunter, T. Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem. Sci.* **17**, 114–9 (1992).
 239. Dhanasekaran, N. & Premkumar Reddy, E. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **17**, 1447–55 (1998).
 240. Guimerá, J. *et al.* A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1305–10 (1996).
 241. Kentrup, H. *et al.* Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J. Biol. Chem.* **271**, 3488–95 (1996).
 242. Stotani, S., Giordanetto, F. & Medda, F. DYRK1A inhibition as potential treatment for Alzheimer's disease. *Future Med. Chem.* **8**, 681–96 (2016).
 243. Becker, W. *et al.* Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J. Biol. Chem.* **273**, 25893–25902 (1998).
 244. Aranda, S., Laguna, A. & de la Luna, S. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* **25**, 449–62 (2011).
 245. Park, J. & Chung, K. C. New Perspectives of Dyrk1A Role in Neurogenesis and Neuropathologic Features of Down Syndrome. *Exp. Neurobiol.* **22**, 244–8 (2013).
 246. Guimera, J., Casas, C., Estivill, X. & Pritchard, M. Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* **57**, 407–18 (1999).
 247. Park, J., Oh, Y. & Chung, K. C. Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1. *BMB Rep.* **42**, 6–15 (2009).
 248. Martí, E. *et al.* Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res.* **964**, 250–263 (2003).

249. Duchon, A. & Herault, Y. DYRK1A, a Dosage-Sensitive Gene Involved in Neurodevelopmental Disorders, Is a Target for Drug Development in Down Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* **10**, 104 (2016).
250. Tejedor, F. J. & Hämmerle, B. MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. *FEBS J.* **278**, 223–35 (2011).
251. Fotaki, V. *et al.* Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6636–47 (2002).
252. Fotaki, V., Martínez De Lagrán, M., Estivill, X., Arbonés, M. & Dierssen, M. Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behav. Neurosci.* **118**, 815–21 (2004).
253. Martinez de Lagran, M. *et al.* Dopaminergic deficiency in mice with reduced levels of the dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A, Dyrk1A(+/-). *Genes. Brain. Behav.* **6**, 569–78 (2007).
254. Benavides-Piccione, R. *et al.* Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A+/- mouse. *Neurobiol. Dis.* **20**, 115–22 (2005).
255. Arqué, G. *et al.* Impaired spatial learning strategies and novel object recognition in mice haploinsufficient for the dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A (Dyrk1A). *PLoS One* **3**, e2575 (2008).
256. Down, J. L. H. Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hosp. Reports* 259–262 (1866).
257. Haydar, T. F. & Reeves, R. H. Trisomy 21 and early brain development. *Trends Neurosci.* **35**, 81–91 (2012).
258. Smith, I. & Calegari, F. Cyclin D1 Again Caught in the Act: Dyrk1a Links G1 and Neurogenesis in Down Syndrome. *EBioMedicine* **2**, 96–7 (2015).
259. Shi, J. *et al.* Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome. *J. Biol. Chem.* **283**, 28660–9 (2008).
260. Yin, X. *et al.* Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A) modulates serine/arginine-rich protein 55 (SRp55)-promoted Tau exon 10 inclusion. *J. Biol. Chem.* **287**, 30497–506 (2012).
261. Wegiel, J., Gong, C.-X. & Hwang, Y.-W. The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J.* **278**, 236–45 (2011).

262. Wegiel, J. *et al.* The role of overexpressed DYRK1A protein in the early onset of neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *Acta Neuropathol.* **116**, 391–407 (2008).
263. Liu, F. *et al.* Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J.* **22**, 3224–33 (2008).
264. Azorsa, D. O. *et al.* High-content siRNA screening of the kinome identifies kinases involved in Alzheimer's disease-related tau hyperphosphorylation. *BMC Genomics* **11**, 25 (2010).
265. Woods, Y. L. *et al.* The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* **355**, 609–15 (2001).
266. Jung, M.-S. *et al.* Regulation of RCAN1 protein activity by Dyrk1A protein-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **286**, 40401–12 (2011).
267. Ryoo, S.-R. *et al.* Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **104**, 1333–44 (2008).
268. Ryu, Y. S. *et al.* Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **115**, 574–84 (2010).
269. Kawakubo, T., Mori, R., Shirotani, K., Iwata, N. & Asai, M. Neprilysin Is Suppressed by Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylation Regulated Kinase 1A (DYRK1A) in Down-Syndrome-Derived Fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 327–333 (2017).
270. Najas, S. *et al.* DYRK1A-mediated Cyclin D1 Degradation in Neural Stem Cells Contributes to the Neurogenic Cortical Defects in Down Syndrome. *EBioMedicine* **2**, 120–34 (2015).
271. Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. & Cohen, P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **371**, 199–204 (2003).
272. De la Torre, R. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**, 278–88 (2014).
273. Guedj, F. *et al.* Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by

- overexpression of DYRK1A. *PLoS One* **4**, e4606 (2009).
274. Mähler, A. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate: a useful, effective and safe clinical approach for targeted prevention and individualised treatment of neurological diseases? *EPMA J.* **4**, 5 (2013).
 275. Mecocci, P. & Polidori, M. C. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 631–8 (2012).
 276. Chan, G. W. *et al.* New leukotriene B4 receptor antagonist: leucettamine A and related imidazole alkaloids from the marine sponge *Leucetta microraphis*. *J. Nat. Prod.* **56**, 116–21 (1993).
 277. Debdab, M. *et al.* Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: Modulation of alternative pre-RNA splicing. *J. Med. Chem.* **54**, 4172–4186 (2011).
 278. Tahtouh, T. *et al.* Selectivity, cocrystal structures, and neuroprotective properties of leucettines, a family of protein kinase inhibitors derived from the marine sponge alkaloid leucettamine B. *J. Med. Chem.* **55**, 9312–9330 (2012).
 279. Fant, X. *et al.* cdc-like/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases inhibitor leucettine L41 induces mTOR-dependent autophagy: implication for Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* **85**, 441–50 (2014).
 280. Naert, G. *et al.* Leucettine L41, a DYRK1A-preferential DYRKs/CLKs inhibitor, prevents memory impairments and neurotoxicity induced by oligomeric A β 25-35 peptide administration in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **25**, 2170–82 (2015).
 281. Göckler, N. *et al.* Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* **276**, 6324–37 (2009).
 282. Ishida, J., Wang, H. K., Bastow, K. F., Hu, C. Q. & Lee, K. H. Antitumor agents 201. Cytotoxicity of harmine and beta-carboline analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 3319–24 (1999).
 283. Jiménez, J., Riverón-Negrete, L., Abdullaev, F., Espinosa-Aguirre, J. & Rodríguez-Arnaiz, R. Cytotoxicity of the beta-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. *Exp. Toxicol. Pathol.* **60**, 381–9 (2008).
 284. Fuentes, J. A. & Longo, V. G. An investigation on the central effects of harmine, harmaline and related beta-carbolines. *Neuropharmacology* **10**, 15–

