

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2018

THESE 2018 / TOU3 / 2022

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

par

LANDREAUD MARLENE

IMPACT DES METAUX LOURDS ET DES PESTICIDES DANS LA MALADIE
D'ALZHEIMER

Date de soutenance
11 Juin 2018

Directeurs de thèse : Dr Anne Fernandez Vidal, Dr Elisa Boutet

JURY

Président : Pr SALLES Bernard
1^{er} assesseur : Dr FERNANDEZ-VIDAL Anne
2^{ème} assesseur : Dr BOUTET Elisa
3^{ème} assesseur : MASBOU Christine

**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 08 janvier 2018**

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S.	Biochimie	Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERA EVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. OLICHON A.	Biochimie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALO A.	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
M. PERES M.	Immunologie
Mme SALABERT A.S	Biophysique

Remerciements

Je tiens à remercier Anne Fernandez-Vidal, ma directrice de thèse, pour son implication dans ce projet, sa disponibilité, ses conseils, ses remarques et le partage de ses connaissances, sans lesquels la rédaction de ces lignes n'aurait pu aboutir.

Je remercie Elisa Boutet pour avoir accepté de codiriger mon travail, pour m'avoir présenté Mme Fernandez-Vidal, ainsi que pour ses précieux conseils pour la rédaction de cette thèse.

Je remercie également Monsieur le Professeur Bernard Salles, président du jury, pour les connaissances qu'il apportera lors de ma soutenance.

Je remercie Christine Masbou d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, de m'avoir enseigné les valeurs du métier de Pharmacien, ainsi que pour la bienveillance dont elle a fait preuve lors de ma formation et par la suite.

Merci à l'ensemble des professeurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse qui ont participé à mon enseignement, ainsi qu'au personnel non-enseignant de la Faculté, en particulier à Isabelle pour son temps et ses conseils.

Pour terminer, je remercie mes proches pour leur soutien, leur aide et leur patience tout au long de mes études et de la rédaction des lignes qui suivent.

Liste des Abréviations

2,4-D: Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	DMSO: Diméthylsulfoxyde
2,4,5-T: Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique	DMT-1: Divalent Metal Transporter 1
β-CTF: AβPP C-terminal fragment β	DNF: Dégénérescence neurofibrillaire
ACH: Aluminium Chlorhydrate	DST: Digit-symbol test
Acho: Acétylcholine	dUTPase: Deoxyuridine Triphosphatase
AchoE: Acétylcholinestérase	DVT: Digit Vigilance Test
ADAM: A Desintegrin and Metalloprotease	ECE: European Commission Environment
ADAS: Alzheimer's Disease Assessment Scale	EEA: European Environment Agency
ADAS-cog: sous échelle cognitive de l'Alzheimer's Disease Assessment Scale	ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ADL: Activities of Daily Living	ENF: Enchevêtrements Neurofibrillaires
ADWG: Australian Drinking Water Guidelines	Erk1/2: Extracellular signal-regulated kinases 1/2
AICD: APP Intracellular Domain	ET: Ecart-Type
AINS: Anti-inflammatoire non stéroïdien	ETM: Élément Trace Métallique
Al: Aluminium	F₂-IsoPs: F2-Isoprostanes
ALA: Acide δ-Aminolévulinique	FAM: Fluorescein amidite
ALAD: Acide δ-Aminolévulinique Déshydratase	Fe: Fer
AIC13: Chlorure d'Aluminium	FTP-CDW: Health Canada
ALCOVE: Alzheimer Cooperative Valuation in Europe	GSK3β: Glycogen synthase kinase 3 beta
APLP1: Amyloid-β Precursor-Like Protein 1	GTP: Guanosine Triphosphate
ApoE: Apolipoprotéine E	H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
APP: Amyloid Precursor Protein	HAS: Haute Autorité de Santé
As: Arsenic	HCB: Hexachlorobenzène
ASMR: Amélioration du Service Médical Rendu	HDL: High Density Lipoprotein
ATP: Adénosine Triphosphate	Hg: Mercure
ATS: Atropine	IACHoE: Inhibiteur de l'Acétylcholinestérase
BACE-1: Beta-Secretase 1	IADL: Instrumental Activities Of Daily Living
Bax: Bcl-2-associated X protein	InVS: Institut de Veille Sanitaire
BHE: Barrière Hémato-Encéphalique	IP3K: Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase
Ca: Calcium	IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
CA3: troisième division histologique de l'hippocampe	IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
Cd: Cadmium	JNK: c-Jun N-terminal kinases
CDK5: Cyclin-dependent kinase 5	LCR: Liquide Céphalorachidien
CDW: Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water	LINE-1: human Long Interspersed Nuclear Element 1
CIM 10: Classification Internationale des Maladies	MA: Maladie d'Alzheimer
CO: Monoxyde de carbone	MADRS: Montgomery and Asberg Depression Rating Scale
CPSC: Consumer Product Safety Commission	MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
Cu: Cuivre	MCPA: Acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique
CYP: Cytochrome P-450	MBP: Myelin Basic Protein
DDE: Dichlorodiphényldichloroéthylène	MEM: Mémantine
DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane	MMSE: Mini Mental State Examination
DEHP: Di-(2-ethylhexyl)-Phthalate	Mn: Manganèse
DGCCRF: Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes	MP: Maladie de Parkinson
DGS: Direction Générale de la Santé	MT: Métallothionéines
DHC: dihydroxycholecalciferol	mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
DMS IV: Diagnostic and Statistical Manual - Revision 4	MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
	NOM: Norma Official Mexicana
	Ni: Nickel
	NINCDS/ADRDA: National Institute of Neurological and Communicative Disorders

and Stroke et Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NMDA: N-Méthyl-D-Aspartate
NTE: Neuropathy Target Esterase
OC: Organochloré
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
OP: Organophosphoré
p70S6K: protéine kinase ribosomale S6 de 70kDa
p-p70S6K: p70S6K sous forme phosphorylée
PA II: Pursuit Aiming II test
PAQUID: Personnes Agées QUID
Pb: Plomb
PBDE: Polybromodiphényléthers
PBG: Porphobilinogène
pBPM: protéines de Bas Poids Moléculaire
PCRWR: Pakistan Council of Research in Water
PHF: Paired Helical Filaments
PP2A: Protéine Phosphatase 2A
PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PRR13: Proline Rich 13
PS: Préséniline
pS404: protéine Tau phosphorylée sur le site sérine 404
pT205: protéine Tau phosphorylée sur le site thréonine 205
PTH: Parathormone
QI: Quotient Intellectuel
R134: protéine Tau totale
RE: Réticulum Endoplasmique
ROS: Reactive Oxygen Species
SNC: Système Nerveux Central
SNP: Système Nerveux Périphérique
Tau-1: protéine Tau non phosphorylée sur les sites sérines 198/199/202
TEM: tomographie d'émission monophotonique
TEP: Tomographie par Emission de Positons
USEPA: United States Environmental Protection Agency
WAIS: Wechsler Adult Intelligence Scale
WHO: World Health Organization
Zn: Zinc

Sommaire

Introduction.....	1
1 Etat des connaissances sur la Maladie d'Alzheimer	3
1.1 Epidémiologie.....	3
1.2 Physiopathologie	4
1.2.1 Plaques séniles	5
1.2.2 Dégénérescence neurofibrillaire	6
1.2.3 Anomalies de neurotransmetteurs	7
1.2.4 Atrophie cérébrale.....	8
1.3 Symptomatologie	9
1.3.1 Troubles mnésiques.....	9
1.3.2 Syndrome aphaso-apraxo-agnosique.....	10
1.3.3 Déclin des fonctions exécutives	10
1.3.4 Troubles psychiques et troubles du comportement	11
1.4 Diagnostic	12
1.5 Traitements actuels et à venir.....	13
1.5.1 Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.....	13
1.5.2 Inhibiteurs des récepteurs NMDA au glutamate.....	13
1.5.3 Prise en charge non médicamenteuse	14
1.5.4 Pistes de recherche	14
1.6 Facteurs protecteurs et facteurs de risque	15
1.6.1 Facteurs protecteurs	15
1.6.2 Facteurs de risques génétiques.....	16
1.6.3 Facteurs de risques individuels et environnementaux.....	17
2 Les Métaux Lourds.....	18
2.1 Définition	18
2.2 Sources d'exposition	19
2.2.1 Sources aériennes.....	19
2.2.2 Sources hydriques	21
2.2.3 Sources alimentaires	23
2.2.4 Amalgames dentaires.....	25
2.3 L'Aluminium.....	26

2.3.1	Sources d'exposition à l'aluminium.....	26
2.3.2	Toxicocinétique de l'aluminium	27
2.3.3	Mécanismes d'action de l'aluminium suggérés dans la MA	30
2.3.4	Intoxications aiguës et chroniques à l'aluminium	34
2.4	Le Plomb.....	39
2.4.1	Toxicocinétique du plomb.....	40
2.4.2	Mécanismes d'action du plomb suggérés dans la MA	42
2.4.3	Intoxications aiguës et chroniques au plomb.....	46
2.5	Le Mercure	48
2.5.1	Toxicocinétique du mercure.....	49
2.5.2	Mécanismes d'action du mercure suggérés dans la MA.....	51
2.5.3	Intoxications aiguës et chroniques au mercure	57
2.6	Le Cadmium.....	61
2.6.1	Toxicocinétique du cadmium	62
2.6.2	Mécanismes d'action du cadmium suggérés dans la MA	64
2.6.3	Intoxications aiguës et chroniques au cadmium	71
2.7	Le Manganèse.....	72
2.7.1	Toxicocinétique du manganèse.....	73
2.7.2	Mécanismes d'action du manganèse suggérés dans la MA.....	74
2.7.3	Intoxications aiguës et chroniques au manganèse	80
2.8	Autres métaux lourds suspectés dans la MA	81
2.8.1	Rôle du fer dans la MA	81
2.8.2	Rôle du cuivre dans la MA	86
2.8.3	Rôle du zinc dans la MA.....	90
2.9	Conclusion sur l'impact des métaux lourds dans la MA.....	97
3	Les Pesticides.....	99
3.1	Définition.....	99
3.2	Sources d'exposition	101
3.3	Différentes classes chimiques de pesticides	102
3.3.1	Pesticides organochlorés.....	102
3.3.2	Pesticides organophosphorés	105
3.3.3	Carbamates anticholinestérasiques	108
3.3.4	Pyréthrinoïdes de synthèse.....	109
3.3.5	Néonicotinoïdes.....	111

3.4	Liens entre l'exposition aux pesticides et le développement de la MA.....	114
3.4.1	Etudes de cohortes.....	114
3.4.2	Taux sériques et cérébraux de pesticides	116
3.4.3	Mécanismes d'action des pesticides potentiellement en lien avec la MA.....	117
3.5	Conclusion sur l'impact des pesticides dans la MA.....	128
	Conclusion sur l'impact des contaminants environnementaux dans la MA	129
	Bibliographie.....	135

Introduction

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative de progression lente et insidieuse, caractérisée par une perte mnésique progressive, puis par un déclin cognitif sévère menant à la démence (Moulton et Yang, 2012). La maladie intéresse préférentiellement le sujet âgé de plus de 65 ans, les premiers symptômes ne se manifestant que plusieurs décennies après l'apparition des premières lésions (Myhre et *al.*, 2013). Elle se caractérise par la présence de lésions spécifiques, les plaques séniles constituées de peptides β -amyloïde (peptides $A\beta$), ainsi que la dégénérescence neurofibrillaire associée à la présence de protéine Tau hyperphosphorylée. A ces lésions s'ajoutent une neuroinflammation, ainsi qu'une atrophie corticale préférentiellement cholinergique (Myhre et *al.*, 2013). Pour une raison encore inconnue, ces processus se manifestent en premier lieu dans le cortex entorhinal et l'hippocampe au sein du système limbique (*Figure 1*), siège de la mémoire, puis se propagent à l'ensemble du système nerveux central (SNC), menant à une atrophie généralisée, démence, modification de personnalité et à terme au décès de l'individu (Myhre et *al.*, 2013).

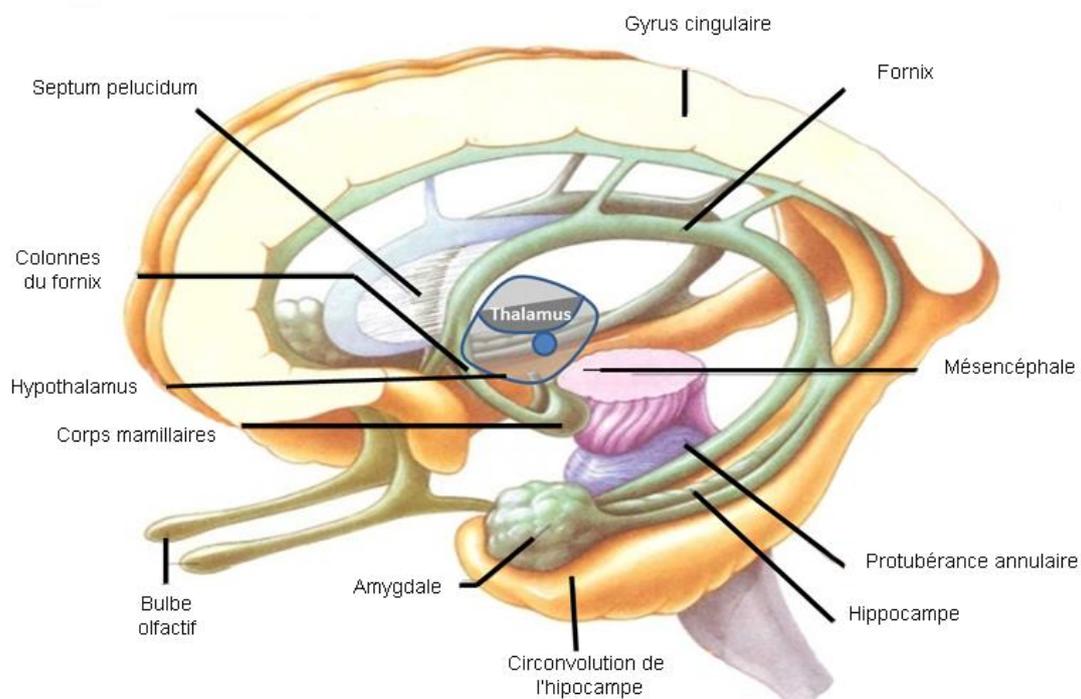


Figure 1 – Schéma du système limbique (Yvon Beauchamp, MD, 2013)

La Maladie d'Alzheimer est la cause la plus fréquente de démence du sujet âgé. L'absence d'outil diagnostique, le manque de traitement curatif, ainsi que le vieillissement de la population en font un véritable enjeu de santé publique (Tanner et *al.*, 2014; Myhre et *al.*, 2013). Les chercheurs estiment aujourd'hui que d'ici 2050, plus d'une centaine de millions de personnes dans le monde seront atteintes de la maladie (Moulton et Yang, 2012).

Il n'existe à l'heure actuelle aucun test diagnostique pour cette pathologie. Le diagnostic de présomption s'appuie sur un ensemble de troubles cognitifs dans les domaines de la mémoire, du langage, de la reconnaissance spatio-temporelle, ou encore des fonctions exécutives (Tanner et *al.*, 2014). Le diagnostic de certitude est actuellement possible uniquement post-mortem sur biopsie cérébrale.

Il est reconnu que la maladie d'Alzheimer est multifactorielle. On retrouve dans ses étiologies l'âge, la présence de mutations génétiques concernant notamment les gènes codant l'allèle E4 de l'apolipoprotéine E (ApoE) et, concernant la maladie d'Alzheimer du sujet jeune, des mutations de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et de la prénésiline 1 et 2, composants des γ -sécrétases responsables du clivage du peptide A β (Myhre et *al.*, 2013. Tanner et *al.*, 2014). Enfin sont cités les traumatismes crâniens ou encore la présence de facteurs de risques cardiovasculaires tels qu'hypertension, diabète ou hypercholestérolémie (Tanner et *al.*, 2014).

A l'heure actuelle, de nombreux autres facteurs étiologiques présumés font l'objet d'études parfois controversées. On compte parmi ces facteurs l'exposition à certains métaux lourds, aux pesticides, aux particules fines (pollution de l'air), aux solvants, aux antimicrobiens, et bien d'autres encore (Yegambaram et *al.*, 2015). Si l'implication de ces substances manque encore de preuves tangibles dans le développement de maladies neurodégénératives, comme la maladie Alzheimer, mais aussi la maladie de Parkinson et la Sclérose en Plaques, elles n'en sont pas moins prises au sérieux par les autorités sanitaires et de nombreux chercheurs, alimentant de plus en plus de publications basées sur des études épidémiologiques de grande envergure.

1 Etat des connaissances sur la Maladie d'Alzheimer

1.1 Epidémiologie

La Maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus répandue chez le sujet âgé avec une prévalence et une incidence augmentant de façon exponentielle avec l'âge. En effet, les études montrent un doublement par tranche de 5 ans entre 65 et 85 ans, plus de 70% des cas concernant les personnes âgées de plus de 80 ans avec une prévalence très majoritairement féminine. Ainsi, à l'âge de 65 ans, on observe une prévalence de 5% dans les pays industrialisés, et à l'âge de 85 ans, cette prévalence atteint plus de 30% (Davous et Delacourte, 1999).

En 2015, on estime le nombre de patients atteints de la MA dans le monde à 47,5 millions, nombre qui pourrait atteindre plus d'une centaine de millions d'ici 2050 selon les chercheurs, et ce principalement en raison du vieillissement de la population (Moulton et Yang, 2012).

Cependant, ces chiffres varient en fonction des études et de l'hétérogénéité des méthodes utilisées. Il est difficile d'obtenir une estimation correcte du nombre de cas de MA, notamment considérant la difficulté d'établir un diagnostic, en particulier dans les formes débutantes de la maladie (Ankiri, 2009). Malgré tout, les chercheurs s'accordent à dire que la prévalence de la pathologie est en constante augmentation.

En Europe, le projet ALCOVE (Alzheimer COoperative Valuation in Europe) lancé en 2011, regroupant 19 Etats membres et dont les conclusions sont tombées en 2013, a permis l'harmonisation du recueil des données épidémiologiques notamment grâce à la mise en place de critères partagés. Le bilan de l'étude donne pour 2011, une estimation de la prévalence de la pathologie en Europe à 6,37 millions de personnes et ajoute qu'en 2040, 10,2 millions d'européens pourraient être concernés (Communiqué de presse de la HAS, 2013).

A l'échelle française, l'étude épidémiologique la plus complète est l'étude prospective PAQUID (Personnes Agées QUID) réalisée en Aquitaine sur une cohorte de patients de 65 ans et plus, venant de 75 communes différentes et assimilables à la population française. Le recueil des données a débuté en 1988 pour un suivi à long terme (plus de 24 ans) de 3 777 patients (Dartigues et *al.*, bilan PAQUID 2012). Les conclusions les plus récentes datent de 2012, les critères du NINCDS-ADRDA

(National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke et Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) ayant été choisis pour le diagnostic de la maladie (Ankri, 2009).