- 23 (1971).
285. Airaksinen, M. M., Lecklin, A., Saano, V., Tuomisto, L. & Gynther, J. Tremorigenic effect and inhibition of tryptamine and serotonin receptor binding by beta-carbolines. *Pharmacol. Toxicol.* **60**, 5–8 (1987).
 286. Kawanishi, K., Eguchi, N., Hayashi, T. & Hashimoto, Y. Relationship between occurrence of tremor/convulsion and level of beta-carbolines in the brain after administration of beta-carbolines into mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **47**, 689–99 (1994).
 287. Beniddir, M. A. *et al.* Acridone alkaloids from *Glycosmis chlorosperma* as DYRK1A inhibitors. *J. Nat. Prod.* **77**, 1117–22 (2014).
 288. Malumbres, M. *et al.* Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1275–1276 (2009).
 289. Castro-Alvarez, J. F., Uribe-Arias, A., Raigoza, D. M. & Cardona-Gómez, G. P. Cyclin-dependent kinase 5, a node protein in diminished tauopathy: A systems biology approach. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 1–13 (2014).
 290. Dhavan, R. & Tsai, L.-H. A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 749–759 (2001).
 291. Amin, N. D., Albers, W. & Pant, H. C. Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activation requires interaction with three domains of p35. *J. Neurosci. Res.* **67**, 354–362 (2002).
 292. Tsai, L.-H., Delalle, I., Caviness, V. S., Chae, T. & Harlow, E. P35 Is a Neural-Specific Regulatory Subunit of Cyclin-Dependent Kinase 5. *Nature* **371**, 419–423 (1994).
 293. Patrick, G. N., Zhou, P., Kwon, Y. T., Howley, P. M. & Tsai, L. H. p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 24057–24064 (1998).
 294. Tang, D., Chun, A. C., Zhang, M. & Wang, J. H. Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activation domain of neuronal Cdk5 activator. Evidence of the existence of cyclin fold in neuronal Cdk5a activator. *J. Biol. Chem.* **272**, 12318–27 (1997).
 295. Patrick, G. N. *et al.* Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615–622 (1999).
 296. Cruz, J. C. & Tsai, L. H. Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* **10**, 452–458 (2004).

297. Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C. & Maccioni, R. B. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp. Cell Res.* **295**, 245–257 (2004).
298. Lee, M. S. *et al.* Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360–4 (2000).
299. Sun, K. H., De Pablo, Y., Vincent, F. & Shah, K. Deregulated Cdk5 promotes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Neurochem.* **107**, 265–278 (2008).
300. Shea, T. B., Zheng, Y. L., Ortiz, D. & Pant, H. C. Cyclin-dependent kinase 5 increases perikaryal neurofilament phosphorylation and inhibits neurofilament axonal transport in response to oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* **76**, 795–800 (2004).
301. Mushtaq, G. *et al.* Neuroprotective Mechanisms Mediated by CDK5 Inhibition. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 527–34 (2016).
302. Meijer, L. *et al.* Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **243**, 527–36 (1997).
303. De Azevedo, W. F. *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* **243**, 518–26 (1997).
304. Bettayeb, K. *et al.* CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **27**, 5797–807 (2008).
305. Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T. R., Green, K. N. & LaFerla, F. M. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **25**, 8843–53 (2005).
306. Menn, B. *et al.* Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models. *PLoS One* **5**, e12117 (2010).
307. Hilton, G. D., Stoica, B. A., Byrnes, K. R. & Faden, A. I. Roscovitine reduces neuronal loss, glial activation, and neurologic deficits after brain trauma. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 1845–59 (2008).
308. Cole, L. M., Roush, R. T. & Casida, J. E. Drosophila GABA-gated chloride channel: modified [3H]EBOB binding site associated with Ala-->Ser or Gly

- mutants of Rdl subunit. *Life Sci.* **56**, 757–65 (1995).
309. Tingle, C. C. D., Rother, J. A., Dewhurst, C. F., Lauer, S. & King, W. J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **176**, 1–66 (2003).
 310. Moffat, A. S. New chemicals seek to outwit insect pests. *Science* (80-.). **261**, 550–551 (1993).
 311. Simon-Delso, N. *et al.* Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 5–34 (2015).
 312. Mahler, B. J. *et al.* Fipronil and its degradates in indoor and outdoor dust. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 5665–70 (2009).
 313. Cochran, R. C., Yu, L., Krieger, R. I. & Ross, J. H. Postapplication Fipronil Exposure Following Use on Pets. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **78**, 1217–1226 (2015).
 314. Mohamed, F. *et al.* Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil--a GABAA-gated chloride channel blocker. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **42**, 955–63 (2004).
 315. Chodorowski, Z. & Anand, J. S. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil--a case report. *J Toxicol Clin Toxicol* **42**, 189–190 (2004).
 316. Fung, H. T., Chan, K. K., Ching, W. M. & Kam, C. W. A Case of Accidental Ingestion of Ant Bait Containing Fipronil. *Clin. Toxicol.* **41**, 245–248 (2003).
 317. Godinho, A. F. *et al.* Memory impairment due to fipronil pesticide exposure occurs at the GABAA receptor level, in rats. *Physiol. Behav.* **165**, 28–34 (2016).
 318. Herin, F. *et al.* Thyroid function tests in persons with occupational exposure to fipronil. *Thyroid* **21**, 701–6 (2011).
 319. Ratra, G. S. & Casida, J. E. GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicol. Lett.* **122**, 215–222 (2001).
 320. Ratra, G. S., Kamita, S. G. & Casida, J. E. Role of human GABA(A) receptor beta3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**, 233–40 (2001).
 321. Bonmatin, J. M. *et al.* Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 35–67 (2015).
 322. FAO/WHO. *Pesticide residues in food - 2016. FAO Plant, Production and*

Protection Paper (2016).