L'étude estime le nombre de cas en France à près d'un million, avec 250.000 nouveaux cas rapportés chaque année (Fouquet et *al.*, 2007).

L'ensemble de ces études épidémiologiques a également permis de mettre en lumière les différents facteurs de risque de la MA, qui seront abordés dans la dernière sous-partie de ce chapitre.

1.2 Physiopathologie

C'est en 1906 qu'Alois Alzheimer, neurologue allemand, observe pour la première fois les symptômes d'une patiente, Auguste Deter âgée de 51 ans, à qui il diagnostiqua une démence « présénile », soit une démence se manifestant chez un individu entre 45 et 65 ans et caractérisée par une dégénérescence d'évolution rapide. Les démences « séniles » référant à l'époque et jusqu'à récemment aux affections neurodégénératives du sujet âgé de plus de 75 ans et considérées alors comme un processus normal de vieillissement (Rubinstein, 2016).

A présent, plus de 100 ans plus tard, les chercheurs ont beaucoup progressé dans la compréhension des mécanismes de la pathologie.

La MA est caractérisée par un vieillissement anormal et accéléré du cerveau dû à une neurodégénérescence insidieuse, progressive et irréversible. Grâce aux examens histologiques, deux types de lésions cérébrales ont pu être identifiés : les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), celles-là même qu'a pu observer le Dr Alois Alzheimer lors de l'autopsie de sa patiente en 1907 (Aupetit, 2004). Au cours de l'évolution de la maladie, on observe également une atrophie cérébrale progressive liée à la DNF (Duyckaerts et *al.*, 1999).

1.2.1 Plaques séniles

Il s'agit de dépôts de peptides A β , agrégés en plaques amyloïdes (ou séniles), situés dans la partie extracellulaire du neurone et qui ont une topographie relativement diffuse (*Figure 2*). Les dépôts de peptides A β formant le cœur de la plaque amyloïde sont fréquemment entourés de neurites en DNF, qui forment ce que l'on appelle la couronne (Duyckaerts et *al.*, 1999 ; Davous et Delacourte, 1999). Ces dépôts sont retrouvés au niveau cortical, plus particulièrement dans la substance grise des couches néocorticales II et III, mais également dans l'hippocampe, siège de la mémoire. Avec l'évolution de la maladie, ces dépôts tendent à se généraliser à l'ensemble du cerveau. De plus, on peut retrouver ces dépôts amyloïdes dans la paroi des vaisseaux méningés et parenchymateux, pour former l'angiopathie amyloïde.

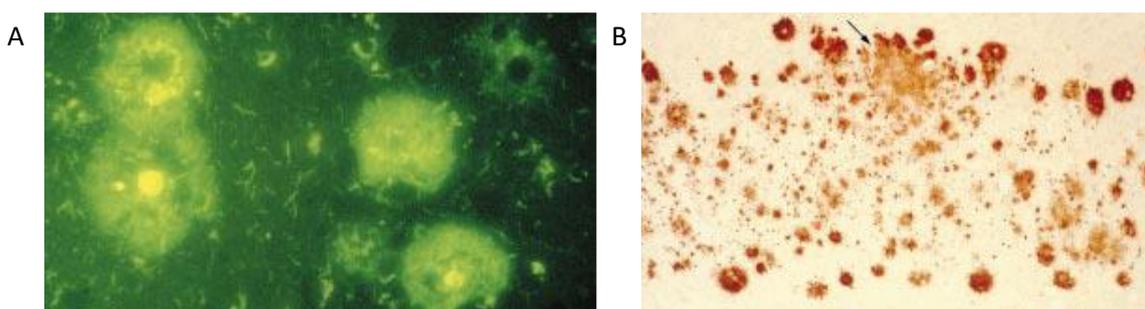


Figure 2 - Immunohistochimie de plaques amyloïdes réalisée à partir de coupes corticales d'un patient atteint par la maladie d'Alzheimer (Davous, A. Delacourte, *Encyclopédie Médico-Chirurgicale 17-056-A-10, 1999*).

A. Plaques amyloïdes colorées par la thioflavine (fluorescence jaune). Certaines plaques ont un cœur dense de substance amyloïde. **B.** Coloration immunochimique des dépôts amyloïdes avec un anticorps anti-peptide amyloïde A β . On note la disposition laminaire des dépôts. Certains dépôts sont diffus, il s'agit de la substance préamyloïde (flèche).

Le peptide A β est lui-même issu du clivage anormal de l'Amyloïd Precursor Protein (APP), protéine ubiquitaire, par des enzymes appelées β - et γ -sécrétases. C'est ce que l'on nomme la voie amyloïdogénique ; la voie normale non-amyloïdogénique correspondant au clivage par l' α -sécrétase (*Figure 3*). Il possède une structure caractéristique en feuillets β plissés, le rendant insoluble (Davous et Delacourte, 1999 ; Duyckaerts et *al.*, 1999).

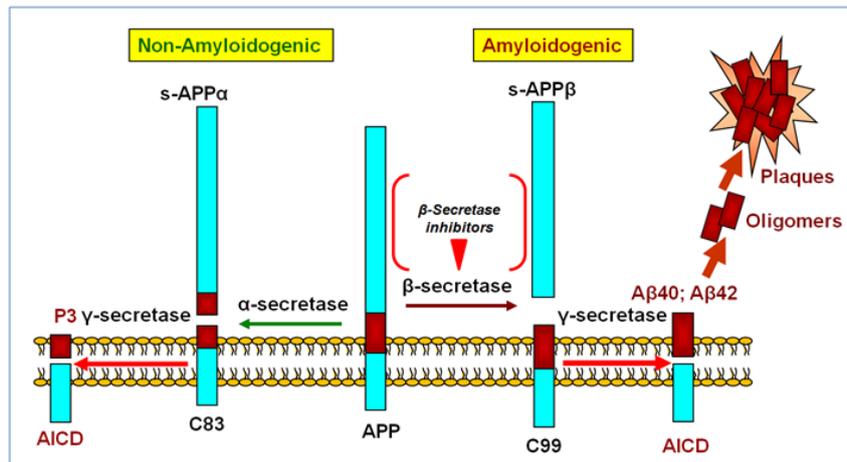


Figure 3 - Schématisation du clivage de l'APP selon les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique (Zhang C., *Natural Compounds That Modulate BACE1-processing of Amyloid-beta Precursor Protein in Alzheimer's Disease*, 2012).

AICD : APP Intracellular Domain; APP : Amyloid Precursor Protein.

1.2.2 Dégénérescence neurofibrillaire

Elle est caractérisée par la présence de protéine Tau hyperphosphorylée dans le milieu intracellulaire neuronal. Tau étant une protéine stabilisatrice du réseau microtubulaire responsable du transport intraneuronale et de la structure tridimensionnelle de la cellule. La phosphorylation anormale de Tau, régulée par un grand nombre de kinases, entraîne ainsi un désassemblage des microtubules et l'inhibition du transport cellulaire, aboutissant ainsi à la DNF (*Figure 4*). L'accumulation intraneuronale de Tau en écheveaux (neurofibrillary tangles dans la littérature anglosaxonne) présente une structure très caractéristique sous forme de paires de filaments appariés en hélices (PHF pour Paired Helical Filaments en anglais) (Reitz et Mayeux, 2014 ; Davous et Delacourte, 1999).

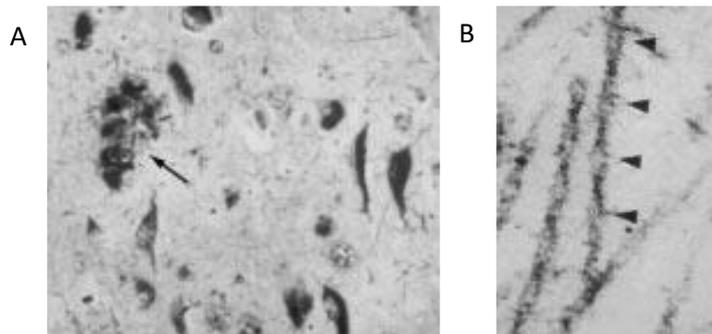


Figure 4 - Aspects histologiques et marquage immunochimique de la DNF (Davous et Delacourte, Encyclopédie Médico-Chirurgicale 17-056-A-10, 1999).

A. Coloration des neurones en DNF et des plaques neuritiques (flèche) par imprégnation argentique. **B.** Observation en microscopie électronique de paires de filaments en hélice (PHF) de la DNF. On observe la périodicité des hélices (têtes de flèches).

Cette dégénérescence est principalement observée, grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre les sites de phosphorylation de Tau, dans l'hippocampe ainsi que dans la substance grise néocorticale, et plus particulièrement dans les cellules des couches II, III et V. L'analyse biochimique de la DNF révèle une progression hiérarchique et permet l'identification de dix régions cérébrales successivement atteintes par cette dégénérescence.

La progression de ces deux types de lésions peut s'effectuer sur plusieurs décennies, d'où le caractère insidieux de la MA. Cependant, elles ne sont pas spécifiques de la MA. On les retrouve en effet en moindres proportions dans le vieillissement physiologique, ainsi que dans d'autres pathologies dégénératives. La DNF semble avoir deux principales conséquences dans la MA. D'une part, on observe une perturbation des principaux neurotransmetteurs, tels que l'acétylcholine et le glutamate, et d'autre part une atrophie cérébrale progressive (Davous et Delacourte, 1999 ; Duyckaerts et *al.* 1999).

1.2.3 Anomalies de neurotransmetteurs

Il a été démontré que le système cholinergique était le premier touché par la MA, notamment en raison de la diminution de l'activité de l'enzyme responsable de la synthèse de l'Acétylcholine (Acho), la choline acétyltransferase. Il se trouve que cette synthèse diminuée affecte plus particulièrement l'hippocampe et le cortex, sans que l'on puisse expliquer l'exacte cause de ce phénomène. Cependant, le métabolisme

du peptide A β et de son précurseur, l'APP, semblent avoir un lien encore inexpliqué avec le système cholinergique (Davous et Delacourte, 1999). Il existe à l'heure actuelle des traitements de la MA reposant sur la réactivation de ce système cholinergique qui seront détaillés dans la cinquième partie de la présente thèse.

Au cours du développement de la maladie, il semblerait que tous les neurotransmetteurs finissent par être atteints. Cependant, il existe dans la pathologie une suractivation du système glutamatergique, avec stimulation anormale du récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate), dont on ne connaît pas la cause à l'heure actuelle, mais qui fait également partie des cibles de traitement.

1.2.4 Atrophie cérébrale

Cette atrophie d'apparition tardive par rapport aux lésions précédemment rencontrées correspond à une importante perte neuronale, en premier lieu hippocampique (*Figure 5*), puis temporale et enfin frontale, entraînant fréquemment une gliose due à la phagocytose des neurones morts par les astrocytes. Cette atrophie est particulièrement difficile à quantifier chez les sujets atteints de MA, mais peut être mise en évidence par IRM anatomique et montre notamment des ventricules dilatés (Davous et Delacourte, 1999 ; Duyckaerts et *al.*, 1999). Le mécanisme de l'atrophie porte encore à controverse. Certains chercheurs l'attribuent à la DNF elle-même, pour la simple raison qu'elle se manifeste plus particulièrement dans les zones cérébrales où la DNF est intense (Duyckaerts et *al.*, 1999), cette dégénérescence pouvant être le résultat de deux théories qui s'affrontent : celle d'une probable fonction toxique du peptide A β et celle de la perte de fonction de l'APP.

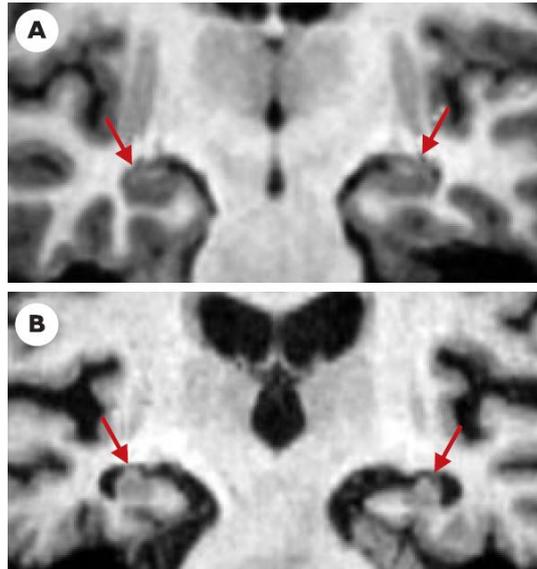


Figure 5 - Atrophie hippocampique dans la Maladie d'Alzheimer visualisée par IRM (Dhenain et al., *Le diagnostic : de la neuropathologie à l'imagerie cérébrale, Médecine/Sciences, 2002*).

Coupe coronale passant par le corps des formations hippocampiques (flèches) d'un sujet témoin (A) et d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer (B). Il existe une atrophie importante des formations hippocampiques du patient atteint de maladie d'Alzheimer.

1.3 Symptomatologie

La dégénérescence, associée à la toxicité du peptide A β pour les neurones aboutit à une perte cognitive progressive et irréversible directement liée à la présence et à l'intensité des lésions mentionnées ci-dessus. Il en résulte un ensemble de signes cliniques plus ou moins caractéristiques de la MA.

1.3.1 Troubles mnésiques

Ils sont généralement les premiers à se manifester dans la MA, et apparaissent lorsque les lésions cérébrales sont déjà avancées. Ils peuvent être appréciés par des tests standardisés qui seront repris plus en détail dans ce chapitre. Les troubles de la mémoire sont en grande partie liés aux lésions hippocampiques, l'hippocampe étant un important siège de la mémoire, mais également aux lésions corticales dans la mesure où le cortex, très organisé et hiérarchisé, est également le lieu de stockage de souvenirs.

La mémoire à court puis à long terme sont affectées dans la MA, avec une atteinte de la mémoire épisodique (autobiographique) plus précoce que la mémoire

sémantique (factuelle), permettant d'envisager une dégradation hiérarchisée. Les chercheurs ont ainsi pu mettre en évidence cette hiérarchie des troubles mnésiques avec une atteinte de la mémoire épisodique, puis de la mémoire de travail et enfin de la mémoire sémantique et procédurale, reflétant la progression des lésions depuis l'hippocampe, passant par les aires frontales, puis les aires associatives temporales, pour terminer au niveau sous-cortical (Davous et Delacourte, 1999).

La plainte mnésique est fréquemment associée à une désorientation spatio-temporelle qui apparaît également de manière précoce dans la manifestation clinique de la pathologie (Belon et *al.*, 2013).

1.3.2 *Syndrome aphaso-apraxo-agnosique*

Ces troubles se manifestent plus tardivement dans l'évolution clinique de la MA et sont d'intensité progressive avec son évolution.

L'aphasie correspond à un trouble du langage à la fois parlé et écrit et est en partie liée à la détérioration de la mémoire sémantique. L'altération du langage écrit se manifeste à la fois par une agraphie et une dysorthographe (Belon et *al.*, 2013).

L'apraxie concerne les troubles du mouvement. Elle peut être observée par la réalisation d'épreuves de dessin, où l'on observe une désorganisation spatiale ainsi qu'une perte de perspective. L'apraxie peut également toucher les mouvements de la vie quotidienne, on citera alors l'apraxie de l'habillage, fréquente dans les phases avancées de la MA.

Enfin, l'agnosie représente les troubles de la reconnaissance visuelle des objets, visages ou images (Davous et Delacourte, 1999).

1.3.3 *Déclin des fonctions exécutives*

Elles se définissent comme les compétences cognitives responsables de la planification, de l'organisation et de la synchronisation des actions complexes. On peut retrouver ces troubles dans d'autres types de démences, notamment les démences fronto-temporales. Ce déclin entraîne généralement une détérioration de la capacité d'abstraction, de jugement, de raisonnement et de planification. Cet ensemble de troubles entraîne une gêne certaine dans les activités de la vie

quotidienne pour les patients atteints de MA. Ces fonctions exécutives peuvent être évaluées par des échelles standardisées comme la WAIS (Wechsler Adult Intelligence Scale) et bien d'autres (Bherer et *al.*, 2004 ; Davous et Delacourte, 1999).

1.3.4 Troubles psychiques et troubles du comportement

Les troubles psychiques se manifestent fréquemment par une dépression pouvant être précoce et s'accroissant au cours de l'évolution de la maladie. La symptomatologie est alors sensiblement différente de celle observée chez les patients exempts de MA, avec notamment un sentiment de culpabilité moins présent et une accentuation des idées délirantes et hallucinations. L'échelle MADRS (Montgomery-Asberg depression rating scale) peut être utile dans l'évaluation de la dépression des patients Alzheimer.

L'apathie est le symptôme le plus fréquemment observé et peut être associé en début de maladie à des troubles de l'attention, un émoussement affectif ou une anhédonie. Par la suite, des changements de personnalité ou de caractère peuvent fréquemment survenir associés à des troubles comportementaux associant agitation, agressivité, perte de la notion d'hygiène et troubles du sommeil, qui ont tendance à s'aggraver au cours de l'évolution de la MA. Ici encore, on trouve des échelles permettant d'évaluer ces troubles psycho-comportementaux et de les attribuer ou non à une MA (Davous et Delacourte, 1999).

Concernant les idées délirantes, elles sont particulièrement fréquentes dans la MA et représentent un tiers des patients. Leur prévalence augmente au cours de l'évolution de la maladie, avec une hausse de 20% la première année et de 50% dans les quatre années qui suivent le diagnostic initial. On retrouve différents types de délires comme les idées paranoïdes (infidélité conjugale, vol...), la mégalomanie, le syndrome de Capgras (dans lequel le sujet est convaincu que l'un de ses proches est un imposteur) (Fisher, 2004).

Dans la majorité des cas, ces troubles psycho-comportementaux mènent à une perte d'autonomie progressive avec l'apparition d'une démence et finalement à une institutionnalisation.

1.4 Diagnostic

Il n'existe à l'heure actuelle aucun diagnostic à proprement parler concernant la MA mais uniquement des outils pouvant porter un diagnostic probable, la certitude étant possible uniquement sur biopsie pratiquée post-mortem et peu réalisée en pratique. Cependant, ces dernières décennies ont vu naître de nouvelles techniques d'imagerie à ce jour utilisées dans la recherche et qui pourraient à terme devenir des outils diagnostiques intéressants. On citera par exemple la tomographie par émission de positons (TEP), la tomographie d'émission monophotonique (TEM) ou encore la résonance magnétique (Davous et Delacourte, 1999).

Le diagnostic probable de MA repose sur la convergence de données cliniques objectivées par des tests standardisés dont le plus connu concernant les fonctions cognitives reste le MMSE (Mini Mental State Examination) et sur lequel repose la stratégie thérapeutique actuelle. On trouve en plus du MMSE trois autres tests dont l'utilisation s'est généralisée internationalement, le CIM 10 (classification internationale des maladies), le DMS IV (Diagnostic and Statistical Manual - Revision 4), et le NINCDS/ADRDA mentionné plus haut. Le premier est une classification des pathologies connues, le second concerne les troubles psychiatriques au sens large, et le dernier énonce les critères diagnostiques de la MA.