323. Arnich, N., Cervantés, P., Gallotti, S., Loulergue, M.-H. & Solal, C. Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil. *Afsset Afssa* 173 (2005).
324. Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E. & Rose, R. L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **164**, 200–14 (2006).
325. Leghait, J. *et al.* Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology* **255**, 38–44 (2009).
326. Appenzeller, B. M. R. *et al.* Hair analysis for the biomonitoring of pesticide exposure: comparison with blood and urine in a rat model. *Arch. Toxicol.* (2016). doi:10.1007/s00204-016-1910-9
327. Vasylieva, N. *et al.* Hydroxy-fipronil is a new urinary biomarker of exposure to fipronil. *Environ. Int.* **103**, 91–98 (2017).
328. FAO/WHO. *Pesticide residues in food*. (2000).
329. Romero, A. *et al.* Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. *Toxicol. Lett.* **252**, 42–49 (2016).
330. Lee, J. E. *et al.* Akt/GSK3 β signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol. Lett.* **202**, 133–41 (2011).
331. Leghait, J., Gayrard, V., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N. & Viguié, C. Is the mechanisms of fipronil-induced thyroid disruption specific of the rat: Re-evaluation of fipronil thyroid toxicity in sheep? *Toxicol. Lett.* **194**, 51–7 (2010).
332. Hurley, P. M., Hill, R. N. & Whiting, R. J. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ. Health Perspect.* **106**, 437–445 (1998).
333. Ruangjaroon, T., Chokchaichamnankit, D., Srisomsap, C., Svasti, J. & Paricharttanakul, N. M. Involvement of vimentin in neurite outgrowth damage induced by fipronil in SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **486**, 652–658 (2017).
334. Slotkin, T. A., Skavicus, S., Card, J., Levin, E. D. & Seidler, F. J. Diverse neurotoxicants target the differentiation of embryonic neural stem cells into neuronal and glial phenotypes. *Toxicology* **372**, 42–51 (2016).

335. Cravedi, J. P., Delous, G., Zalko, D., Viguié, C. & Debrauwer, L. Disposition of fipronil in rats. *Chemosphere* **93**, 2276–2283 (2013).
336. Szegedi, V. *et al.* Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology* **214**, 67–76 (2005).
337. Park, J. H., Park, Y. S. & Koh, H. C. Progressive loss of nigrostriatal dopaminergic neurons induced by inflammatory responses to fipronil. *Toxicol. Lett.* **258**, 36–45 (2016).
338. Badgujar, P. C., Pawar, N. N., Chandratre, G. A., Telang, A. G. & Sharma, A. K. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: Protective effect of vitamin E and vitamin C. *Pestic. Biochem. Physiol.* **118**, 10–18 (2015).
339. Chaguri, J. L. *et al.* Exposure to fipronil elevates systolic blood pressure and disturbs related biomarkers in plasma of rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **42**, 63–68 (2016).
340. Caballero, M. V. *et al.* Fipronil induces CYP isoforms in rats. *Food Chem. Toxicol.* **83**, 215–21 (2015).
341. Khan, S., Jan, M. H., Kumar, D. & Telang, A. G. Fipronil induced spermotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* **124**, 8–14 (2015).
342. Tavares, M. A. *et al.* Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **40**, 206–214 (2015).
343. Quancai Sun, Weipeng Qi, Jeremy J. Yang, Kyong Sup Yoon, J. M. C. & Park, Y. 2016-Sun_Fipronil promotes adipogenesis via AMPK α -mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes.pdf. *Food Chem. Toxicol.* **92**, 217–223 (2016).
344. Jiang, W. & Gan, J. Conversion of pesticides to biologically active products on urban hard surfaces. *Sci. Total Environ.* **556**, 63–69 (2016).
345. Richards, J., Reif, R., Luo, Y. & Gan, J. Distribution of pesticides in dust particles in urban environments. *Environ. Pollut.* **214**, 290–298 (2016).
346. Teerlink, J., Hernandez, J. & Budd, R. Fipronil washoff to municipal wastewater from dogs treated with spot-on products. *Sci. Total Environ.* **599–600**, 960–966 (2017).
347. Gibbons, D., Morrissey, C. & Mineau, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut.*

- Res. Int.* **22**, 103–118 (2015).
348. Pisa, L. W. *et al.* Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 68–102 (2015).
 349. Carpenter, K. D., Kuivila, K. M., Hladik, M. L., Haluska, T. & Cole, M. B. Storm-event-transport of urban-use pesticides to streams likely impairs invertebrate assemblages. *Environ. Monit. Assess.* **188**, 345 (2016).
 350. Wang, C. *et al.* A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in zebrafish larvae at environmentally relevant levels. *Environ. Pollut.* **211**, 252–8 (2016).
 351. Goff, A. D. *et al.* The effects of fipronil and the photodegradation product fipronil desulfinyl on growth and gene expression in juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*, at different salinities. *Aquat. Toxicol.* **186**, 96–104 (2017).
 352. van der Sluijs, J. P. *et al.* Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 148–154 (2015).
 353. Wei, Y. *et al.* Legacy and Current-Use Insecticides in Agricultural Sediments from South China: Impact of Application Pattern on Occurrence and Risk. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 4247–4254 (2017).
 354. Oumata, N. *et al.* Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *J. Med. Chem.* **51**, 5229–5242 (2008).
 355. Flajolet, M. *et al.* Regulation of Alzheimer's disease amyloid-beta formation by casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4159–64 (2007).
 356. Hochard, A. *et al.* Aftins increase amyloid- β 42, lower amyloid- β 38, and do not alter Amyloid- β 40 extracellular production in vitro: Toward a chemical model of alzheimer's disease? *J. Alzheimer's Dis.* **35**, 107–120 (2013).
 357. Kukar, T. *et al.* Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting A β 42 production. *Nat. Med.* **11**, 545–550 (2005).
 358. Soppa, U. *et al.* The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* **13**, 2084–100 (2014).
 359. Nikolic, M., Chou, M. M., Lu, W., Mayer, B. J. & Tsai, L. H. The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* **395**, 194–8 (1998).

360. Cheung, Z. H., Chin, W. H., Chen, Y., Ng, Y. P. & Ip, N. Y. Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons. *PLoS Biol.* **5**, e63 (2007).
361. Angelo, M., Plattner, F. & Giese, K. P. Cyclin-dependent kinase 5 in synaptic plasticity, learning and memory. *J. Neurochem.* **99**, 353–70 (2006).
362. Hawasli, A. H. *et al.* Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation. *Nat. Neurosci.* **10**, 880–886 (2007).
363. Plattner, F. *et al.* Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B. *Neuron* **81**, 1070–83 (2014).
364. Lew, J. *et al.* A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**, 423–6 (1994).
365. Tsai, L. H., Delalle, I., Caviness, V. S., Chae, T. & Harlow, E. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**, 419–23 (1994).
366. Tang, D. *et al.* An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J. Biol. Chem.* **270**, 26897–903 (1995).
367. Mattson, M. P. *et al.* beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* **12**, 376–89 (1992).
368. Patrick, G. N. *et al.* Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615–22 (1999).
369. Kusakawa, G. *et al.* Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* **275**, 17166–72 (2000).
370. Lee, M. S. *et al.* Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360–4 (2000).
371. Nath, R. *et al.* Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 16–21 (2000).
372. Meyer, D. A. *et al.* Striatal dysregulation of Cdk5 alters locomotor responses to cocaine, motor learning, and dendritic morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18561–6 (2008).
373. Meyer, D. A. *et al.* Ischemic stroke injury is mediated by aberrant Cdk5. *J. Neurosci.* **34**, 8259–67 (2014).

- 374. Chen, X.-H. *et al.* Long-term accumulation of amyloid-beta, beta-secretase, presenilin-1, and caspase-3 in damaged axons following brain trauma. *Am. J. Pathol.* **165**, 357–71 (2004).
- 375. Uryu, K. *et al.* Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. *Exp. Neurol.* **208**, 185–92 (2007).
- 376. Yousuf, M. A. *et al.* Involvement of aberrant cyclin-dependent kinase 5/p25 activity in experimental traumatic brain injury. *J. Neurochem.* **138**, 317–327 (2016).

Sites internet

§1. Nom du site : « Find A Grave »

Consulté le 22 Mars 2017

<https://www.findagrave.com/cgi-bin/fg.cgi?page=pv&GRid=10688>

§2. Nom du site : « World Alzheimer Report 2015 »

Consulté le 14 Juillet 2017

<http://www.worldalzreport2015.org/>

§3. Nom du site : « Cell Signaling Technology »

Consulté le 17 Juillet 2017

<https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=kinases-human-protein>

§4. Nom du site : « Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology »

Consulté le 17 Juillet 2017

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/DYRK1AID43234ch21q22.html>

§5. Nom du site : « Muséum national d'Histoire naturelle [Ed]. 2003-2017.

Inventaire National du Patrimoine Naturel »

Consulté le 18 Juillet 2017

https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/28412

§6. Nom du site : Le Monde

Consulté le 29 Juin 2017

http://www.lemonde.fr/planete/article/2017/01/12/2017-annee-decisive-pour-les-insecticides-tueurs-d-abeilles_5061281_3244.html

Annexes

Annexe 1 : Analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées dans les N2aAPP₆₉₅ traitées à l'aftin-5 par rapport au DMSO.

Category	Term	Count	%	P-Value	Fold Enrichment	FDR
Pathway	Neurotrophin signaling pathway	25	1.7	3.40E-05	2.5	4.20E-02
Biological process	cytoskeleton organization	52	3.6	1.30E-07	2.2	2.40E-04
	DNA replication	28	1.9	1.20E-05	2.5	2.10E-02
	DNA metabolic process	56	3.9	1.40E-05	1.8	2.50E-02
	spindle organization	11	0.8	1.50E-05	5.4	2.70E-02
Cellular compartment	cytoskeleton	125	8.7	1.30E-08	1.7	1.90E-05
	intracellular non-membrane-bounded organelle	188	13.1	3.40E-08	1.5	4.80E-05
	non-membrane-bounded organelle	188	13.1	3.40E-08	1.5	4.80E-05
	cytoskeletal part	90	6.2	3.30E-07	1.7	4.70E-04
	actin cytoskeleton	34	2.4	2.50E-06	2.5	3.50E-03
	microtubule cytoskeleton	56	3.9	1.20E-05	1.8	1.70E-02
	spindle	21	1.5	3.50E-05	2.9	5.00E-02
Molecular function	adenyl ribonucleotide binding	169	11.7	2.30E-11	1.6	3.50E-08
	nucleoside binding	176	12.2	5.70E-11	1.6	8.80E-08
	adenyl nucleotide binding	174	12.1	5.80E-11	1.6	9.00E-08
	ATP binding	166	11.5	5.80E-11	1.6	9.10E-08
	purine nucleoside binding	175	12.2	6.30E-11	1.6	9.80E-08
	purine ribonucleotide binding	195	13.5	1.30E-10	1.5	2.00E-07
	ribonucleotide binding	195	13.5	1.30E-10	1.5	2.00E-07
	purine nucleotide binding	200	13.9	2.60E-10	1.5	4.10E-07
	protein kinase activity	78	5.4	4.30E-08	1.9	6.70E-05
	protein serine/threonine kinase activity	56	3.9	5.40E-06	1.9	8.40E-03
	actin binding	42	2.9	1.10E-05	2.1	1.70E-02
	cytoskeletal protein binding	54	3.8	1.40E-05	1.9	2.20E-02

Annexe 2 : Analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées dans les N2aAPP₆₉₅ traitées au dipropetryn par rapport au DMSO.