Conjointement avec ces tests, les échelles ADL (Activities of Daily Living) et IADL (Instrumental Activities of Daily Living) permettent également une orientation diagnostique dans la mesure où elles permettent une évaluation de la dépendance des patients.

L'absence de marqueurs spécifiques rend le diagnostic de la MA impossible à l'heure actuelle, cependant de nombreuses études tentent de résoudre la question avec la mise en place d'anticorps spécifiques des lésions, permettant le dosage de protéine Tau phosphorylée et de peptides A β , pouvant orienter le diagnostic sans pour l'instant apporter de solution satisfaisante.

Dans les formes génétiques, le dosage de l'Apolipoprotéine E₄ (ApoE₄) est fréquemment utilisé mais ne constitue pas plus un test diagnostique (Dhenain et *al.*, 2002 ; Davous et Delacourte, 1999).

1.5 Traitements actuels et à venir

On trouve dans les traitements actuels de la MA des traitements spécifiques, détaillés ci-dessous, ainsi que des traitements adjuvants permettant de limiter les troubles comportementaux (neuroleptiques, antidépresseurs et autres).

1.5.1 Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe dans la MA un déficit cholinergique important dû à la dégénérescence neuronale menant à la diminution d'activité de l'acétyltransferase. Afin de restaurer la fonction cholinergique, trois molécules ont vu le jour (Rivastigmine, Donépézil et Galantamine), dont le mécanisme d'action repose sur une inhibition réversible de la dégradation de l'Acho. L'enzyme responsable de cette dégradation est l'Acétylcholinestérase (AchoE), cible de ces médicaments.

Ces médicaments seront utilisés dans les formes légères à modérées de MA, c'est-à-dire pour un MMSE supérieur à 10/30 (Recommandations de la HAS, 2011 ; Davous et Delacourte, 1999).

1.5.2 Inhibiteurs des récepteurs NMDA au glutamate

La seconde perturbation de neurotransmetteurs observable précocement dans la MA est l'activation anormale des récepteurs NMDA au glutamate. La Mémantine est un antagoniste non compétitif de ces récepteurs, permettant de rectifier cette suractivation. La Mémantine peut être utilisée dans les formes modérées à sévères de la maladie, soit pour un MMSE inférieur à 20/30.

Il n'existe pas de données sur l'utilisation conjointe d'AchoE et de la Mémantine, la monothérapie est donc recommandée quelque soit le stade évolutif (Recommandations de la HAS, 2011 ; Davous et Delacourte, 1999).

1.5.3 *Prise en charge non médicamenteuse*

Il est reconnu que ces médicaments, IAchoE et Mémantine, apportent un bénéfice faible en terme de prévention du déclin cognitif et ne sont efficaces que sur une faible proportion de patients dits répondeurs, estimés à 10% des patients atteints par la maladie. De plus, ils n'ont pas d'effet démontré sur la progression de la maladie. Réévalués par la commission de la transparence de l'ANSM en 2012, leur intérêt thérapeutique a été jugé faible et leur ASMR (Amélioration du Service Médical Rendu) a été rétrogradé de minime à nul. Ce sont de plus des médicaments aux effets indésirables non négligeables, on citera par exemple les troubles cardiovasculaires et la mauvaise tolérance digestive des IAchoE ou les troubles neuropsychiques dus à la Mémantine (Avis de la Commission de la Transparence, 2012).

La prise en charge non médicamenteuse a par ailleurs démontré un réel bénéfice. Elle est pluridisciplinaire, à la fois médicale et sociale et implique une communication entre professionnels de santé, l'objectif étant de maintenir au maximum l'autonomie du patient. La prise en charge consiste également en l'application de techniques comportementales visant à réduire les événements susceptibles de favoriser l'agitation ou l'agressivité, et à l'inverse d'éviter les comportements apathiques avec la mise en place d'ateliers thérapeutiques regroupant stimulations praxiques (activités manuelles comme l'hortithérapie), gnosiques (loto des odeurs, travail sur le goût), ou phasiques (groupe de conversation). Les activités de détente comme la marche ou l'exercice physique sont également préconisées (Pancrazi et Métais, 2005).

1.5.4 *Pistes de recherche*

A l'heure actuelle, la recherche s'applique à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de proposer de nouveaux traitements possédant une efficacité satisfaisante. Concernant les plaques amyloïdes et leur toxicité, les pistes les plus évidentes sont d'une part l'inhibition de la production de peptides A β avec pour cible la β ou la γ -sécrétase ; et d'autre part l'augmentation de sa dégradation et/ou de sa clairance. Afin d'améliorer la dégradation des peptides, il est envisageable de stimuler l'enzyme responsable, c'est par exemple ce qu'une équipe

de chercheurs est parvenue à faire en augmentant l'activité de la néprilysine après administration de somatostatine. Une piste vaccinale a également été étudiée dans le but de réduire le taux de peptides A β et a donné lieu à des essais thérapeutiques chez l'homme d'abord en 2003, pour lequel de graves effets indésirables ont interrompu l'essai, puis en 2015 avec l'essai de l'Aducanumab (anticorps monoclonal dirigé contre les peptides A β) (Sevalle , 2008 ; Viglietta et *al.*, 2016).

En outre, d'autres voies sont explorées à l'heure actuelle concernant la protéine Tau avec d'une part l'inhibition de sa phosphorylation en ciblant les kinases responsables, notamment GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) et CDK5 (Cyclin-dependent kinase 5) ; et d'autres part favoriser sa déphosphorylation à l'aide de phosphatases et de prolylismérasés spécifiques (Davous et Delacourte, 1999).

D'autres molécules sont à l'étude, notamment les anti-inflammatoires pour lutter contre la neuroinflammation associée à la MA, ou encore les protecteurs vasculaires cérébraux, pour l'heure testés sans succès (Davous et Delacourte, 1999).

1.6 Facteurs protecteurs et facteurs de risque

La MA est une pathologie complexe et multifactorielle, c'est le point sur lequel s'accordent tous les chercheurs qui différencient deux formes de la maladie, la forme familiale liée à des mutations génétiques et la forme sporadique essentiellement liée à des facteurs environnementaux (Thies et Bleier, 2013). Les divers facteurs influant positivement ou négativement sur le développement de la maladie ont pour la plupart été mis en évidence *via* des études épidémiologiques.

1.6.1 Facteurs protecteurs

Le premier de ces facteurs est un niveau élevé d'instruction, impliquant que la stimulation cognitive reste un moyen efficace de protection contre la maladie. Des conditions socio-économiques favorables seraient également un facteur protecteur selon diverses études, tout comme la pratique d'activités de loisirs (Ankiri, 2009). Dans le domaine social, les chercheurs montrent le bénéfice d'un réseau social important ainsi que de la vie de couple, les individus isolés étant plus à risque de développer une démence (Ankiri J, 2009).

Dans le domaine médicamenteux, les réactions inflammatoires semblent être en lien avec le développement de la MA et il a été mis en évidence une diminution du risque de développer la maladie avec l'usage chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). De même, les femmes consommatrices d'œstrogènes présenteraient un risque diminué de MA dans la mesure où ces derniers jouent un rôle dans la circulation cérébrale (Ankiri, 2009 ; Davous et Delacourte, 1999).

Enfin, il a été de nombreuses fois mis en évidence que le stress oxydatif, *via* la production de radicaux libres, serait un facteur accélérant la neurodégénérescence. En ce sens, la restriction énergétique dans l'alimentation serait liée à une diminution du risque de pathologies neurodégénératives. En outre, la consommation modérée de vin rouge serait également protectrice sur le développement de MA (Ankiri, 2009).

1.6.2 Facteurs de risques génétiques

Les études montrent l'implication de gènes dans le développement de la MA, mis en évidence grâce à l'étude de jumeaux monozygotes, ainsi que l'étude de cas dans la descendance de sujets Alzheimer, montrant un risque cumulatif de 5% à 70 ans et 40% à 95 ans chez les apparentés au premier degré. En outre, il n'existerait pas un seul gène responsable, mais bien plusieurs, le plus étudié étant sans doute l'APOE. L'ApoE est le constituant prédominant des lipoprotéines de haute densité (HDL en anglais) présentes dans le système nerveux central (SNC), plus particulièrement au sein des astrocytes et des cellules microgliales. Son rôle n'est pas encore totalement élucidé, mais elle semble essentielle au remodelage membranaire neuronal et jouerait un rôle dans la synaptogénèse et le maintien des connexions synaptiques. Le polymorphisme génétique de l'APOE résulte en trois allèles principaux conférant chacun à la protéine des propriétés très différentes. De nombreuses études ont prouvé que la présence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'APOE est le facteur de risque génétique le plus en faveur de conduire au développement de la MA (Kim et *al.*, 2009). Il serait présent chez 45 à 60% des sujets atteints, contre moins de 30% dans la population générale (Davous et Delacourte, 1999). Le rôle de l'APOE₄ n'est pas encore tout à fait élucidé, cependant les études semblent converger vers une interaction avec les peptides A β , suggérant une accélération de leur agrégation probablement liée à une influence sur le métabolisme de ces peptides. Une corrélation entre la densité de

plaques amyloïdes et la concentration d'APOE₄ a également été mise en évidence (Verghese et *al.*, 2013 ; Kim et *al.*, 2009).

Les autres gènes étudiés sont le gène de l'APP et les gènes de la présénile 1 et 2 (PS 1 et 2). La mutation de ces derniers entraîne un déficit partiel de fonction de la γ -sécrétase causant un clivage incomplet de l'APP et résultant en une diminution de la production de peptides A β , mais aussi très probablement responsable d'un gain de fonction toxique de la préséniline elle-même, les études avançant que la production de peptide A β n'est pas nécessaire au développement de la neurodégénérescence. Les mutations de PS1 sont plus fréquentes que celles de PS2, elles sont dominantes et retrouvées dans 80% des formes familiales de la MA. Elles entraînent des formes particulièrement agressives de la maladie qui se manifestent chez le sujet jeune, entre 25 et 50 ans (Sevalle, 2008). Les gènes de l'APP et de la PS 1 et 2 sont associés aux formes précoces de la maladie et impliquent chacun de nombreuses mutations parfois spécifiques d'une famille donnée, rendant un éventuel diagnostic irréalisable (Thies et Bleier, 2013).

Cependant, ces facteurs génétiques seuls ne sont pas suffisants pour expliquer la pathologie et ne constituent qu'un faible pourcentage de cas, suggérant l'implication de facteurs environnementaux multiples (Ankiri, 2009).

1.6.3 Facteurs de risques individuels et environnementaux

L'âge est le premier facteur de prédisposition à la MA, avec une prévalence augmentant de façon exponentielle à partir de 65 ans. Il existe également une prévalence majoritairement féminine dans la maladie.

Dans les facteurs de risque individuels peuvent être cités les antécédents de traumatisme crânien ainsi que les facteurs de risques cardiovasculaires comme l'hypertension, le diabète de type 2 ou l'hypercholestérolémie, le cerveau étant richement vascularisé (Thies et Bleier, 2013 ; Davous et Delacourte, 1999).

Parallèlement à ces facteurs liés aux conditions de vie du patient, ainsi qu'à ses antécédents médicaux, de nombreuses études tentent de mettre en évidence des facteurs de risques moins évidents, notamment l'exposition à certaines substances *via* l'alimentation ou l'air. Les substances les plus étudiées sont à ce jour les métaux lourds qui suscitent un intérêt croissant, mais aussi les pesticides, ou encore les

polluants industriels et bien d'autres encore. Ces études font actuellement l'objet d'une intense controverse, c'est pourquoi nous tenterons de comprendre leur impact dans le développement de la MA, objet de la présente thèse.

2 Les Métaux Lourds

2.1 Définition

D'après la définition donnée au congrès d'Heidelberg en 1983, les métaux lourds sont les éléments de la classification périodique dont la densité est supérieure à 5g/cm^3 (Figure 6) (Leygonie, 1993). Cependant, cette définition incomplète et imprécise englobe des éléments de natures variées et de densités plus ou moins élevées, dont certains sont jugés toxiques par les autorités sanitaires et d'autres non. On parle donc désormais préférentiellement d'éléments traces métalliques (ETM).

TABLEAU PÉRIODIQUE DES ÉLÉMENTS

Le tableau périodique des éléments est présenté avec une légende de classification par couleur :

- métaux alcalins
- alcalino-terreux
- métaux pauvres
- métaux de transition
- métalloïdes
- non-métaux
- halogènes
- gaz rares

Un encadré détaillé de l'élément Fer (Fe) est inclus, montrant :

- Masse atomique : 55.845
- Numéro atomique (nombre de protons dans le noyau) : 26
- Symbole chimique : Fe
- Nom : fer

Figure 6 - Classification périodique des éléments au 8 juin 2016 (International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC))

Les métaux lourds sont matérialisés en rouge. Concernant les éléments 104 à 118, leur densité est inconnue à l'heure actuelle.

La Commission Européenne définit dans les années 2000, les ETM dangereux pour la santé comme étant « tous composés d'antimoine, d'arsenic, de cadmium, de chrome (VI), de cuivre, de plomb, de mercure, de nickel, de sélénium, de tellure, de thallium et d'étain ainsi que ces matériaux sous forme métallique, pour autant qu'ils soient classés comme substances dangereuses », entendant sous le terme de

substance dangereuse « toute substance qui a été ou sera classée comme dangereuse par la directive 67/548/CEE ou par ses modifications ultérieures » (Décision de la commission européenne du 3 mai 2000).

Les métaux lourds sont ubiquitaires. Ils sont retrouvés à la fois dans l'air, l'eau, les sols et même dans notre alimentation.

2.2 Sources d'exposition

2.2.1 Sources aériennes

L'exposition par voie aérienne concerne les particules fines ou les gaz en suspension dans l'atmosphère. Les métaux lourds étant des éléments de la croûte terrestre, les émissions peuvent être d'une part naturelles, dues notamment à l'érosion des sols ou aux éruptions volcaniques ; et d'autre part anthropogéniques, donc liées à l'activité humaine. On citera ici la combustion (incinération des déchets, production énergétique), les activités métallurgiques (extractions minières...) et la pollution routière, responsable de la majorité du plomb (Pb) émis dans l'atmosphère (Leygonie, 1993). Les émissions de plomb sont surveillées depuis les années 1980 en France. Concernant l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le nickel (Ni) et le mercure (Hg), il a fallu attendre 2004 avant la mise en place d'une surveillance (Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer, 2014).

L'European Environment Agency (EEA) a classé en 2015 les secteurs contribuant aux émissions de trois ETM, le Mercure (Hg), le Plomb et le Cadmium (*Figure 7*).

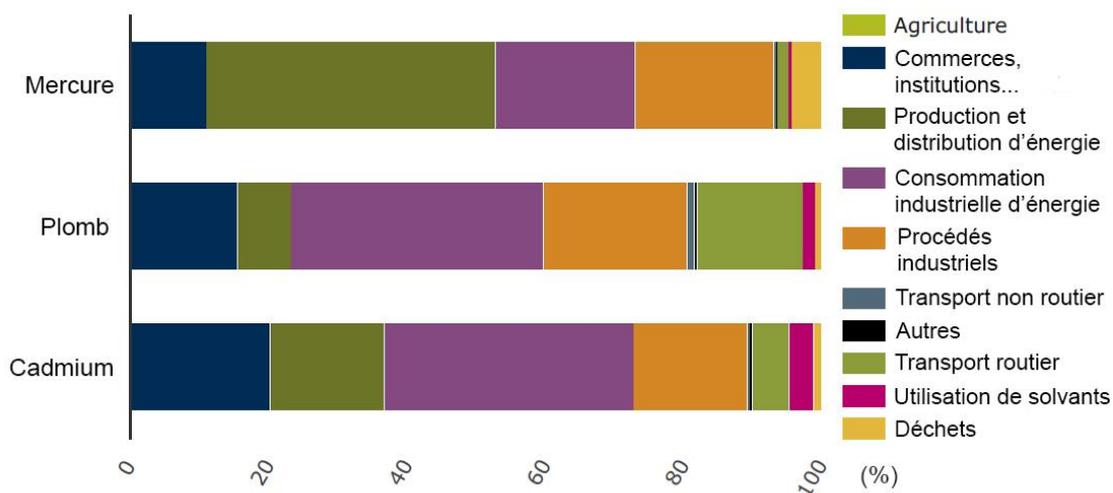


Figure 7 - Émissions de Mercure, Plomb et Cadmium, séparées par secteurs et exprimées en % (European Environmental Agency, 2015)

Les résultats montrent que la production et la distribution d'énergie sont responsables de près de 40% des émissions de Hg. Concernant le Pb et le Cd, la part des émissions la plus conséquente provient de la consommation énergétique industrielle. L'EEA rapporte également des graphes, suite à la politique de réduction des émissions, qui montrent une nette diminution entre 1990 et aujourd'hui (*Figure 8*). Cette chute des taux d'émissions de ces trois EMT est due à la mise en place de valeurs limites d'émissions ces dernières décennies en vue de la protection de l'environnement et de la santé (Rapport de l'European Environment Agency, 2015).

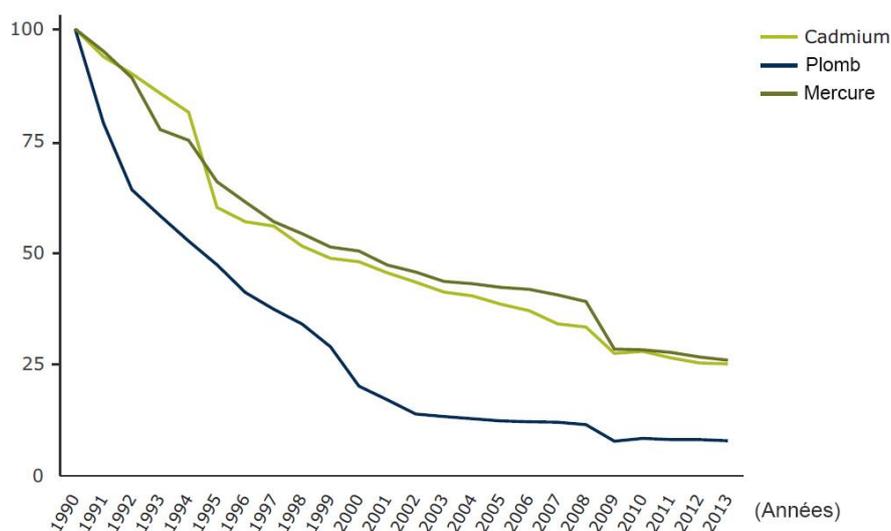


Figure 8 - Tendances des émissions de Cadmium, Plomb et Mercure de 1990 à 2013 (European Environmental Agency, 2015).

Indexation : 1990 = 100 %

En France, en termes de normes de qualité de l'air, de nouvelles valeurs cibles d'émissions annuelles de métaux lourds ont vu le jour en 2013 (*Tableau 1*). Elles concernent le Plomb, le Cadmium, l'Arsenic et le Nickel (Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, Normes de qualité de l'air, 2015).

Métaux Lourds dans l'air			
Objectif de qualité	0,25 µg/m ³		En moyenne annuelle civile
Valeur limite pour la protection de la santé humaine	Plomb	0,5 µg/m ³	En moyenne annuelle civile
Valeurs cible à compter de 2013	Arsenic	6 ng/m ³	En moyenne annuelle du contenu total de la fraction PM10
	Cadmium	5 ng/m ³	
	Nickel	20 ng/m ³	

Tableau 1 - Normes de qualité de l'air en France (Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, 2015)

PM10 (Particulate Matter 10) : particules en suspension dans l'air dont le diamètre est inférieur à 10 micromètres.

2.2.2 Sources hydriques

Les ressources en eau de la planète sont également la cible de nombreuses contaminations, notamment par les métaux lourds. Cependant, il est à noter que ces mêmes métaux lourds, en faibles quantités, sont nécessaires au fonctionnement de l'organisme, par exemple le zinc (Zn) qui participe à la stimulation du système immunitaire ainsi qu'à la croissance cellulaire, le fer (Fe), constituant majeur de l'hémoglobine, ou encore le manganèse (Mn), élément important dans le métabolisme énergétique.

Comme mentionné précédemment, les métaux lourds sont naturellement présents dans les sols et peuvent ainsi contaminer les réserves d'eau se trouvant à leur contact. De plus, les métaux présents dans l'eau sont également le résultat de l'activité humaine, notamment avec la production d'engrais et à la grande proportion de déchets industriels (issus de la fabrication de batteries, de peintures, des activités minières...) (Figure 9) (Fernández-Luqueño et al., 2013).

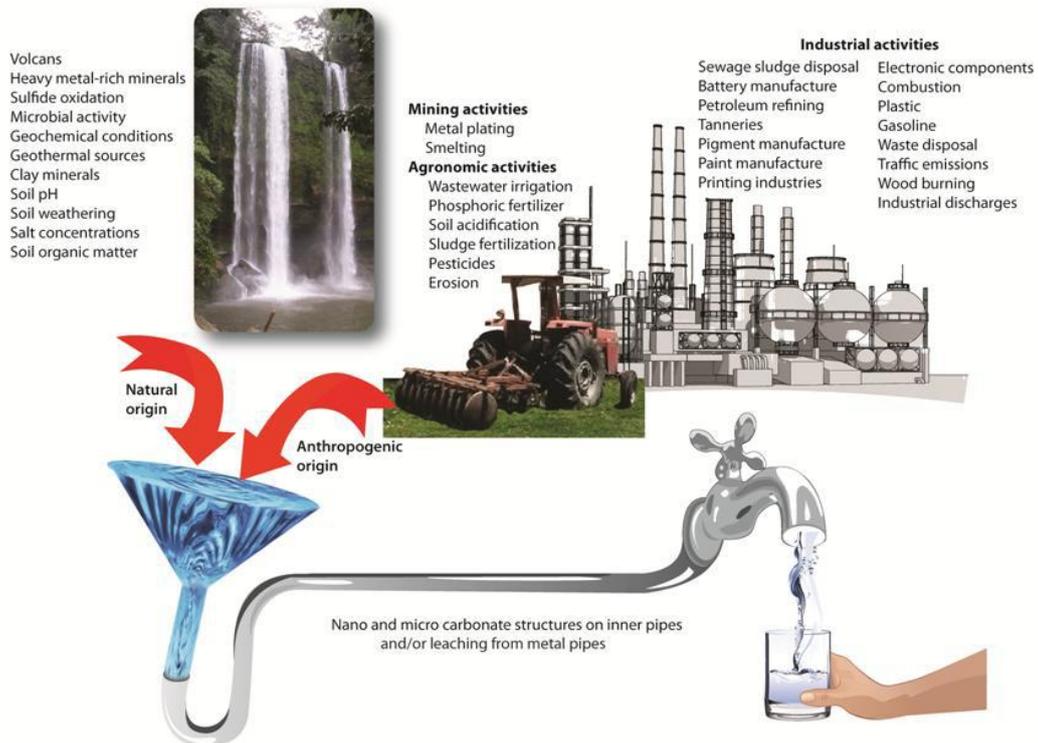


Figure 9 - Sources naturelles et anthropogéniques des métaux lourds dans l'eau (Fernández-Luqueño et al., Heavy metal pollution in drinking water - a global risk for human health : a review, African Journal of Environmental Science and Technology, 2013).

Les concentrations des ETM dans les ressources en eau sont, comme dans le cas de la pollution atmosphérique, soumises à des valeurs seuils déterminées au niveau européen en ce qui concerne la France (*Tableau 2*). Cependant, les études montrent que ces concentrations sont pour certains pays supérieures aux seuils mentionnés, et présentent donc un potentiel risque pour la santé humaine. Le tableau 2 met en évidence le fait qu'il existe de nombreuses organisations dans le monde et que les valeurs de référence ne sont pas toujours les mêmes dans différents pays. Il serait intéressant d'uniformiser ces valeurs suite à une concertation mondiale. Le danger représenté par les ETM dans l'eau de boisson pousse les chercheurs à tenter de découvrir de nouveaux moyens de filtration des métaux lourds par la mise en place de membranes échangeuses d'ions, par exemple (Fernández-Luqueño et al., 2013).

Métaux lourds	WHO	USEPA	ECE	FTP-CDW	PCRWR	ADWG	NOM-127
Antimoine	20	6	5	6	5	3	--
Argent	--	100	--	--	--	100	--
Arsenic	10	10	10	10	50	10	25
Cadmium	3	5	5	5	10	2	5
Chrome	50	100	50	50	50	50	50
Cuivre	2000	1300	2000	1000	2000	2000	2000
Fer	--	300	200	300	--	300	300
Manganèse	100	50	50	50	500	500	150
Mercure	6	2	1	1	1	1	1
Nickel	70	--	20	--	20	20	--
Plomb	10	15	10	10	50	10	10
Thallium	--	2	--	--	--	--	--
Uranium	30	30	--	20	--	17	--
Zinc	--	500	--	5000	5000	3000	5000

Tableau 2 - Guide de qualité actuel de l'eau potable concernant les métaux lourds ($\mu\text{g/L}$) selon plusieurs organisations dans le monde (Fernández-Luqueño et al., *Heavy metal pollution in drinking water - a global risk for human health : a review, African Journal of Environmental Science and Technology, 2013*).

World Health Organization (WHO 2011); United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2011); European Commission Environment (ECE, 1998); Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water (CDW), Health Canada (FTP-CDW, 2010); Pakistan Council of Research in Water (PCRWR, 2008); Australian Drinking Water Guidelines (ADWG, 2011); Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 (DOF, 1994).

2.2.3 Sources alimentaires

Les ETM peuvent également être présents tout au long de la chaîne alimentaire en raison de leur bioaccumulation dans les tissus. La pollution de l'eau entraîne donc une contamination des animaux aquatiques, mais aussi terrestres.

De plus, les cultures peuvent être contaminées à partir d'ETM présents à la fois dans l'eau et dans les sols, ou bien *via* l'utilisation de produits phytosanitaires, tels que les engrais.

Chaque année, la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) met en place la surveillance de la contamination des aliments d'origine végétale par les ETM. Lors de sa dernière

enquête en 2014, la DGCCRF a analysé près de 500 échantillons (fruits, légumes, céréales, jus de fruits...) provenant de 396 établissements différents, dont 37 seulement se sont avérés non conformes à la réglementation en vigueur et parmi lesquels 11 ont été déclarés « impropres à la consommation » en raison de leur teneur en plomb et en cadmium. Les valeurs seuils prises en compte pour cette étude ont été fixées par la Commission Européenne (*Tableau 3*) (résultats d'étude de la DGCCRF, 2014).

Denrées Alimentaires	Teneurs maximales (mg/kg de poids à l'état frais)
PLOMB	
Lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits laitiers	0,02
Viande de bovin, de mouton, de porc et de volaille (à l'exclusion des abats)	0,10
Légumes, à l'exclusion des brassicées, des légumes-feuilles, des fines herbes et des champignons	0,10
Fruits, à l'exclusion des baies et des petits fruits	0,10
CADMIUM	
Viande de bovin, de mouton, de porc et de volaille (à l'exclusion des abats)	0,05
Légumes et fruits, à l'exclusion des légumes-feuilles, des fines herbes, des champignons, des légumes-tiges, des légumes-racines et des pommes de terre	0,05
Crustacés, à l'exception de la chair brune de crabe et à l'exception de la tête et de la chair du thorax du homard et des crustacés de grande taille semblables	0,50
Céréales, à l'exclusion du son, du germe, du blé et du riz	0,10
MERCURE	
Produits de la pêche et chair musculaire de poisson. La teneur maximale s'applique aux crustacés, à l'exception de la chair brune de crabe et à l'exception de la tête et de la chair du thorax du homard et des crustacés de grande taille semblables	0,50
Compléments alimentaires	0,10

Tableau 3 -Exemples de teneurs maximales pour certains métaux lourds dans les denrées alimentaires (règlement (ce) no 1881/2006 de la Commission du 19/12/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires)

2.2.4 Amalgames dentaires

Les amalgames dentaires (ou plombages) sont majoritairement constitués de mercure sous forme métallique, celui-ci représentant 3-4% des dix-mille tonnes extraites chaque année (Chin et *al.*, 2000). Il est admis que le mercure des amalgames dentaires, en grande majorité libéré sous forme de gaz, passe en petites quantités dans l'organisme. La question est donc de savoir si ces faibles quantités de mercure, en s'accumulant au fil du temps dans l'organisme, peuvent induire des effets indésirables sur la santé (Mackert, Berglund, 1997).

Selon la revue de Grosman et Picot, la répartition géographique de la MA serait étroitement liée à celle de la maladie carieuse, et plus particulièrement à l'utilisation d'amalgames dentaires. En effet, les deux chercheurs ont découvert une prévalence de la MA bien plus importante dans les pays industrialisés, gros consommateurs de sucres, que dans les pays en voie de développement (Chandra et *al.*, 2001). De plus, le Japon est le seul pays industrialisé qui présente une faible prévalence de MA. Pour fournir une explication, ils précisent d'une part que l'alimentation y a longtemps été plus saine, moins riche en sucres, et d'autre part, que leurs amalgames dentaires à base de composites ne contiennent pas de mercure, et ce en raison de l'empoisonnement au méthylmercure qui a frappé le pays suite à une contamination industrielle (Shadlen et *al.*, 2000). L'augmentation de la prévalence de maladie carieuse au Japon ces dernières décennies ne s'est alors pas accompagnée d'une augmentation de la prévalence de MA (Grosman et Picot, 2007).

Parmi les ETM cités ci-dessus, nous reviendrons sur ceux faisant l'objet d'une attention particulière de la part des autorités sanitaires et des chercheurs.

L'aluminium fera également l'objet d'une analyse approfondie en raison de l'intérêt croissant qu'il suscite en termes de santé publique, et ce malgré le fait qu'il n'entre pas dans la définition d'un métal lourd en raison de sa faible densité. La relation entre Al et MA fait, en effet, l'objet de nombreuses polémiques depuis les années 1960. Dans les années 2000, l'étude PAQUID relance le débat en affirmant que le taux d'aluminium dans l'eau potable peut multiplier le risque de développer une MA par deux et ce pour des valeurs inférieures aux normes européennes (Rondeau et *al.*, 2000). La Direction Générale de la Santé (DGS) a par ailleurs saisi les agences

de sécurité sanitaire la même année afin d'évaluer les possibles effets de l'Al sur le corps humain et son lien éventuel avec la MA.

2.3 L'Aluminium

L'Al, troisième élément le plus abondant sur la planète, est un métal ubiquitaire. On le retrouve à l'état naturel, mais il peut aussi être ajouté intentionnellement dans l'eau, la nourriture ou encore les produits pharmaceutiques. L'utilisation de l'Al a débuté il y a plus de cent ans, mais avec l'intérêt croissant suscité par cet élément ces dernières années, notamment sur sa potentielle implication dans le développement de cancers ou de maladies neurodégénératives, des recommandations et valeurs limites ont commencé à voir le jour ces deux dernières décennies (Willhite et *al.*, 2014).

2.3.1 Sources d'exposition à l'aluminium

L'Al n'est pas considéré comme une substance dangereuse par les autorités sanitaires, ni comme un métal lourd à proprement parler. Il n'entre actuellement pas dans la définition d'un ETM. Il s'agit pourtant du métal le plus suspecté et le plus étudié dans le développement de la MA. Il est très largement utilisé dans de nombreux domaines et notamment l'industrie du bâtiment (câbles pour le transport et la distribution de l'énergie), des transports (fabrication de véhicules plus légers et moins gourmands en énergie), dans l'agroalimentaire (conservation, colorants, additifs...), pour l'emballage (conserves...), la fabrication d'ustensiles de cuisine, en pharmacie (antiacides, adjuvants de vaccins...), chirurgie (alliages dans les implants orthopédiques), en cosmétologie (antiperspirants, produits de maquillage...) ainsi que dans le traitement des eaux d'alimentation (agent clarifiant) (*Tableau 4*) (Rapport de l'InVS, 2003).

A l'état naturel, l'acidité des sols potentialise la concentration de l'Al dans les végétaux. De plus, l'Al se retrouve en fortes concentrations dans les eaux de drainage soumises aux pluies acides, cette acidité favorisant la solubilisation et le transport des sels d'Al et favorisant ainsi sa dissémination dans l'environnement (Rapport de l'InVS, 2003).

Source	Al concentration	Daily Al exposure	Estimated percentage absorbed	Daily Al absorbed (µg/kg) ^a
<i>Normal exposure</i>				
Water	Average ~70 µg/l	100 µg	0.3 ^b	0.005
Food		5000–10,000 µg ^c	0.1–0.3 ^d	0.08–0.5
Air-rural	0.2 µg/m ³	4 µg	1.5–2 from lungs ^e	0.001
			0.1–0.3 from GI tract	0.0001
Air-urban	1 µg/m ³	20 µg	1.5–2 from lungs ^e	0.006
			0.1–0.3 from GI tract	0.0006
Antiperspirants	5–7.5% ^f	50,000–75,000 µg	up to 0.012 ^g	up to 0.1
Vaccines	150–850 µg/dose	1.4–8 µg ^h	100 eventually ⁱ	0.07–0.4
<i>Elevated exposure</i>				
Antacids/phosphate Binders		up to 5,000,000 µg	0.1	80
Industrial air	25–2500 µg/m ³	250–25,000 µg per work day	1.5–2 from lungs ^e	0.6–8
			0.1–0.3 from GI tract	0.008–1
Allergy immunotherapy	150–850 µg/dose	7–40 µg ^j	100 eventually ⁱ	0.1–0.6
Dialysis solution	If tap water 50 µg/l	2400 µg	25 ^k	9
Total parenteral nutrition solutions	Neonatal/infant 110–270 µg/l ^l	11–27 µg/kg	100	11–27
	Adult 40–135 µg/l ^l	80–270 µg	100	1.2–4.2

^a Based on a 65 kg adult except for vaccines (20 kg child) and total parenteral nutrition solution in neonates and infants.

^b From table 3.

^c Pennington & Schoen (1995).

^d Estimates based on daily urinary Al excretion/daily Al intake from food and Stauber *et al.* (1999).

^e Based on Al exposure in an industrial setting: Gitelman *et al.* (1995); Pierre *et al.* (1995).

^f Based on 20% Al zirconium glycine complex or 25% Al chlorohydrate in a topical product, which are typical concentrations (POISINDEX information system, Micromedex, Inc. Englewood, CO, USA).

^g Based on Flarend *et al.* (2001), assuming that the percentage of Al absorbed does not change with repeated exposure.

^h Based on 20 injections in the first 6 years of life and an average weight of 20 kg.

ⁱ Flarend *et al.* (1997).

^j Based on a typical allergen extract treatment schedule and maintenance injections for 3.5 years of one allergen extract.

^k Kovalchik *et al.* (1978).

^l Based on maintenance fluids and normal neonatal/infant or adult electrolyte supplementation.

Tableau 4 - Sources principales d'exposition à l'Al chez l'homme (Yokel et McNamara, Aluminum toxicokinetics: an updated minireview, Pharmacology and Toxicology, 2001)

2.3.2 Toxicocinétique de l'aluminium

2.3.2.1 Absorption

Voie orale :

L'absorption intestinale de l'Al est variable selon sa solubilité, sa forme chimique, le pH, ainsi que l'alimentation. L'absorption des silicates est ainsi quasi-indétectable après ingestion alors que pour les phosphates, elle varie de 0,1 à 0,3%, et plus de 2% pour les formes organiques de l'Al (Willhite *et al.*, 2014 ; Rapport de l'InVS, 2003).

L'Al ingéré est absorbé au niveau de l'intestin grêle par diffusion passive (ne nécessitant pas d'énergie), pinocytose (type d'endocytose durant lequel une partie du liquide extracellulaire est absorbé par la cellule) et transport actif transferrine/vitamine D dépendant (nécessitant une certaine quantité d'énergie). L'absorption peut être influencée par différents facteurs. Elle est augmentée par la

Parathormone (PTH) qui stimule la production de 1,25-dihydroxycholecalciferol (1,25 DHC), ou encore la présence d'acide citrique ou autres acides organiques dans la prise alimentaire. Au contraire, elle est diminuée par la présence de phosphates dans l'alimentation en raison de la formation de complexes et la présence de fer en raison de la compétition avec les protéines de transport (Willhite et *al.*, 2014).

Voie transcutanée :

Les diverses études effectuées sur le passage transcutané de doses définies de chlorure d'Al ($AlCl_3$) durant une période déterminée montrent qu'il est négligeable, de l'ordre de 0,012% (Rapport de l'InVS, 2003 ; Willhite et *al.*, 2014). En effet, Mayeux et ses collaborateurs ont étudié les dépôts d'Al dans la couche cornée de volontaires féminins et masculins. Cette étude a été réalisée à partir de solutions plus ou moins concentrées en $AlCl_3$ appliquées sur l'avant-bras des participants et après coloration des échantillons cutanés par du Toluidine blue et de la Fuchsine. Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de différence significative d'intensité de la couche cornée après utilisation des solutions d'aluminium en comparaison avec un contrôle (eau distillée) pour une période de 1 à 7 jours (Mayeux et *al.*, 2012).

Yokel a déterminé en 2012 l'absorption transcutanée d'Al suite à l'application quotidienne de déodorants commerciaux à base d'Aluminium chlorhydrate (ACH) à 25% ou d'Aluminium zirconium glycine à 20%, celle-ci étant limitée à 0,1mg/kg/j, valeur négligeable aux vues de la quantité moyenne d'aluminium absorbée quotidiennement (Yokel et *al.*, 2001).