Category	Term	Count	%	P-Value	Fold Enrichment	FDR
Pathway	Oxidative phosphorylation	27	2	1.80E-07	3.2	2.20E-04
	Parkinson's disease	27	2	2.90E-07	3.1	3.60E-04
	Alzheimer's disease	31	2.3	1.70E-06	2.6	2.00E-03
	Pyrimidine metabolism	19	1.4	3.70E-05	3	4.50E-02
Biological process	microtubule-based process	34	2.5	3.20E-06	2.4	5.70E-03
	modification-dependent macromolecule catabolic process	62	4.6	3.90E-06	1.8	6.90E-03
	modification-dependent protein catabolic process	62	4.6	3.90E-06	1.8	6.90E-03
	cellular protein catabolic process	64	4.7	5.80E-06	1.8	1.00E-02
	protein catabolic process	65	4.8	9.00E-06	1.8	1.60E-02
	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	63	4.6	9.50E-06	1.8	1.70E-02
	DNA metabolic process	52	3.8	1.90E-05	1.9	3.40E-02
Cellular compartment	mitochondrion	141	10.4	2.80E-09	1.6	3.90E-06
	respiratory chain	20	1.5	1.80E-08	4.7	2.50E-05
	organelle membrane	90	6.6	6.30E-07	1.7	8.90E-04
	mitochondrial envelope	53	3.9	7.00E-07	2.1	9.90E-04
	organelle envelope	66	4.9	1.10E-06	1.9	1.60E-03
	envelope	66	4.9	1.30E-06	1.9	1.80E-03
	mitochondrial membrane	50	3.7	1.40E-06	2.1	2.00E-03
	organelle inner membrane	43	3.2	6.10E-06	2.1	8.70E-03
	mitochondrial part	61	4.5	1.40E-05	1.8	2.00E-02
	mitochondrial inner membrane	40	2.9	2.20E-05	2.1	3.10E-02
	cytoskeleton	108	8	3.60E-05	1.5	5.00E-02

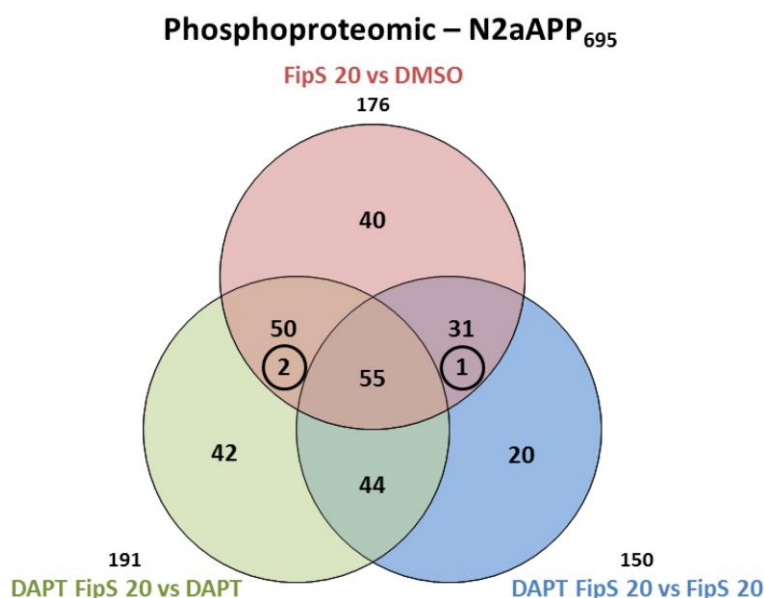
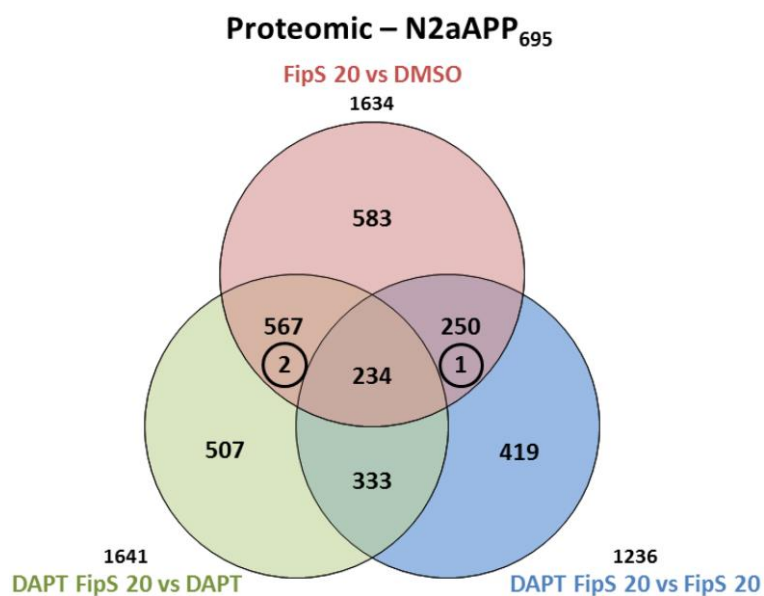
Annexe 3 : Analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées dans les N2aAPP₆₉₅ traitées au terbutryn par rapport au DMSO.

Category	Term	Count	%	P-Value	Fold Enrichment	FDR
Pathway	Pyrimidine metabolism	29	1.8	1.30E-09	3.7	1.60E-06
	Purine metabolism	30	1.9	2.40E-05	2.3	2.90E-02
Biological process	cell cycle	84	5.2	9.30E-07	1.7	1.70E-03
	DNA replication	32	2	9.50E-07	2.6	1.70E-03
	DNA metabolic process	63	3.9	1.70E-06	1.9	3.00E-03
	microtubule-based process	38	2.4	4.10E-06	2.3	7.40E-03
	protein localization	94	5.8	1.20E-05	1.6	2.20E-02
	cell cycle process	57	3.5	1.40E-05	1.8	2.60E-02
	cell division	44	2.7	2.50E-05	2	4.60E-02
Cellular compartment	mitochondrion	206	12.7	4.80E-22	1.9	6.90E-19
	mitochondrial envelope	73	4.5	1.80E-11	2.3	2.60E-08
	mitochondrial membrane	70	4.3	2.10E-11	2.4	3.00E-08
	organelle membrane	119	7.4	8.30E-11	1.8	1.20E-07
	organelle envelope	89	5.5	9.30E-11	2	1.30E-07
	mitochondrial part	87	5.4	1.10E-10	2.1	1.50E-07
	envelope	89	5.5	1.10E-10	2	1.60E-07
	organelle inner membrane	57	3.5	8.80E-09	2.3	1.30E-05
	mitochondrial inner membrane	53	3.3	6.30E-08	2.2	9.00E-05
	endoplasmic reticulum	104	6.4	7.50E-06	1.5	1.10E-02
	mitochondrial outer membrane	20	1.2	1.50E-05	3.1	2.10E-02
	organelle outer membrane	21	1.3	1.50E-05	3	2.10E-02
	outer membrane	21	1.3	2.50E-05	2.9	3.60E-02
Molecular function	ribonucleotide binding	210	13	5.50E-10	1.5	8.60E-07
	purine ribonucleotide binding	210	13	5.50E-10	1.5	8.60E-07
	purine nucleotide binding	216	13.4	8.70E-10	1.5	1.40E-06
	adenyl ribonucleotide binding	173	10.7	1.10E-08	1.5	1.80E-05
	adenyl nucleotide binding	179	11.1	1.90E-08	1.5	3.00E-05
	nucleoside binding	181	11.2	2.00E-08	1.5	3.10E-05
	purine nucleoside binding	180	11.1	2.10E-08	1.5	3.30E-05
	ATP binding	169	10.5	3.90E-08	1.5	6.20E-05
	DNA-directed DNA polymerase activity	12	0.7	8.70E-06	5.1	1.40E-02

Annexe 4 : Analyse fonctionnelle des protéines différentiellement exprimées dans les N2aAPP₆₉₅ traitées au fipronil sulfone par rapport au DMSO.

Category	Term	Count	%	P-Value	Fold Enrichment	FDR
Pathway	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	50	3.1	6.3E-18	4.0	8.3E-15
	Alzheimer's disease	50	3.1	1.7E-15	3.6	2.2E-12
	Parkinson's disease	43	2.7	9.9E-14	3.6	1.3E-10
	Oxidative phosphorylation	40	2.5	9.1E-13	3.6	1.2E-9
	Huntington's disease	47	2.9	1.3E-11	3.0	1.7E-8
	Ribosome	35	2.2	5.0E-9	3.0	6.6E-6
	Metabolic pathways	153	9.5	2.7E-8	1.5	3.5E-5
	Cell cycle	25	1.6	3.1E-5	2.5	4.1E-2
Biological process	mitochondrial translation	22	1.4	5.7E-15	8.0	1.1E-11
	translation	78	4.9	3.4E-14	2.5	6.4E-11
	oxidation-reduction process	93	5.8	3.7E-8	1.8	6.9E-5
	cell cycle	85	5.3	1.2E-7	1.8	2.2E-4
	regulation of cell cycle	24	1.5	1.1E-5	2.8	2.0E-2
Cellular compartment	mitochondrion	305	19.0	7.1E-48	2.3	1.1E-44
	ribosome	61	3.8	1.2E-22	4.3	1.9E-19
	mitochondrial respiratory chain complex I	31	1.9	1.6E-22	8.7	2.4E-19
	mitochondrial large ribosomal subunit	27	1.7	2.5E-21	9.6	3.7E-18
	mitochondrial inner membrane	89	5.5	3.5E-21	3.0	5.2E-18
	respiratory chain	33	2.1	3.5E-21	7.5	5.2E-18
	intracellular ribonucleoprotein complex	70	4.4	1.6E-15	2.9	2.5E-12
	mitochondrial small ribosomal subunit	19	1.2	4.2E-14	8.9	6.3E-11
	mitochondrial ribosome	18	1.1	5.3E-14	9.5	8.0E-11
	mitochondrial matrix	38	2.4	7.4E-8	2.7	1.1E-4
	mitochondrial membrane	23	1.4	5.8E-6	3.0	8.7E-3
Molecular function	structural constituent of ribosome	66	4.1	3.5E-18	3.3	5.7E-15
	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	21	1.3	3.1E-14	8.0	5.0E-11
	iron-sulfur cluster binding	25	1.6	1.1E-11	5.2	1.8E-8
	4 iron, 4 sulfur cluster binding	19	1.2	1.2E-10	6.3	1.9E-7
	poly(A) RNA binding	141	8.8	5.5E-10	1.7	8.9E-7
	transferase activity	164	10.2	1.8E-7	1.5	2.9E-4
	NADH dehydrogenase activity	9	0.6	9.1E-7	9.2	1.5E-3
	kinase activity	82	5.1	1.6E-5	1.6	2.6E-2

Annexe 5 : Analyse protéomique et phosphoprotéomique de l'effet cellulaire du fipronil sulfone



- ① Protéines et phosphoprotéines sensibles au fipronil sulfone et dépendantes de la γ -sécrétase.
- ② Protéines et phosphoprotéines sensibles au fipronil sulfone et indépendantes de la γ -sécrétase.

Annexe 6 : Phosphoprotéines modifiées par le fipronil sulfone et sensibles au DAPT