Voie inhalée :

Elle concerne plus particulièrement l'exposition professionnelle. Elle est négligeable chez le reste des individus, cependant, le tissu pulmonaire est exposé en permanence aux particules fines d'Al en suspension dans l'atmosphère. Il s'agit ainsi du tissu dans lequel les concentrations en Al sont les plus élevées. Les cils vibratiles présents au niveau du tractus respiratoire permettent d'évacuer une partie des particules chargées en Al, qui sont ensuite dégluties (Rapport de l'InVS, 2003).

La quantité d'Al absorbée par voie inhalée est variable selon le volume d'air, la durée, le niveau d'exposition et la taille des particules. Environ 35% de la quantité inhalée serait ainsi retenue par le tissu pulmonaire, parmi lesquels environ 4,5% seraient retrouvés dans le système sanguin (Rapport de l'InVS, 2003). Krewski et

ses collaborateurs ont déterminé que la fraction d'Al inhalée et absorbée par les travailleurs exposés serait d'environ $6\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ (Krewski et *al.*, 2007). Cependant, les chercheurs ne s'accordent pas sur une valeur exacte concernant la fraction d'Al absorbée par voie inhalée. Il est donc difficile d'obtenir une valeur moyenne cohérente. De plus, il est suggéré qu'une infime partie de l'Al inhalé pénètre le bulbe olfactif pour atteindre directement le SNC. En effet, l'administration de GELFOAM (éponge de gélatine absorbable) imprégné avec du lactate ou du chlorure d'Al dans les cavités nasales de lapins entraîne la présence de fortes concentrations en Al dans le bulbe olfactif, le cortex pyriforme, l'hippocampe et le cortex cérébral (Walton, 2013).

Il est à noter que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a abaissé en 2007, le seuil tolérable d'Al absorbé de 7 à 1 mg/kg/semaine.

2.3.2.2 Distribution

Suite à l'absorption, l'Al sous sa forme Al^{3+} se lie à la transferrine à 90%, le reste étant lié à des protéines de bas poids moléculaire (pBPM). La fraction liée à la transferrine se dépose majoritairement au niveau de la rate et du foie, organes les plus riches en récepteurs, alors que l'Al couplé aux pBPM se dépose dans le tissu osseux (Rapport de l'InVS, 2003).

2.3.2.3 Elimination

Enfin, l'Al, qui n'a pas été absorbé, est éliminé à plus de 95% dans les selles, tandis que l'Al absorbé est éliminé majoritairement par le système urinaire (> 80%). La demi-vie d'élimination dépend de la durée d'exposition et de la redistribution à partir des sites de stockage. Elle est triphasique, la demi-vie initiale étant de quelques heures, alors que la demi-vie finale peut atteindre plusieurs années (Rapport de l'InVS, 2003).

2.3.3 Mécanismes d'action de l'aluminium suggérés dans la MA

Génération de stress oxydatif et induction d'apoptose :

De nombreuses études incriminent l'ion Al^{3+} dans la toxicité de l'Aluminium. Selon la première hypothèse, il serait responsable d'un stress oxydatif conduisant à une cytotoxicité. En effet, l'Al entre en compétition avec les sites de liaison du fer au sein de la mitochondrie, notamment sur les enzymes fer-dépendantes du cycle de Krebs, ainsi que les enzymes responsables de la phosphorylation oxydative. Il en résulte une augmentation de l' α -cétoglutarate et du succinate et une diminution de la L-carnitine en raison du détournement de l' α -cétoglutarate dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS en anglais). Ces événements conduisent finalement à une déplétion en fer au sein de la mitochondrie, ainsi qu'à la génération de ROS, avec un détournement de la production d'ATP par la phosphorylation oxydative vers la voie de la glycolyse anaérobie (Mailloux et *al.*, 2011).

D'autres hypothèses avancent que la liaison de l' Al^{3+} aux phospholipides mène à une peroxydation lipidique, elle-même responsable d'une altération des membranes cellulaires. Cette oxydation mettrait en jeu la libération de cytochrome c mitochondrial au niveau du cytosol, conduisant ainsi à la formation d'ions superoxydes ainsi que de radicaux oxygénés, responsables de la génération d'un stress oxydatif.

De plus, l' Al^{3+} semblerait impliquer précocement une augmentation de la protéine p53 (facteur de transcription régulant notamment la mort cellulaire programmée ou apoptose) suivie de la translocation et d'une réactivité accrue de la protéine pro-apoptotique Bax (Bcl-2-associated X protein) dans le réticulum endoplasmique (RE), avec une perturbation du rapport Bcl-2/Bax, Bcl-2 étant lui un facteur antiapoptotique. L'activité de Bax déclenche la libération de cytochrome c, qui en formant des complexes dans le cytoplasme, active les caspases initiatrices, telles que les caspases 9 et 12, à leur tour responsables de l'activation des caspases dites effectrices, notamment la caspase 3 dont les cibles sont des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (les caspases sont des protéases dont la cascade d'activation est essentielle dans le phénomène apoptotique). L'ensemble de ces phénomènes pourrait expliquer la neurodégénérescence. En effet, le SNC est particulièrement sensible à l'oxydation dans la mesure où il s'agit d'un important

consommateur en oxygène, mais aussi en raison de son abondance en acides gras insaturés et en fer et enfin de ses capacités limitées à lutter contre l'oxydation (Ghribi et al. 2001).

Ces hypothèses restent cependant à être confirmées et ne donnent qu'un indice sur le mécanisme d'action possible de l'Al au niveau moléculaire en ce qui concerne la MA.

Effets sur les peptides A β et la protéine Tau :

D'autres approches ont cherché à déterminer l'implication de l'Al sur la formation de plaques amyloïdes. L'Al pourrait jouer un rôle dans l'agrégation des peptides A β dans la mesure où l'Al³⁺ a la capacité de se lier à ces mêmes peptides pouvant mener, selon les études *in vitro*, à des modifications conformationnelles, à une réduction de leur solubilité ou encore à leur précipitation (Kawahara et al., 2011). Exley et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer la capacité de l'Al à induire des modifications conformationnelles grâce à la spectroscopie par dichroïsme circulaire (Exley et al., 1993). Kawahara et ses collaborateurs ont par la suite découvert que l'Al³⁺ augmente la polymérisation des peptides A β et que les agrégats formés sont dissous par l'ajout de desferrioxamine *in vitro*, agent chélateur de l'Al. De plus, ils ont observé que les agrégats possédaient une forte affinité pour les membranes cellulaires neuronales notamment en raison de leur faible taux de dégradation. En effet, les modifications conformationnelles des peptides A β induites par l'Al inhibent par la suite leur dégradation par les protéases (Kawahara et al., 2011).

Il existerait également un lien probable entre l'Al et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (ENF) dans la mesure où l'Al a été retrouvé colocalisé avec les protéines Tau hyperphosphorylées dans diverses études (*Figure 10*) (Bhatia et al., 2013).

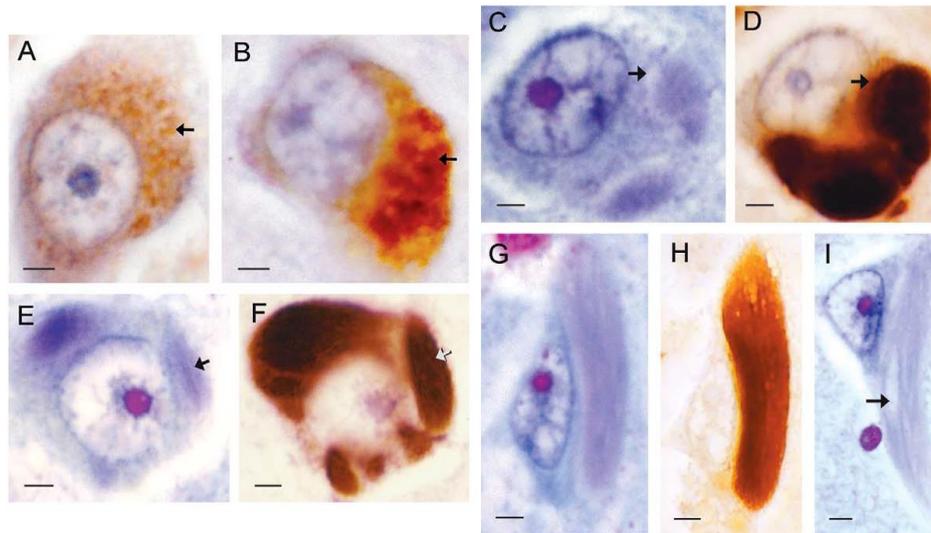


Figure 10 - Formation d'ENF dans l'hippocampe d'un patient atteint de MA (Walton JR, Evidence for participation of aluminum in neurofibrillary tangle formation and growth in Alzheimer's disease, Journal of Alzheimer's Disease, 2010)

A, B - Cellules pyramidales présentant un stade précoce d'accumulation de protéine Tau hyperphosphorylée (granules de coloration orange). La figure B montre une cellule dans un stade plus avancé avec des agrégats plus massifs. Une coloration pour l'Al est impossible sur ces stades précoces. Ces cellules sont observables chez les patients âgés atteints de démence ainsi que chez les sujets âgés ne présentant pas de maladie neurodégénérative. **C, D** - Dans un stade plus tardif, les cellules pyramidales sont positives aux protéines Tau hyperphosphorylées (coloration brune) et à l'Al (coloration violette), qui se trouvent colocalisés dans le cytoplasme. **E, F** - Ces figures présentent un stade précoce d'enchevêtrements neurofibrillaires. Là encore l'Al et les enchevêtrements sont colocalisés dans le cytoplasme de la cellule pyramidale. **G, H, I** - Ici, les cellules pyramidales présentent des ENF matures, visibles sous forme de filaments. Le noyau cellulaire a été déplacé en périphérie de la cellule en raison de la forte proportion d'ENF. Les figures G et H montrent une même cellule pyramidale où sont colocalisés l'Al et les ENF. La figure I présente une autre cellule colorée pour l'Al dans laquelle on distingue une agrégation de filaments. Ce type de cellules est répandu chez les patients atteints de MA.

L'hypothèse prédominante est que l'Al inhibe l'activité de la Protéine Phosphatase 2A (PP2A), responsable de la déphosphorylation de protéines du cytosquelette telles que Tau. Les chercheurs ont découvert que l'activité de la PP2A était effectivement réduite chez les patients atteints de MA et ont observé l'inhibition de cette protéine par l'Al à la fois *in vitro* et *in vivo* et ce à partir de faibles doses chez l'homme et les rongeurs (Figure 11). L'inactivation de la PP2A entraînerait ainsi une hyperphosphorylation de Tau et à terme la formation d'ENF (Gong et al., 2000 ; Walton, 2007).

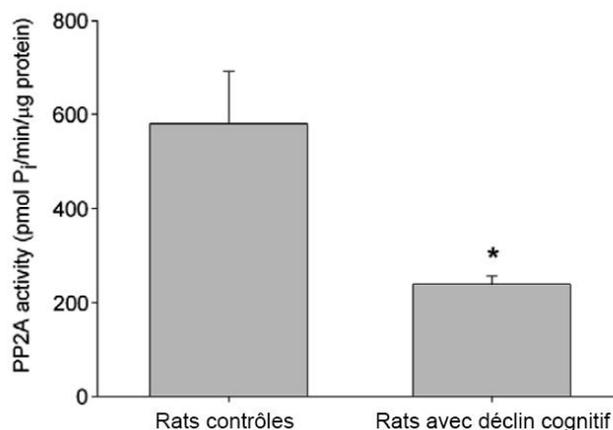


Figure 11 - Activité de la PP2A dans les tissus cérébraux de rats consommant chroniquement de l'Al (Walton JR, An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007)

Le groupe contrôle correspond à une population de rats ayant chroniquement ingéré 0,4 mg/kg/j d'Al et dont la cognition est demeurée intacte. Le second groupe correspond à une population de rats ayant consommé 1,6 mg/kg/j d'Al et dont les fonctions cognitives se sont détériorées. Ces valeurs correspondent aux doses moyennes ingérées par l'homme en région urbaine. * : $p < 0,05$, test de student bilatéral non apparié.

Yumoto et ses collaborateurs ont découvert en 2009, grâce à la Spectroscopie à rayons X, que le cœur des plaques amyloïdes était colocalisé avec l'Al, le phosphore et le cadmium (Yumoto et *al.*, 2009). De nombreux autres chercheurs ont trouvé de l'Al dans les enchevêtrements neurofibrillaires contenant la protéine Tau hyperphosphorylée dans l'hippocampe de patients Alzheimer (Good et *al.*, 1992 ; Perl et *al.*, 2006). Cependant, d'autres études n'ont pas pu démontrer de corrélation entre la présence de plaques amyloïdes et de DNF et la présence d'Al, que ce soit dans le liquide céphalorachidien (LCR) ou dans l'ensemble du cerveau (Bjertness et *al.*, 1996 ; Landsberg et *al.*, 1992 ; Makjanic et *al.* 1998). Les données de recherche varient donc largement d'une étude à une autre en raison de la diversité des méthodes et des modèles utilisés. Et il est à l'heure actuelle impossible de dire si la présence d'Al serait une cause ou une conséquence de la présence des lésions.

Par la suite, de nombreux auteurs ont déterminé les quantités d'Al dans le cerveau de patients classés en fonction de l'âge et de la présence ou pas d'une MA. Concernant des sujets exempts de MA, les quantités d'Al déterminées au niveau cérébral se situent entre 0,1 et 4,5 $\mu\text{g/g}$, avec des valeurs légèrement plus élevées chez les sujets âgés de plus de 70 ans (Exley et *al.*, 2011). Cependant, concernant la quantité d'Al cérébral chez les patients atteints de MA, les études tendent à se

contredire. Alors que Akatsu et ses collaborateurs n'ont trouvé aucune différence significative entre l'Al total contenu dans l'hippocampe et l'amygdale de patients présentant une MA et de patients exempts de démence, l'équipe d'Urban a apporté des conclusions différentes avec la découverte de concentrations en Al significativement plus élevées dans l'hippocampe des patients atteints de MA que des patients sains. Cette dernière équipe n'a cependant pas utilisé de transformation logarithmique des données et diffère donc en ce point de l'équipe précédente (Akatsu et *al.*, 2011 ; Rusina et *al.*, 2011). Il est donc difficile d'affirmer avec certitude s'il existe une augmentation significative de la quantité d'Al dans le cerveau des patients atteints de la maladie par rapport à un groupe d'adultes sains. Des études plus approfondies sont donc nécessaires. Pourtant, de nombreux auteurs ont déterminé des concentrations en Al plus élevées dans le sérum de patients atteints de MA que chez les patients contrôles, avançant l'hypothèse d'une absorption potentialisée mais dont les raisons restent inconnues ou d'une élimination moins efficace du métal due à un déclin de la fonction rénale, laissant envisager des concentrations cérébrales corrélées aux concentrations plasmatiques (Baum et *al.*, 2010 ; Moore et *al.*, 2000).

Les mécanismes d'action probables de l'Al, notamment au niveau cérébral, permettent de mieux appréhender les effets de ce métal sur le corps humain lors d'intoxications aiguës ou chroniques.

2.3.4 Intoxications aiguës et chroniques à l'aluminium

Il existe trois formes d'intoxication à l'Al. On distingue l'intoxication aiguë, subaiguë et chronique. Elles sont toutes trois bien distinctes de par leurs manifestations mais ont en commun les dysfonctionnements cérébraux qu'elles occasionnent (Walton, 2013).

La forme aiguë se manifeste pour des concentrations plasmatiques en Al de l'ordre de 500µg/L. Il en résulte une encéphalopathie qui se manifeste par des crises tonico-cloniques généralisées (qualifiées de grand mal), suivie d'un coma et du décès dans les jours voire les semaines qui suivent (Roider et *al.*, 2011 ; Shoskes et *al.*, 1992).

L'intoxication subaiguë résulte de la présence d'Al en concentrations intermédiaires dans le sang ou le LCR et ce durant plusieurs années. Ce phénomène était fréquemment observé chez les patients dialysés, dont l'élimination rénale de l'Al est insuffisante, provoquant ainsi un syndrome d'encéphalopathie (ou démence) dialytique. L'installation de ce syndrome est lente et insidieuse, les premiers symptômes ne se manifestant qu'au bout de 7 à 9 mois. Elle implique des troubles du langage allant jusqu'au mutisme, des troubles du mouvement et peut engendrer le décès (Parkinson et *al.*, 1981). A présent, l'Al a été retiré des liquides de dialyse, la concentration plasmatique en Al est suivie et l'utilisation de chélateurs de l'Al, en particulier la desferrioxamine, a été mise en place pour prévenir la survenue de cet effet indésirable chez les patients dialysés (Ackrill et *al.*, 1993). Des études ont été effectuées sur ces mêmes patients (âgés de 38 à 68 ans), dont les concentrations cérébrales en Al étaient en moyenne de 7,5 à 25 µg/g, dues aux fortes concentrations en Al plasmatique. Chez une part significative de ces patients, les chercheurs ont découvert la présence de protéine Tau hyperphosphorylée, d'enchevêtrements neurofibrillaires, ainsi qu'une immunoréactivité aux peptides Aβ (*Tableau 5*). Les lésions cérébrales découvertes chez les patients dialysés sont comparables à celles que l'on peut observer dans les stades précoces de la MA (Harrington et *al.*, 1994). L'ensemble des résultats obtenus argumente en faveur de l'hypothèse de l'Al comme cause des lésions décrites dans la MA et non comme conséquence.

Cases	Normal tau (U/g)		PHF-core tau (U/g)		Hyperphosphorylated tau proteins*	A β (ng/g)
	Grey	White	Grey	White	Grey	Grey/white
Renal dialysis patients						
1	2.2	4.0	0.00	0.25	0	1.5
2	4.4	2.0	3.08	0.60	+++	47.0
3	6.8	15.0	0.00	0.00	+	0.0
4	0.0	4.0	0.00	0.06	0	0.0
5	2.1	8.5	0.15	0.22	0	88.0
6	40.0	9.2	0.61	0.00	0	32.0
7	9.6	11.2	0.20	0.00	0	0.0
8	12.1	15.0	0.38	0.00	0	0.0
9	16.5	9.1	0.29	0.21	0	10.0
10	3.2	16.0	0.37	0.00	0	0.0
11	6.8	11.2	0.44	0.12	++	1.2
12	0.0	2.4	0.68	0.38	+	0.0
13	0.0	0.0	2.08	0.43	++	13.1
14	0.0	2.4	0.16	0.23	+	0.0
15	2.6	4.8	0.20	0.12	+	74.0
AD patients						
16	4.2	8.8	4.30	1.50	+++	142.0
17	3.0	6.2	2.70	1.70	+++	268.0
18	5.6	18.2	25.70	1.20	+++	199.0
19	2.6	9.6	51.30	2.20	+++	270.0
20	22.1	17.0	1.50	0.00	++	146.0
Control patients						
21	7.0	4.0	0.00	0.12	+	0.0
22	2.2	2.4	0.00	0.00	0	0.0
23	11.2	28.8	0.00	0.08	0	0.0
24	14.9	12.2	0.94	0.00	0	0.0
25	9.8	9.8	0.13	0.00	0	0.0
26	9.6	12.8	0.00	0.00	0	1.3

Tableau 5 - Présence de protéine Tau normale, de paires de filaments hélicoïdaux (PHF-core tau), de protéine Tau hyperphosphorylée et de peptides A β dans la substance blanche et la substance grise du cortex de patients dialysés, de patients Alzheimer et de patients contrôles (Harrington et al., Alzheimer's disease-like changes in tau protein processing: Association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients, Lancet, 1994)

L'intensité des protéines Tau hyperphosphorylée a été mise en évidence par immunoblot. D'après les études statistiques, le taux de peptides A β est significativement plus élevé chez les patients dialysés et les patients atteints de MA que chez les contrôles. Il en va de même pour le taux de protéines Tau hyperphosphorylées. 0 : absence de protéines Tau hyperphosphorylées ; + : faible présence ; ++ : présence modérée ; +++ : forte présence.