Accession number	Gene name	Protein name	peptide	Phospho site	Log2 ratio		
					FipS 20 vs DMSO	DAPT FipS 20 vs FipS 20	DAPT FipS 20 vs DAPT
B2RXM2	Gm6793	EG627828 protein	sSGSPyGGGYGSGGGSGGYGSR	Y333-p	1,6937	-0,8730	-
Q8JZZ0	Ugt3a2	UDP-glucuronosyltransferase 3A2	ILyESANIPDFR	Y58-p	1,6704	-0,5184	-0,1390
P70217	Hoxd13	Homeobox protein Hox-D13	ssPHASLGGFVPEk	S150-p	0,9220	-0,5779	-0,0819
Q80XP8	Fam76b	Protein FAM76B	vSSLsPEQEQLWk	S193-p	0,8165	-0,4511	-
D3Z2R5	Sepn1	Protein Sepn1	rPHsPDGAQPAPPR	S13-p	0,7567	-0,4170	0,0592
E9QKA4	Srrm1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	aPQTsSPPVVR	S713-p	0,7242	-0,4279	-0,0327
E9QKA4	Srrm1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	aPQTsSPPVVR	S714-p	0,7242	-0,4279	-0,0327
E9QKA4	Srrm1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	aPQtSSPPVVR	T712-p	0,7242	-0,4279	-0,0327
Q8C052	Map1s	Microtubule-associated protein 1S	kPPPPAsPGSSDSSAR	S684-p	0,6148	-0,5565	-0,1981
O54929	Wsb2	WD repeat and SOCS box-containing protein 2	sFLTtYQVLALPIK	Y384-p	0,3717	-0,3567	0,0207
Q9Z0U1	Tjp2	Tight junction protein ZO-2	sYHEAYEPDYGGGYsPSYDR	S239-p	0,3654	0,5322	-
Q9Z0U1	Tjp2	Tight junction protein ZO-2	sYHEAYEPDYGGGYsPSYDR	Y238-p	0,3654	0,5322	-
Q8BTI8	Srrm2	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	sMLQIPPDQNLSSGk	T973-p	0,3389	-0,3198	-0,2689
Q8BTI8	Srrm2	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	rVPsPTPVK	S2535-p	0,3315	0,6062	0,2737
Q6PGL7	Fam21	WASH complex subunit FAM21	vDNARVsPEVGSADVASIAQk	S747-p	-0,3656	0,8296	-0,1402
Q9QY81	Nup210	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	eLASPLALtPR	T1844-p	-0,4803	0,7229	0,0320
Q62261	Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	aQTLPTsVVTITSESSPGkR	S2331-p	-0,5942	0,8376	-0,0795
Q62261	Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	aQTLPTsVVTITSESSPGkR	S2334-p	-0,5942	0,8376	-0,0795
Q62261	Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	aQTLPTsVVTITSESSPGkR	S2336-p	-0,5942	0,8376	-0,0795
Q62261	Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	aQTLPTsVVTITSESSPGkR	S2337-p	-0,5942	0,8376	-0,0795
Q62261	Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	aQTLPTsVVTITSESSPGkR	S2340-p	-0,6881	0,6041	-0,1969
Q62261	Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	aQTLPTsVVTITSESSPGkR	S2339-p	-0,7469	0,5292	-0,2483
O35126	Atn1	Atrophin-1	tATPPGYkPGsPPSFR	S646-p	-0,7809	1,2632	0,1168
Q62261	Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	aQTLPTsVVTITSESSPGkR	T2330-p	-0,7943	0,6217	-0,2702
P13595	Ncam1	Neural cell adhesion molecule 1	gVTASsSPASAPk	S885-p	-0,8621	0,7698	0,2328
P13595	Ncam1	Neural cell adhesion molecule 1	gVTASsSPASAPk	S886-p	-0,8621	0,7698	0,2328
P13595	Ncam1	Neural cell adhesion molecule 1	gVTASsSPASAPk	S887-p	-0,8621	0,7698	0,2328
Q61079	Sim2	Single-minded homolog 2	tNPYPQQYSSSQMDk	T383-p	-0,9238	1,4244	-0,1257
P70399	Tp53bp1	Tumor suppressor p53-binding protein 1	sTPFIVPSSPIEQGGR	T378-p	-0,9761	1,1458	0,1187
Q64701	Rbl1	Retinoblastoma-like protein 1	eAVTIPVASATQSVSR	T384-p	-1,2302	0,8468	-0,2583
P49452	Cenpc1	Centromere protein C 1	vASVSRsPVDR	S158-p	-1,8491	2,2281	0,1156

Annexe 7 : Phosphoprotéines modifiées par le fipronil sulfone et insensibles au DAPT