Concernant la forme d'intoxication chronique, les chercheurs suggèrent l'implication de l'Al dans les pathologies neurodégénératives, notamment la MA. Cependant, il est extrêmement complexe à l'heure actuelle d'évaluer cette toxicité chronique tout particulièrement chez l'homme. Ce point sera abordé dans la conclusion de la présente thèse. L'exposition chronique à l'Al est la plus étudiée chez certains rongeurs, notamment les rats, dont le métabolisme est proche du métabolisme humain. Des équipes de chercheurs, notamment celle de Walton en 2009, ont mis en place des études dans lesquelles les quantités en Al dans l'air, l'eau et la nourriture des rats sont contrôlées de même que les quantités

consommées et ce tout au long de leur vie à partir du moment où leur SNC est mature (à partir de 12 mois) (Walton, 2009). Dans les expériences de Walton, trois groupes de rats sont étudiés, le premier recevant de faibles doses d'Al (0,4 mg/kg/j), le second des doses intermédiaires (0,5 mg/kg/j) et le dernier des doses élevées d'Al (1,7 mg/kg/j). Seule la quantité d'Al dans l'eau était variable entre les trois groupes. Ces expériences ont été menées de manière à mimer la consommation en Al de l'homme. Les études ont montré après une longue phase prodromique, une détérioration cognitive significative chez les rats testés, que les chercheurs ont défini comme un modèle animal de MA fiable. Afin d'évaluer les capacités mnésiques des rongeurs, les chercheurs les ont entraînés à parcourir un labyrinthe en T avec récompense à partir de l'âge de 9 mois. Les capacités des rats ayant consommé de faibles doses d'Al n'ont pas décliné au cours du temps. Celles des rats consommant des doses moyennes d'Al ont décliné significativement pour 20% d'entre eux et 70% pour ceux ayant été exposés à de fortes doses d'Al, et ce de manière dose-dépendante (*Figure 12*) (Solomon et al., 2001). La durée de vie des rats a été de 30 mois en moyenne et les premiers signes cliniques ont été observés aux alentours de 28 mois, soit après environ 16 mois d'exposition chronique à l'Al, ce qui correspondrait respectivement à un âge humain de 82 ans et à une exposition de 47 ans. Les signes cliniques comprenaient confusion, troubles de l'attention et incontinence en plus des troubles mnésiques irréversibles observés (Walton, 2009 ; Everitt, 1991).

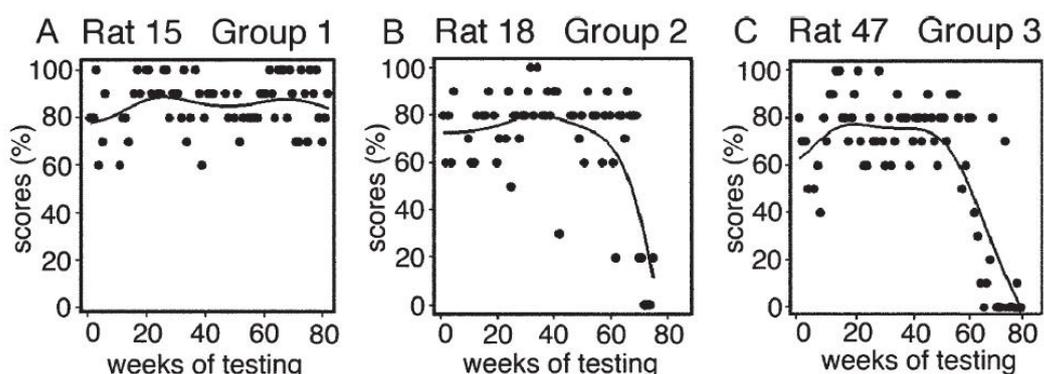


Figure 12 - Résultats des scores de réussite au labyrinthe en T de rats exposés à l'aluminium, exprimés en pourcentage d'exactitude (Solomon B, Koppel R, Jossiphov J, Immunostaining of calmodulin and aluminium in Alzheimer's disease affected brains, Brain Res Bull, 2001, vol. 55, 253-256)

Le groupe 1 (A) correspond au groupe ayant reçu les plus faibles doses d'Al (0,4 mg/kg/j), le groupe 2 (B) les doses intermédiaires (0,5 mg/kg/j) et le groupe 3 (C) les doses les plus élevées (1,7 mg/kg/j). Chaque graphe correspond à un rat de chaque groupe et chaque point à un contrôle hebdomadaire du score de réussite au labyrinthe en T.

Une coloration de Walton a permis de mettre en évidence une proportion significativement plus importante d'Al dans le cortex entorhinal des rats présentant un déclin cognitif que dans celui des rats exposés à de faibles doses d'Al (*Figure 13*). Ces derniers présentaient en moyenne 60% de cellules stellaires et pyramidales à un stade poussé d'accumulation d'Al (codifié stade IV par les chercheurs), contre seulement 23% chez les rats du groupe 1. De hautes quantités d'Al ont également été retrouvées dans d'autres types cellulaires du SNC, les régions les plus affectées étant corrélées à celles observées dans la MA chez l'homme. On citera en plus du cortex entorhinal, l'hippocampe : ces deux régions étant d'une importance particulière dans la MA (Walton, 2009).

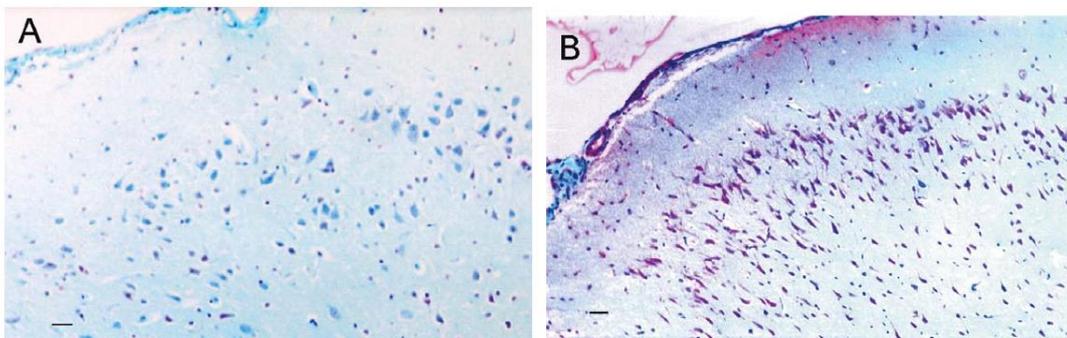


Figure 13 - Coloration de Walton pour l'Aluminium sur des coupes de cortex entorhinal de rats exposés à l'aluminium (Walton, *Aluminum's Involvement in the Progression of Alzheimer's Disease*, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2013)

La figure **A** présente le cortex entorhinal d'un rat du groupe 1 aux fonctions cognitives intactes (exposé à 0,4 mg/kg/j d'aluminium). Ici les cellules stellaires et pyramidales de la voie perforante ont une coloration bleue. La figure **B** présente le cortex entorhinal d'un rat du groupe 3 présentant un déclin cognitif (exposé à 1,7 mg/kg/j d'aluminium). La coloration violette est ici caractéristique d'une haute accumulation en Al dans les cellules stellaires et pyramidales.

Ces études ont été effectuées avec des doses d'Al correspondant à l'exposition humaine, les faibles doses administrées devant mimer la limite basse de l'exposition chez l'homme et les hautes doses devant mimer la limite haute de l'exposition. Il serait alors intéressant de connaître la méthode d'adaptation des doses aux rongeurs afin de savoir si les résultats obtenus sont transposables à l'homme. Il aurait également été nécessaire de créer un groupe contrôle n'ayant pas été exposé à l'Al afin de compléter les résultats. De plus, il aurait été plus intéressant dans le cas du test du labyrinthe de combiner les résultats de l'ensemble des rats d'un même groupe afin d'effectuer une comparaison plus juste entre les différents groupes

testés. Enfin, même si les résultats trouvés par les chercheurs sont significatifs et possiblement transposables à un modèle humain, l'absence d'études à l'échelle humaine empêche de conclure fermement quant à l'implication de l'Al dans le développement de la MA.

Tout de même, au vu de ces résultats troublants, il serait nécessaire d'accorder plus d'intérêt à ce métal, par exemple en le considérant comme un élément apparenté aux ETM dangereux selon la définition de la Commission Européenne et en le retirant ainsi de sa place marginale et peu claire.

2.4 Le Plomb

Le plomb (Pb) est un métal lourd très répandu dans la croûte terrestre, même s'il n'y est pas le métal le plus abondant. C'est l'un des premiers métaux à avoir été utilisés par l'homme, cependant nombreuses de ses applications (imprimerie, métallurgie, peintures, carburants) ont aujourd'hui été abandonnées en raison de ses propriétés toxiques (*Tableau 6*). Pourtant, malgré la limitation des utilisations du Pb, on compte encore plusieurs millions de tonnes extraits par an dans le monde, avec un danger potentiel sur la santé (Benadda, 2002).

Source	Emission tonnes/an unité
Rejets de l'activité minière et métallurgique	200
Rejets des centrales thermiques (charbon)	22
Rejets de l'industrie chimique (cristallerie, verrerie, dérivés alkylés)	10
Rejets de l'industrie chimique (câblerie, canalisation, accumulateurs)	1
Rejets d'unités d'incinération des déchets	4
Anciennes peintures	/
Circulation automobile	/

Tableau 6 - Sources anthropiques de plomb dans l'atmosphère (Chimie et Ecologie. Impact des métaux lourds sur l'homme et l'environnement - influence de la spéciation - Le cas du plomb. Pais : Chimie Ecologie, 1998)

2.4.1 Toxicocinétique du plomb

2.4.1.1 Absorption

Elle concerne majoritairement la voie orale et la voie pulmonaire. L'absorption par voie orale représente 5 à 10% du Pb ingéré pour l'adulte et jusqu'à 50% pour l'enfant (Demichele, 1984). Il existe deux mécanismes de transport à travers la barrière épithéliale du duodénum, le transport passif *via* une solubilisation dans les lipides et le transport actif empruntant les voies d'absorption saturables du calcium, du Magnésium et du Fer. Les éléments semblant favoriser l'absorption digestive du Pb sont la présence d'acides organiques, une carence en calcium, magnésium ou fer, ou encore une carence en vitamine B1. Les propriétés physico-chimiques du plomb sont également très importantes dans les mécanismes de biodisponibilité et d'action de ce métal lourd (Figure 14) (Chanel et al., 1999).

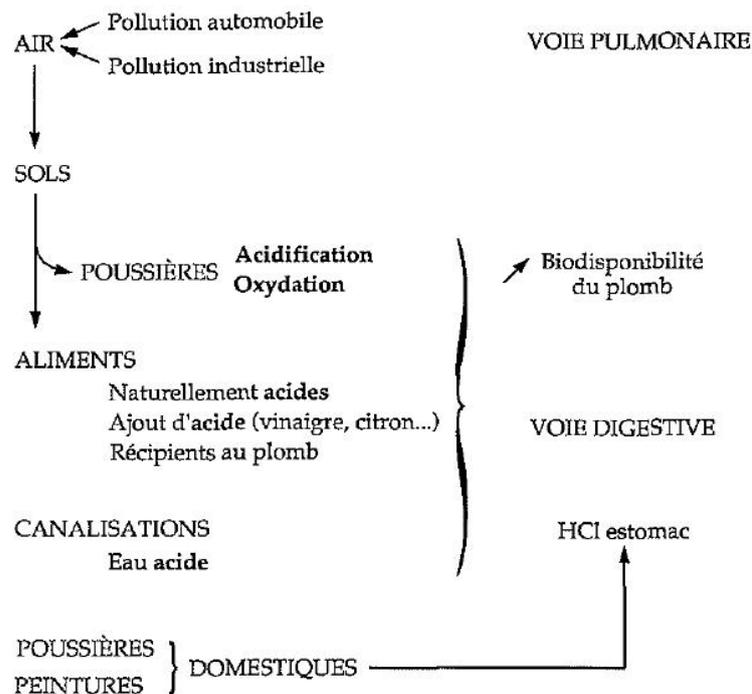


Figure 14 - Impact des propriétés physicochimiques du Pb sur sa biodisponibilité (Chanel et al., INSERM, Plomb dans l'Environnement, quels risques pour la santé ?, 1999)

Concernant la voie inhalée, 30 à 50% du Pb sont absorbés et ce en fonction de la taille des particules et de leur solubilité. Les particules les plus grosses restent piégées par le système ciliaire et sont éliminées dans les 24h, mais peuvent être dégluties (Friberg et al., 1986).

La voie cutanée concerne quant à elle uniquement le Pb organique, liposoluble, mais est très négligeable (environ 0,006%) (Botta et *al.*, 1976 ; Seux, 1994).

2.4.1.2 Distribution

Environ 90% du Pb absorbé se lie aux érythrocytes au niveau de l'hémoglobine et de la membrane cellulaire. Il est ensuite distribué aux tissus mous et dans le squelette, compartiment le plus chargé en Pb (environ 90% du Pb de l'organisme, cette fraction augmentant avec l'âge) (Demichele, 1984). Il existe un équilibre dynamique entre les différents compartiments dépendant du taux de Pb tantôt plasmatique, tantôt érythrocytaire. La répartition du Pb dans les tissus mous dépend de la voie d'absorption. Les taux intestinaux et hépatiques sont beaucoup plus élevés si l'absorption est digestive plutôt que pulmonaire (Barthelemy et *al.*, 1975). Le Pb a une bonne capacité à passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et peut donc être retrouvé dans le LCR (Bradbury et Deane, 1993). Au niveau des tissus osseux, le stockage est plus important chez l'homme que chez la femme. On distingue alors deux compartiments, l'os trabéculaire possédant un *turn-over* rapide avec une demi-vie estimée à 2,4 ans et l'os cortical dans lequel sont localisés les $\frac{3}{4}$ du Pb osseux avec un *turn-over* plus lent et dépendant de la localisation de l'os (Christofferson et *al.*, 1986).

2.4.1.3 Elimination

La demi-vie du Pb sanguin est d'une trentaine de jours (Nillson et *al.*, 1991). Cependant, le Pb lié au compartiment osseux peut atteindre une demi-vie de plusieurs décennies (jusqu'à 30 ans en moyenne) (INRS, 1998). Son relargage suite au remodelage osseux entraîne sa toxicité. L'élimination du Pb se ferait selon trois phases distinctes. La première, rapide, correspond à l'élimination de la fraction libre plasmatique. La seconde correspond à la fraction faiblement fixée, et la dernière, beaucoup plus lente, à la fraction fortement fixée notamment au niveau osseux et n'intervient que plusieurs années après les deux premières phases (Sugita, 1978). L'élimination du Pb se fait majoritairement par voie rénale (75% environ) par filtration glomérulaire. Cependant, lorsque la plombémie augmente significativement, les

chercheurs ont observé un phénomène de réabsorption tubulaire (Alessio et *al.*, 1978). Une faible fraction du Pb assimilé est éliminée par voie sudorale, voie qui peut surpasser la voie rénale en cas de fortes chaleurs. Le Pb non absorbé par voie digestive est éliminé dans les selles. Enfin, une fraction négligeable du Pb est éliminée dans les phanères, en particulier les cheveux (Thompson, 1971).

2.4.2 Mécanismes d'action du plomb suggérés dans la MA

Concernant la distribution du Pb au niveau du SNC, les études ont avancé que l'hippocampe et le système limbique, essentiels pour l'apprentissage et la mémorisation, sont la cible privilégiée du Pb. En effet, certaines études démontrent une accumulation du Pb dans ces aires, ainsi que l'apparition de déficits caractéristiques (troubles mnésiques). Le cortex préfrontal serait également une cible du Pb dans la mesure où l'exposition au Pb d'animaux de laboratoire entraîne des déficits dans des tâches liées à la mémoire spatiale, elle-même liée au cortex préfrontal. Force est de constater que l'ensemble de ces zones cérébrales fait partie des cibles principales de la MA (Chanel et *al.*, 1999).

Capacités pro-oxydantes :

Le Pb libre ionisé a la capacité de se lier réversiblement aux groupements thiols dont sont constituées les protéines et peut ainsi inhiber certaines activités enzymatiques et plus particulièrement l'acide δ -aminolévulinique déshydratase (ALAD) au niveau de la biosynthèse de l'hème qui catalyse la condensation de deux molécules d'acide δ -aminolévulinique (ALA) pour donner le porphobilinogène (PBG). Pour ce faire, le Pb entre en compétition avec le zinc au niveau du site catalytique de l'enzyme (Ahamed et Siddiqui, 2007). L'inhibition de cette enzyme entraîne ainsi une accumulation plasmatique d'ALA, elle-même très probablement corrélée aux signes cliniques observés dans l'intoxication au Pb. Il est en outre admis que l'ALA est un agent pro-oxydant responsable d'un stress oxydatif lié à la production d'ions superoxydes, eux-mêmes responsables de la production de radicaux oxygénés pouvant entraîner, entre autre, une peroxydation lipidique avec une désorganisation des membranes cellulaires (Chanel et *al.*, 1999). C'est ce qui a également été observé pour l'Al. On peut donc penser que le Pb peut lui aussi être responsable par

ses propriétés pro-oxydantes d'une mort cellulaire notamment neuronale. L'activité pro-oxydante du Pb a été mise en évidence dans de nombreuses études. Il a été démontré que l'exposition au Pb était responsable d'une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes et du Glutathion, favorisant ainsi les dommages cellulaires par les ROS (Gurer et *al.*, 1998 ; Ahamed et Siddiqui, 2007).

Perturbation de l'homéostasie calcique :

Le Pb a également la propriété d'entrer en compétition avec le calcium (Ca), altérant ainsi l'homéostasie calcique (Finkelstein et *al.*, 1998). Il agit d'une part au niveau membranaire *via* les systèmes de transport du Ca et d'autre part au niveau des divers effecteurs et récepteurs cytosoliques du Ca, altérant ainsi les mécanismes de signalisation cellulaire. Les chercheurs pensent que l'interaction du Pb avec l'ensemble des voies calcium-dépendantes serait en partie responsable de sa toxicité sur le SNC. Cependant les mécanismes par lesquels le plomb exerce ses effets neurotoxiques ne sont pas encore bien compris (Chanel et *al.*, 1999 ; Mason et *al.*, 2014).

Plusieurs hypothèses ont été étudiées quant à l'action toxique du Pb sur le SNC. La première concerne la perturbation de l'homéostasie calcique, comme vu précédemment. En effet, le calcium possède un important rôle dans de nombreux processus, notamment ceux impliqués dans l'apprentissage et la mémorisation (Simons, 1988). Il existe deux systèmes d'entrée du Ca dans les cellules neuronales, les canaux calciques voltage dépendants et les récepteurs NMDA au glutamate, essentiels à la plasticité neuronale. De nombreuses études ont démontré que ces deux types de canaux étaient inhibés par le Pb, pouvant ainsi expliquer en partie ses effets toxiques sur le SNC (Audesirk, 1993 ; Alkondon et *al.*, 1990). En plus du système glutamatergique, le Pb serait capable de perturber d'autres systèmes de neurotransmetteurs (cholinergique, GABA-ergique et dopaminergique) pour exercer sa toxicité sur le SNC (Chanel et *al.*, 1999 ; Mason et *al.*, 2014).

Phénomène d'apoptose :

Selon une autre hypothèse, le Pb pourrait être impliqué dans le phénomène d'apoptose, notamment des cellules du cervelet en entraînant une carence potassique (Oberto et *al.*, 1996). D'autre part, des chercheurs ont démontré que l'administration d'un agoniste des canaux calciques voltage dépendants diminue la

neurotoxicité du Pb, ce qui leur a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle le Ca inhiberait le phénomène apoptotique induit par le Pb (Chanel et al., 1999).

Effet sur les peptides A β :

Enfin, les études effectuées sur des modèles animaux (rats et primates) exposés au Pb durant leur croissance montrent une dérégulation de l'APP avec une augmentation d'ARN messager de cette protéine liée à un taux important de peptides A β agrégés durant les premiers mois suivant l'exposition, puis à un âge avancé en comparaison à des sujets non exposés (Figure 15) (Behl et al., 2009).

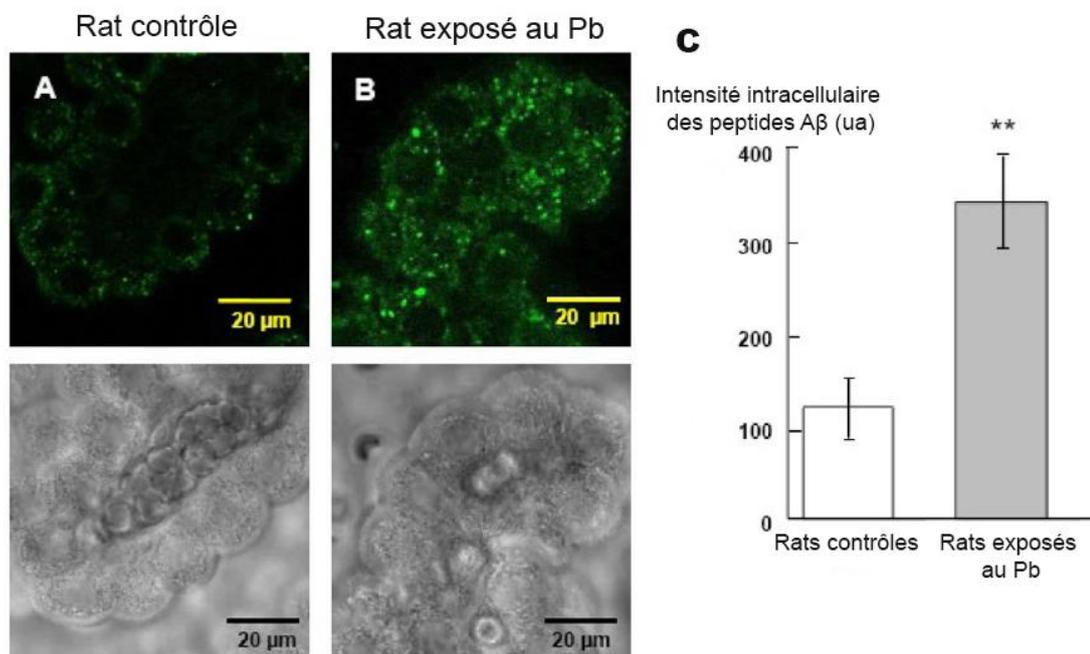


Figure 15 - Intensité intracellulaire des peptides A β dans les plexus choroïdes de rats exposés ou non au Pb (Behl et al., Increased β -amyloid Levels in the Choroid Plexus Following Lead Exposure and the Involvement of Low Density Lipoprotein Receptor Protein-1, Toxicology and Applied Pharmacology, 2009)

A – Coupe de plexus choroïde de rat non exposé au Pb (contrôle) sous microscope confocal après marquage des peptides A β par Fluorescein amidite (FAM). **B** – Coupe de plexus choroïde de rat ayant subi une exposition aiguë à 27 mg/kg de Pb sous microscope confocal après marquage des peptides A β au FAM. **C** – Intensité intracellulaire des peptides A β mesurée par cytométrie par balayage laser chez les contrôles et les rats exposés (exprimée en unité arbitraire).

Basha et ses collaborateurs ont ensuite reproduit l'expérience sur des animaux âgés exposés au Pb entre 18 et 20 mois et ont comparé les taux d'ARNm de l'APP, d'APP et de peptides A β avec ceux de contrôles. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les deux groupes, suggérant qu'une exposition

précoce serait à l'origine des modifications observées suite à l'exposition au Pb (Figure 16) (Basha et al., 2005).

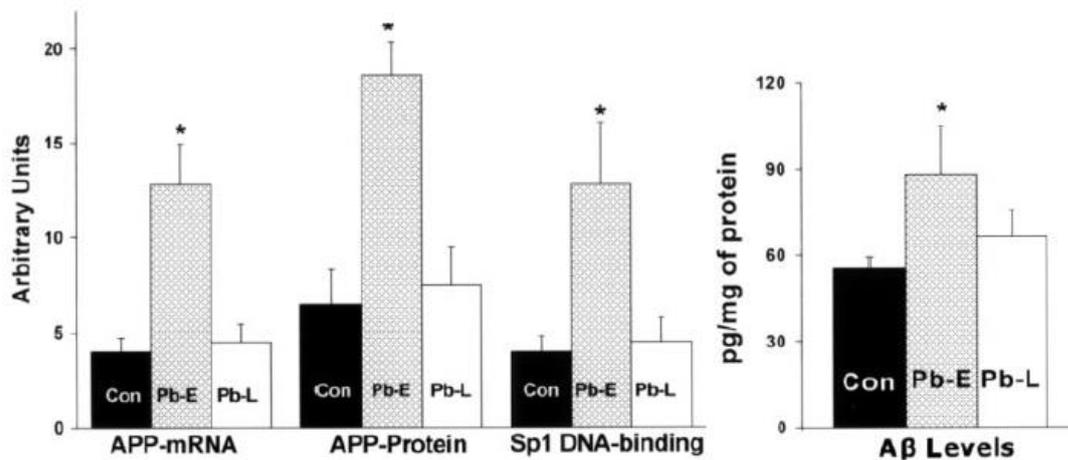


Figure 16 - Comparaison des taux d'ARNm codant pour l'APP, d'APP et de peptides Aβ chez des rats exposés au Pb (Basha et al., *The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain*, Journal of Neuroscience, 2005)

Le groupe nommé « Con » correspond au contrôle et est constitué de rats de 20 mois ayant reçu de l'eau déminéralisée. Le groupe « Pb-E » rassemble les rats exposés à de l'acétate de Pb ajouté à l'eau déminéralisée à hauteur de 200 ppm durant la période néonatale (de J1 à J20). Le groupe « Pb-L » représente les rats exposés entre 18 et 20 mois (rats considérés en sénescence) à 200 ppm d'acétate de Pb ajouté à l'eau déminéralisée. Pour tous les groupes de rats, l'eau était disponible à volonté durant l'expérience. Sp1 : Specificity protein 1, facteur de transcription impliqué dans la régulation du gène codant pour l'APP.

Chez des primates exposés durant l'enfance, les chercheurs ont observé la présence de plaques séniles. Les équipes de recherche suspectent notamment l'implication de modifications épigénétiques, c'est-à-dire des modifications dans l'expression de gènes sans changement de la séquence ADN (Chanel et al., 1999).

En conclusion, le Pb semble avoir des effets toxiques cellulaires que l'on pourrait rapprocher de la MA dans la mesure où l'exposition à ce métal lourd induit un stress oxydatif ainsi qu'un probable phénomène d'apoptose et favoriserait également l'agrégation des peptides Aβ. Cependant, les études concernant le lien entre le Pb et les peptides amyloïdes sont peu nombreuses et concernent essentiellement l'animal. L'inhibition des récepteurs NMDA au glutamate par le Pb est également cohérente dans la MA dans la mesure où la cellule peut la compenser par une suractivation de ces récepteurs. Le mécanisme d'action du Pb en lien avec cette pathologie demande donc à être élucidé à l'aide de plus amples recherches. Il serait par exemple

intéressant de renouveler l'expérience de Behl et ses collaborateurs lors d'une exposition chronique au Pb qui serait un meilleur reflet de l'exposition humaine, l'exposition aiguë étant rarissime. Il serait intéressant également d'étudier s'il existe un lien entre le Pb et la phosphorylation des protéines Tau.

2.4.3 Intoxications aiguës et chroniques au plomb

L'intoxication aiguë due à une ingestion massive de Pb inorganique (peinture par exemple) est extrêmement rare. Elle se manifeste par des troubles digestifs (douleurs, vomissements, diarrhées), suivis d'une hémolyse, d'une hépatite cytolytique et d'une atteinte tubulaire rénale. On peut également retrouver des signes d'atteinte neurologique (céphalées, agitation, délire, hallucinations), voire une encéphalopathie convulsive (Mason et *al.*, 2014).

Les études de Zawia et ses collaborateurs sur des rongeurs et primates ont montré que l'exposition au Pb chez l'animal jeune provoque des modifications cérébrales similaires à celles observées dans la MA chez le sujet âgé. Ces résultats ont placé le Pb au centre des craintes concernant les facteurs de risques de la MA après les résultats concernant l'Al (Zawia et *al.*, 2008).

Le Pb est un neurotoxique avéré, notamment chez l'enfant et ce même à faibles doses. Il est à noter que certaines situations physiologiques comme la grossesse peuvent accélérer la libération du Pb stocké au niveau osseux par augmentation du turn-over osseux en raison de la forte demande calcique, favorisant ainsi l'exposition fœtale. Le Pb altère le développement du SNC, notamment lors d'une exposition prénatale mais aussi durant l'enfance tant que le SNC est encore immature. Il affecte le Quotient Intellectuel (QI), les performances scolaires (difficultés de lecture et de compréhension, de raisonnement...) et entraîne des modifications comportementales (Chanel et *al.*, 1999 ; Mason et *al.*, 2014). Différentes méta-analyses effectuées à partir d'études transversales et longitudinales effectuées sur des enfants exposés au Pb depuis la vie fœtale démontrent qu'une augmentation de la plombémie de 100 µg/L entraîne une diminution du QI de 1 à 3 points. Cependant, la plombémie est le reflet d'une exposition actuelle au Pb et ne constitue en aucun cas le marqueur de l'exposition passée. Seule la mesure du Pb dans les dents de lait (effectuée à partir

de 6 ans en cas de troubles neuropsychiques avérés) peut refléter une exposition cumulative au Pb.

Les conclusions varient selon les études, cependant toutes démontrent une corrélation entre la plombémie et une altération dans le développement cérébral qu'il serait intéressant d'explorer plus en détails (Schwartz, 1994 ; Pocock et *al.*, 1994).

L'exposition chronique au Pb retentit également chez l'adulte, notamment suite à une exposition professionnelle. Il entraîne une diminution significative des fonctions cognitives corrélée à la quantité de Pb osseux (reflet fidèle de l'exposition chronique cumulative), mais également du QI et ce pour des plombémies inférieures 25 µg/dL, la limite acceptable de plombémie chez les travailleurs exposés se situant entre 30 et 50 µg/dL (Jan et *al.*, 2015). Les symptômes comprennent notamment des troubles mnésiques (difficultés à définir certains mots ou objets) chez les sujets de 55 ans et plus, mais aussi chez les sujets plus jeunes qui avaient été exposés à hautes quantités de Pb, le déclin cognitif semblant s'accroître au fil du temps. Des chercheurs ont également découvert un déclin des fonctions exécutives et de l'attention. Des anomalies structurelles cérébrales ont également été retrouvées chez des travailleurs exposés au Pb telles qu'une réduction du volume cérébral total, une diminution du volume de matière grise dans l'insula (partie du cortex cérébral) et le cingulum (fibres de substance blanche reliant le gyrus cingulaire à l'hippocampe) et une diminution du volume de substance blanche dans les lobes pariétaux. En cas de plombémie élevée (supérieure à 1200 µg/L), on observe un effet sur le système nerveux périphérique (SNP), moins sensible au Pb que le SNC, avec des paralysies musculaires ainsi qu'une diminution de la vitesse de conduction motrice et sensitive (Bakulski et *al.*, 2012 ; Mason et *al.*, 2014).

Les effets du Pb dépendent de nombreux facteurs incluant la quantité de Pb, la durée d'exposition ainsi que l'âge. Les résultats de l'ensemble des recherches effectuées sur l'exposition à de faibles doses de Pb semblent montrer qu'une exposition précoce (prénatale ou durant l'enfance) favorise une altération dans la croissance du SNC, responsable de modifications intellectuelles et comportementales chez l'enfant. Ces altérations seraient responsables de signes cliniques semblables à la MA, selon les résultats obtenus sur des animaux de laboratoire, notamment des primates, et ce plusieurs décennies après l'exposition.

Cependant, il apparaît qu'une partie des études transversales et longitudinales chez l'enfant n'ait pas pris en compte tous les biais et présente donc des résultats pouvant être sujets à controverse. Chez l'adulte, l'exposition chronique à de faibles doses de Pb provoque des troubles cognitifs progressifs incluant une diminution des capacités mnésiques, ainsi que des troubles de l'attention ou encore un déclin des fonctions exécutives. Autant de symptômes retrouvés chez les patients atteints de MA.

Toutefois, les mécanismes d'action de ce métal restent encore mal compris et méritent des recherches plus approfondies afin de déterminer s'il existe bel et bien un lien de causalité entre l'exposition au Pb et le développement de la MA.

2.5 Le Mercure

Le Mercure (Hg) serait le premier métal découvert par l'homme, c'est pourquoi il est retrouvé à toutes périodes de l'histoire depuis les temps anciens. Il est le seul métal liquide à température ambiante à la pression atmosphérique. C'est un métal ubiquitaire mais peu abondant dans l'environnement (majoritairement dans le cinabre, minerai constitué de sulfure de Hg). Il est pourtant considéré comme l'un des polluants environnementaux majeurs et comme le métal lourd le plus toxique, principalement en raison de la quantité de déchets due à l'activité humaine et ceux rejetés dans l'environnement. Il est actuellement largement utilisé dans les domaines de l'industrie (électrique, chimique...), de l'agriculture ou encore de la médecine (historiquement utilisé dès le XV^{ème} siècle dans le traitement de la Syphilis ; constituant des amalgames dentaires à hauteur de 30% et utilisation en tant que fongicide et antimicrobien) (*Figure 17*) (Benadda, 2002 ; Mutter et *al.*, 2010).

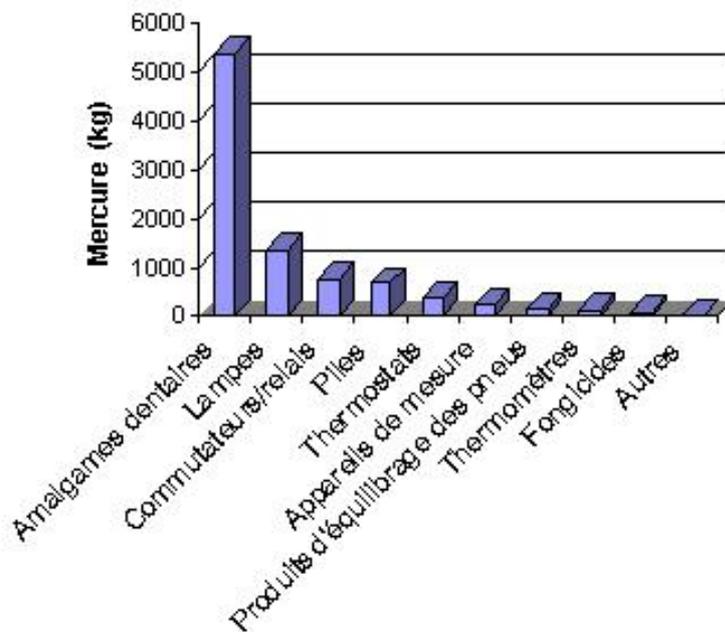


Figure 17 - Utilisations du Hg en Kg en 2003, exemple du Canada (Santé Canada)

2.5.1 Toxicocinétique du mercure

Le Hg existe sous trois formes dans l'environnement, la forme élémentaire ou métallique, la forme inorganique et la forme organique (méthyl- et éthylmercure essentiellement). Toutes trois présentent des cinétiques différentes dans l'organisme (Benadda, 2002).

2.5.1.1 Mercure métallique ou élémentaire

Le Hg élémentaire (Hg^0) est le plus volatil de tous les métaux. Il est très faiblement absorbé par voie digestive et cutanée, sauf en cas de plaie. La principale source d'absorption est donc la voie inhalée (Benadda, 2002 ; Sharma et *al.*, 2014). Très liposoluble, il est rapidement absorbé et est capable de traverser la BHE et le placenta. Environ 80% du Hg inhalé est absorbé (Clarkson et *al.*, 2006). Après absorption, il est rapidement oxydé sous forme mercurique Hg^{2+} et se lie aux groupements sulfhydryles des protéines sanguines et tissulaires, mais pas suffisamment rapidement pour prévenir son passage de la BHE. Après passage de cette barrière, il est oxydé au niveau des cellules gliales en cations mercuriques incapables de retraverser la BHE et donc piégés dans le SNC (Weiner et *al.*, 1993 ;

Grosman et *al.*, 2007). De plus, certaines études suggèrent que le Hg inhalé, comme cela semble être le cas pour l'Al, pourrait atteindre directement le SNC par voie endonasale (Benadda, 2002). Ses principaux organes de fixation sont le cerveau et le rein. Les études montrent que 6 mois après la fin de l'exposition, 20% du Hg se trouvent au niveau cérébral contre 1,5% au niveau rénal. Sa demi-vie est de 63 jours en moyenne et son élimination se réalise à la fois par voie rénale et digestive, une faible fraction étant éliminée par les poumons (Mutter et *al.*, 2010). Cependant, sa demi-vie cérébrale reste incertaine, estimée par les chercheurs à plus d'une vingtaine d'années (Sugita, 1978).