Accession number	Gene name	Protein name	peptide	Phospho site	Log2 ratio		
					FipS 20 vs DMSO	DAPT FipS 20 vs FipS 20	DAPT FipS 20 vs DAPT
P18608	Hmg1	Non-histone chromosomal protein HMG-14	kVsADGAak	S7-p	1,0798	0,1117	1,6005
Q922F4	Tubb6	Tubulin beta-6 chain	ITTPTYGDLNHLVSATMSGVTTsLR	S39-p	1,0052	-0,0822	0,9072
Q922F4	Tubb6	Tubulin beta-6 chain	ITTPTYGDLNHLVSATMSGVITSLR	T37-p	1,0052	-0,0822	0,9072
Q922F4	Tubb6	Tubulin beta-6 chain	ITTPTYGDLNHLVSATMSGVTiSLR	T38-p	1,0052	-0,0822	0,9072
P35486	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	yHGhMSDPGVSYR	S293-p	0,9497	-0,0582	0,6678
P55012	Slc12a2	Solute carrier family 12 member 2	gEGTPAAGDGLGRPLGPTPsQSR	S74-p	0,8932	0,0351	0,4987
Q61033	Tmpo	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms alpha/zeta	gPPDFSSDEEREPIpVLGSGASVGR	T74-p	0,8714	0,0224	0,8772
P14873	Map1b	Microtubule-associated protein 1B	kLGGDVpSTQIDVpSQFGSfk	S1497-p	0,7903	-0,1864	0,4371
Q8R3Y8-2	Irf2bp1	Isoform 2 of Interferon regulatory factor 2-binding protein 1	aGGAsPAASSTTQPPAQHR	S453-p	0,7714	0,0387	-0,8015
Q35691	Pnn	Pinin	rGFsDSGGGPPAk	S66-p	0,6999	-0,0235	-0,3838
Q8R4Y8	Rtt1	Rotatin	gTPSsSLILcLk	S2008-p	0,6604	-0,2201	-0,3937
Q99KG3-3	Rbm10	Isoform 3 of RNA-binding protein 10	IASDDRPpPPR	S723-p	0,5393	0,2412	-0,4897
P14873	Map1b	Microtubule-associated protein 1B	sPSLSPPSPsPIEk	S1260-p	0,4703	-0,1510	-0,3334
Q7TSV4	Pgm2	Phosphoglucomutase-2	lcAGIMITAsHNPk	S173-p	0,4268	-0,1565	0,7076
Q7TSV4	Pgm2	Phosphoglucomutase-2	lcAGIMITAsHNPk	T171-p	0,4268	-0,1565	0,7076
Q4G0F8-2	Ubn1	Isoform 2 of Ubinuclein-1	cPEFFyPELVk	Y64-p	0,4104	-0,0513	0,7267
Q9QYC0-2	Add1	Isoform 2 of Alpha-adducin	aAVVTsPPPTTAPHk	S12-p	0,3409	0,1364	0,3520
Q9QYC0-2	Add1	Isoform 2 of Alpha-adducin	aAVVTsPPPTTAPHk	T11-p	0,3409	0,1364	0,3520
Q8C0C7	Farsa	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	thSQGGYGSQGYk	S301-p	0,3211	0,0841	0,7812
Q8C0C7	Farsa	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	thSQGGYGSQGYk	T299-p	0,3211	0,0841	0,7812
Q8BTI8	Srrm2	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	sEQPLSQVLPSLsPEHk	S1216-p	0,3153	0,0587	0,6359
Q8BTI8	Srrm2	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	sEQPLSQVLPSLsPEHk	S1214-p	0,3153	0,0587	0,6359
Q35465	Fkbp8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8	gAWsIPWk	S375-p	-0,3401	-0,0101	-0,4204
Q0VBL3	Rbm15	Protein Rbm15	IHSYsSPSTk	S126-p	-0,3731	0,2369	0,4878
D3Z5N2	Stmn1	Stathmin	aSGQAFELILsPR	S25-p	-0,3925	-0,0143	-0,5582
G3X963	Atad2	ATPase family AAA domain-containing protein 2	kPNMFYsGPASPARPR	S303-p	-0,4008	0,2642	0,6044
G3X963	Atad2	ATPase family AAA domain-containing protein 2	kPNMFYsGPASPARPR	S307-p	-0,4008	0,2642	0,6044
Q3TUJ9	Tpd52l2	Tumor protein D52-like 2, isoform CRA_c	nSATFksFEDR	S146-p	-0,4057	-0,2017	-0,7561
Q80XU3	Nuclks1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	aTVTPsPVKkGk	S181-p	-0,4197	0,0130	-0,4269
A2AVJ7	Rrbp1	Ribosome-binding protein 1	kDGsPSQAK	S645-p	-0,4824	-0,1628	-0,9375
P11440	Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1	vYtHEVTLWYR	T161-p	-0,5157	0,1436	-1,3645
F6RJ39	Acin1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus (Fragment)	hLsHPEPEQHQHVIQR	S656-p	-0,5191	-0,1162	-1,1025
D3Z5R4	Wipf3	WAS/WASL-interacting protein family member 3	alSGPLPAPAsPR	S161-p	-0,5518	0,0695	-0,4052
P20152	Vim	Vimentin	sLYSsSPGGAYVTR	S55-p	-0,5598	0,0450	-0,6121
P20152	Vim	Vimentin	sLYSsSPGGAYVTR	S56-p	-0,5598	0,0450	-0,6121
A2ABV5	Med14	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14	IPtVPMGLTQR	T893-p	-0,5914	0,2431	-0,6694
Q62048	Pea15	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	dIIRQPSEEEIk	S116-p	-0,6668	-0,1494	-0,8892
P57776	Eef1d	Elongation factor 1-delta	aTAPQTQHVsPMR	S133-p	-0,6971	0,2158	-0,6016
P33609	Pola1	DNA polymerase alpha catalytic subunit	alPSGkPAsPVLR	S215-p	-0,6999	-0,1660	-0,3864
A2AWT5	Ubt1	Nucleolar transcription factor 1	kQTTsPASK	S389-p	-0,8557	-0,0127	-0,4086
J3QNB1	Larp1	La-related protein 1	iLIVTQtPPYMR	S626-p	-0,8689	-0,2715	-0,5498
P15331	Prph	Peripherin	ILGSGsPSSSAR	S57-p	-0,8996	-0,0111	-1,1381
E9Q2N1	Brwd1	Bromodomain and WD repeat-containing protein 1 (Fragment)	rGPEVEGsPVSEALR	S1830-p or S2295-p	-0,9348	0,1320	-1,2599
P11440	Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1	vyTHEVTLWYR	Y160-p	-1,0252	0,1436	-1,3645
Q80ZM5	H1fx	H1 histone family, member X	gASAAsSPAPk	S133-p	-1,0846	0,1121	-0,8939
Q80ZM5	H1fx	H1 histone family, member X	gASAAsSPAPk	S134-p	-1,0846	0,1121	-0,8939
P14873	Map1b	Microtubule-associated protein 1B	dLTGQVPIPPVik	T527-p	-1,1937	0,0613	-1,0888
Q9JLV1	Bag3	BAG family molecular chaperone regulator 3	sGTPVHCsPIR	S297-p	-1,2497	-	-0,9844
P11440	Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1	iEGEGTyGVVYk	Y15-p	-1,4083	-0,0976	-1,3982
P11440	Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1	iEGEGTyGVVYk	T14-p	-1,4379	-0,1116	-1,5381



Morgane CAM



Contribution à l'étude de la maladie d'Alzheimer : induction de la production d'amyloïdes beta-42/43 par le fipronil, un pesticide de la famille des phenylpyrazoles. Effets cellulaires des Leucettines, une famille d'inhibiteurs des kinases DYRKs/CLKs.

Résumé

Lors du screening de composés du 'human chemical exposome', les herbicides triazines et les insecticides pyrazoles, notamment le fipronil, ont révélé leur capacité à induire la production de peptides amyloïde β -42 et -43. Ayant tendance à s'agréger en oligomères puis en plaques, ils sont une caractéristique de la maladie d'Alzheimer (MA). Cette découverte informe sur le danger potentiel de ces produits et apporte des outils pour décrypter les mécanismes menant à l'altération du rapport des différentes formes d'amyloïdes.

Par ailleurs, la dérégulation de DYRK1A, impliquée dans la trisomie 21, affecte aussi ces peptides amyloïdes, ainsi que la protéine Tau qui est alors hyperphosphorylée et a tendance à s'agréger en enchevêtrements neurofibrillaires, une autre caractéristique de la MA. Ce même effet sur Tau est observé avec CDK5 dans la MA, les AVC et les traumatismes crâniens. Le développement d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de ces deux kinases est donc un enjeu pour ManRos Therapeutics.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, pyrazole, fipronil, peptide amyloïd β 42, DYRK1A, leucettines

Résumé en anglais

In the screening of 'human chemical exposome' compounds, triazine herbicides and pyrazole insecticides, especially fipronil, have shown their ability to induce β -amyloid -42 and -43 peptide production. As they tend to aggregate into oligomers then into plaques, they are a characteristic of Alzheimer's disease (AD). This discovery informs about the potential danger of these products and provides tools to decipher the mechanisms leading to the alteration of the ratio of the different forms of amyloid.

Moreover, dysregulation of DYRK1A, involved in trisomy 21, also affects these amyloid peptides, as well as the Tau protein which is then hyperphosphorylated and tends to aggregate into neurofibrillar tangles, another characteristic of AD. This same effect on Tau is observed with CDK5 in AD, stroke and brain injury. The development of specific pharmacological inhibitors of these two kinases is therefore an issue for ManRos Therapeutics.

Key words: Alzheimer's disease, pyrazole, fipronil, amyloid β 42 peptide, DYRK1A, leucettines.