2.5.1.2 Mercure sous forme minérale

Les sels de Hg sont absorbés à 15% par voie digestive et peuvent également passer la barrière cutanée. Ces sels ayant un effet caustique sur la muqueuse digestive, une ingestion importante a pour effet d'augmenter leur biodisponibilité. Environ 90% de la fraction absorbée se fixe au niveau rénal, les 10% restants se distribuant dans le foie, la rate, la moelle osseuse, les poumons, l'intestin et les muscles. Les sels minéraux du Hg étant faiblement liposolubles, ils traversent peu la BHE et la barrière placentaire. Leur demi-vie est d'environ 40 jours (Benadda, 2002 ; Sharma et *al.*, 2014).

2.5.1.3 Mercure sous forme organique

Il est fortement liposoluble et volatil. Il est par conséquent fortement absorbé par voie digestive (80 à 90%), pulmonaire et cutanée. Sa demi-vie est en moyenne de 70 jours avec une forte variabilité interindividuelle. Son élimination se fait essentiellement par voie digestive (90%). Les dérivés alkylés comme le méthyl- et l'éthylmercure sont très stables et liposolubles, ce qui leur confère la capacité de traverser la BHE et le placenta et de s'accumuler dans les organes tels que le cerveau, le foie, les reins et dans les hématies (Benadda, 2002).

Le méthylmercure est considéré comme la forme la plus toxique du Hg du fait de son excellente liposolubilité. Il est capable de se bioaccumuler dans l'environnement, notamment au cours de la chaîne alimentaire et peut ainsi provoquer des

intoxications. La source principale de méthylmercure dans l'environnement est la biométhylation du Hg inorganique par des microorganismes à partir de sources anthropogéniques (Sharma et *al.*, 2014).

2.5.2 Mécanismes d'action du mercure suggérés dans la MA

Perturbation de l'homéostasie calcique :

La neurotoxicité du Hg est majoritairement due au méthylmercure et à sa capacité à traverser la BHE. Les chercheurs pensent que la forme qui traverse cette barrière est le méthylmercure lié à des résidus cystéine dans la mesure où ce composé possède une structure assimilable à la méthionine (acide aminé essentiel) (Zalups et *al.*, 2000). Le méthylmercure peut ainsi emprunter le transporteur des acides aminés pour traverser la BHE. Après son entrée dans le SNC, le méthylmercure subit une déméthylation et s'accumule sous forme de Hg inorganique. Il serait alors capable d'entraîner une perturbation du système glutamatergique par suractivation des récepteurs NMDA, augmentant l'influx calcique au sein des neurones. Cette augmentation rapide du taux de Ca intracellulaire pourrait alors être responsable d'un effet neurotoxique en entraînant la perturbation de la production de neurotransmetteurs et ainsi des anomalies dans le développement cérébral (Jan et *al.*, 2015).

Génération de stress oxydatif et induction d'apoptose :

Le méthylmercure possède, comme le mercure inorganique, une haute affinité pour les groupements thiol contenus dans le glutathion, la cystéine ou encore les métallothionéines (MT). C'est la raison pour laquelle on appelle aussi les groupements thiol des « mercaptans ». Le glutathion et les MT possèdent une fonction de détoxication de l'organisme contre les métaux non essentiels et de lutte contre l'oxydation. L'interaction du Hg avec les groupements thiol des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne la production de ROS avec un potentiel pro-oxydant comme pour l'Al et le Pb. Les effets pro-oxydants du méthylmercure sont notamment dus à la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) suite à l'inhibition du glutathion et de la glutathion-peroxydase. Celui-ci agit également comme un puissant

inhibiteur de l'absorption du glutamate par les astrocytes, entraînant ainsi une perturbation de l'homéostasie de ce neurotransmetteur (Mutter et al., 2010).

De plus, l'ion Hg^{2+} possède une très haute affinité pour les sélénoprotéines (constituées de sélénium), lui conférant la capacité de perturber la balance redox notamment du SNC, dans la mesure où les mécanismes antioxydants dépendent essentiellement de sélénoenzymes. La liaison aux sélénoprotéines étant quasi irréversible, cela explique l'accumulation du Hg au niveau cérébral au cours des années (Mutter et al., 2010). Il est à noter que la sélénoprotéine P est physiquement liée aux peptides $A\beta$ et aux ENF dans le SNC. Il est prouvé que le taux de sélénoprotéine P augmente avec l'âge et des chercheurs ont démontré qu'il était significativement plus élevé chez les patients atteints de MA que chez les sujets exempts de la maladie. La liaison de cations mercuriques aux sélénoprotéines, mais aussi probablement d'autres cations métalliques divalents, suggère ainsi un lien possible avec la MA (Bellinger et al., 2008).

En outre, des études ont démontré qu'il existait une corrélation entre la dose de Hg administrée *in vitro* à des cellules cancéreuses hépatiques humaines et la viabilité cellulaire (Figure 18) (Jan et al., 2015 ; Oliveri et al., 2000).

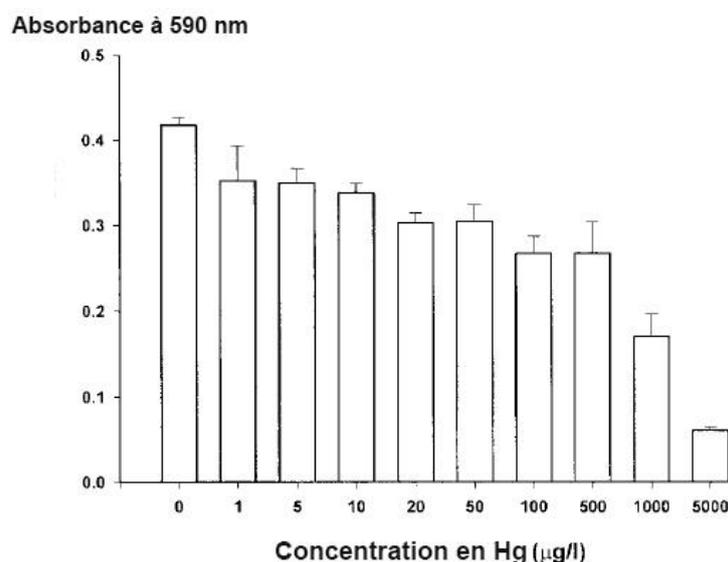


Figure 18 - Cytotoxicité induite par des concentrations croissantes en Hg évaluée par spectrophotométrie (Oliveri et al., Mercury Induces Cell Cytotoxicity and Oxidative Stress and Increases b-Amyloid Secretion and Tau Phosphorylation in SHSY5Y Neuroblastoma Cells, Journal of Neurochemistry, 2000)

Des cellules de neuroblastome SHSY5Y ont été incubées avec des concentrations croissantes de Hg inorganique (de 1 à 5000 µg/L) durant 24h. Puis du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) a été ajouté au mélange durant 6h afin de pouvoir comptabiliser les cellules vivantes. La figure montre que le Hg possède une cytotoxicité dose-dépendante.

Altération du réseau de microtubules :

La tubuline est une protéine dont la polymérisation est essentielle pour la constitution du réseau microtubulaire des cellules. Elle est constituée de groupements cystéine riches en thiols et est ainsi particulièrement sensible à l'action du Hg en raison de son affinité pour ces groupements. La liaison du Hg sur la tubuline est donc responsable de l'inhibition de la polymérisation des microtubules. En effet, le graphe de la figure 19 montre une corrélation inverse entre la concentration en Hg^{2+} et l'assemblage de la tubuline. L'inhibition de la polymérisation des microtubules par le Hg est donc concentration dépendante (*Figure 19*) (Bonacker et al., 2004).

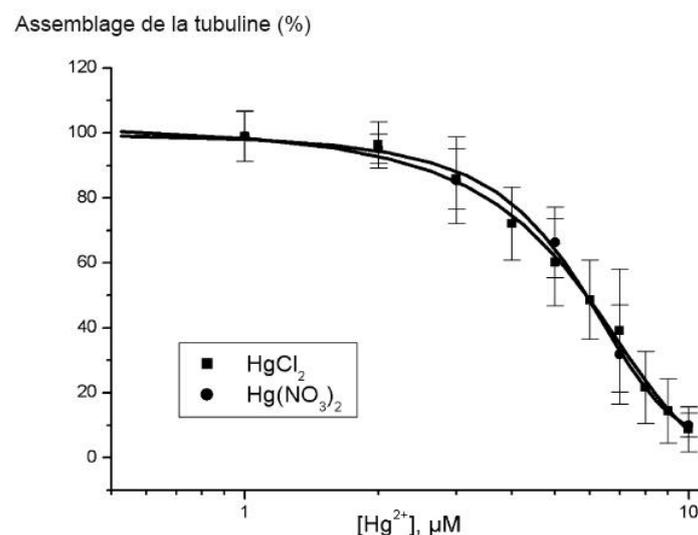


Figure 19 – Pourcentage du taux d'assemblage de la tubuline en présence de concentrations croissantes de Hg (Bonacker et al., *Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function, Arch Toxicol, Archives of Toxicology, 2004*)

Des cellules fibroblastiques V79 de poumon de hamster ont été incubées durant 18h avec des concentrations de mercure divalent entre 0 et 10 μM . Chaque point représente la moyenne de six tests individuels au minimum. Dans l'expérience, l'assemblage de la tubuline est induit par ajout de GTP (guanosine triphosphate) et ajustement de la température à 37°C. Cet assemblage est accompagné de modifications de la turbidité du milieu observables à une absorbance de 360 nm. La turbidité atteint un plateau déterminant la valeur de référence (100%) et correspondant à un équilibre assemblage/désassemblage. Cette valeur permet par la suite d'évaluer l'effet du Hg sur l'assemblage de la tubuline.

Les microtubules jouent un rôle crucial dans la migration cellulaire, la mitose, le transport cellulaire (cellules flagellées par exemple) ou encore le trafic intracellulaire. De plus, l'altération du réseau de microtubules entraîne une désorganisation du cytosquelette, phénomène qui pourrait également expliquer la neurodégénérescence observée dans la MA.

En outre, la présence de faibles quantités d'ions Hg^{2+} inhibe la phosphorylation de la tubuline essentielle à la polymérisation. Les études effectuées *in vitro* confirment l'interférence du Hg sur la polymérisation microtubulaire et montrent que cet effet est réversible suite à l'administration d'un chélateur (Grosman et *al.*, 2007 ; Mutter et *al.*, 2010).

Inhibition de la traduction de l'ARN messager :

Des études soutiennent l'hypothèse selon laquelle le Hg pourrait interférer avec la traduction de protéines impliquées dans le développement cérébral (Gruenwedel et Lu, 1970). Ils envisagent notamment que le Hg conduise à une destruction du RE et des ribosomes (responsables de la synthèse protéique) en raison d'une diminution du contenu ribosomal cellulaire suite à une exposition au Hg. Il en résulterait une altération des membranes cellulaires, une perturbation des différents neurotransmetteurs et la stimulation d'excitotoxines (hyperactivité de certains neurotransmetteurs entraînant une toxicité neuronale). Le mécanisme toxique du Hg sur le RE et les ribosomes n'est cependant pas élucidé et certains chercheurs pensent qu'il s'agit d'une toxicité indirecte due aux altérations cellulaires causées par le Hg. Les chercheurs soupçonnent également une interaction entre le Hg et la transcription de l'ADN (Blum et Manzo, 1985 ; Bernhoft, 2012).

Le méthylmercure pourrait également, selon certaines études, être associé à une altération des mécanismes de réparation de l'ADN *via* une inhibition de la dUTPase (Deoxyuridine Triphosphatase) et de l'ADN polymérase α . Cette inhibition serait médiée par l'interaction du Hg avec les structures en doigt de zinc très riches en cystéines composant leurs domaines de liaison à l'ADN. La liaison du Hg à ces structures peut alors considérablement modifier l'activité de ces enzymes, altérant ainsi les mécanismes de réparation de l'ADN comme la réparation par recombinaison homologue ou la réparation par excision de base (Cebulska-Wasilewska et *al.*, 2005). L'ADN polymérase α possède le rôle de primase, c'est-à-dire d'ARN et d'ADN polymérase capable de synthétiser des amorces nécessaires à l'initiation de la réplication de l'ADN. Il est donc probable que le Hg soit en mesure de compromettre l'activité de cette enzyme et donc le phénomène de réplication.

Interactions avec l'ApoE:

Il est admis que le facteur génétique le plus important dans la MA est le gène codant pour l'ApoE. La présence de l'allèle APOE ϵ_4 représente ainsi un risque 15 fois plus élevé de développer une MA que l'allèle APOE ϵ_3 qui est le plus répandu. Au contraire, la présence de l'allèle APOE ϵ_2 est un facteur protecteur. La différence entre ces différents allèles est la composition en acides aminés des protéines qu'ils codent. En effet, tous codent pour une séquence de 299 acides aminés avec pour seules différences les positions 112 et 158 constituées de deux arginines pour l'APOE ϵ_4 , de deux cystéines pour l'APOE ϵ_2 et d'une arginine et une cystéine pour l'APOE ϵ_3 . Sachant que la cystéine contient des groupements thiol pouvant lier les cations divalents comme le Hg $^{2+}$, mais aussi le Pb $^{2+}$ et le Cu $^{2+}$, l'hypothèse émise par les chercheurs est que les différences épidémiologiques observées pour ces trois allèles seraient dues en partie à des capacités différentes de détoxification vis-à-vis de ces métaux. La liaison du Hg $^{2+}$, mais aussi probablement d'autres métaux divalents, avec les cystéines constituerait donc un facteur protecteur contre la MA en une étape de détoxification. Cette hypothèse expliquerait pourquoi l'allèle APOE ϵ_2 codant pour une protéine contenant deux cystéines serait un facteur protecteur contre la maladie alors que l'allèle APOE ϵ_4 , codant pour une protéine dépourvue de ces deux cystéines, constituerait un facteur de risque (Mutter et *al.*, 2010).

Formation de peptides A β et hyperphosphorylation de la protéine Tau :

Des études effectuées *in vitro* montrent que le Hg entraîne, dans des lignées cellulaires de neuroblastomes, une augmentation du taux de peptides A β et de protéine Tau phosphorylée, que l'on peut retrouver au niveau cérébral dans la MA (*Figures 20 et 21*). Les peptides A β existent sous plusieurs isoformes de longueurs différentes (40 à 42 acides aminés). Le peptide A β 1-40 est le plus abondant au niveau cérébral tandis que le peptide A β 1-42 est significativement élevé dans certaines formes de MA et serait plus toxique (Schmidt et *al.*, 2009).

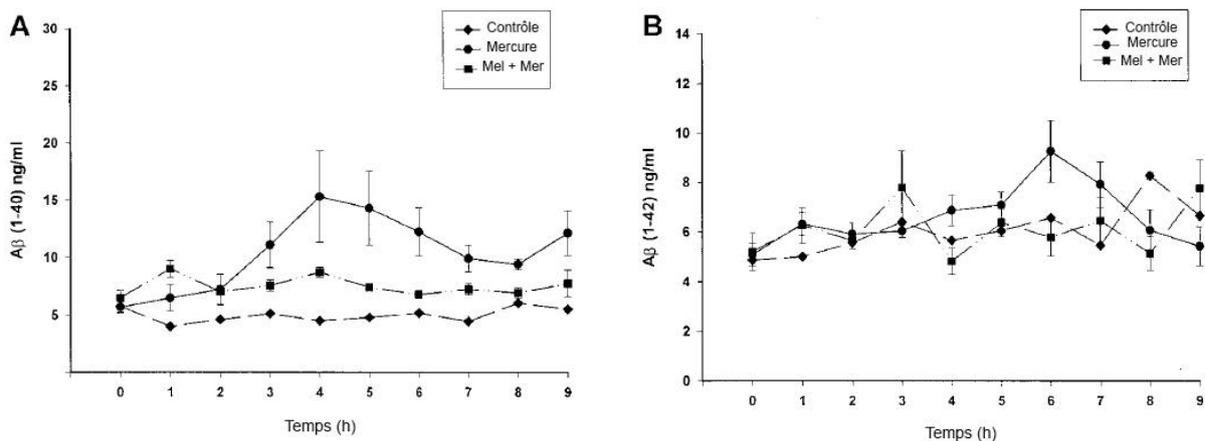


Figure 20 - Effets du Hg sur la sécrétion de peptides Aβ 1-40 et Aβ 1-42 in vitro (Olivieri et al., Mercury Induces Cell Cytotoxicity and Oxidative Stress and Increases b-Amyloid Secretion and Tau Phosphorylation in SHSY5Y Neuroblastoma Cells, Journal of Neurochemistry, 2000)

Des cellules de neuroblastome SHSY5Y ont été incubées avec du Hg inorganique à 50 µg/L, avec ou sans préincubation de 12h avec 1 µM de Mélatonine (Mel + Mer). Les taux de peptides Aβ 1-40 et Aβ 1-42 ont été déterminés par un test ELISA sandwich. **A** – Effets du Hg sur la sécrétion de peptides Aβ 1-40. **B** – Effets du Hg sur la sécrétion de peptides Aβ 1-42.

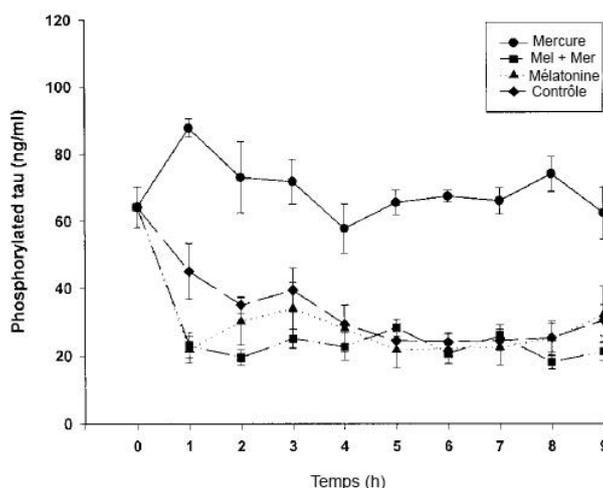


Figure 21 - Effets du Hg sur le taux de protéine Tau phosphorylée (Olivieri et al., Mercury Induces Cell Cytotoxicity and Oxidative Stress and Increases b-Amyloid Secretion and Tau Phosphorylation in SHSY5Y Neuroblastoma Cells, Journal of Neurochemistry, 2000)

Des cellules de neuroblastome SHSY5Y ont été incubées avec du Hg inorganique à 50 µg/L, avec ou sans préincubation de 12h avec 1 µM Mélatonine (Mel + Mer). Les taux de protéine Tau phosphorylée ont été déterminés à l'aide d'un test ELISA sandwich.

A partir de 3h et jusqu'à 9h d'incubation, les cellules humaines incubées avec le Hg seul présentent un taux significativement plus élevé de peptides Aβ 1-40 par rapport au contrôle et aux cellules préincubées avec la Mélatonine. Concernant les peptides Aβ 1-42, entre 4 et 6h d'incubation, leur taux est significativement plus élevé pour les cellules traitées par le mercure seul par rapport au contrôle et aux

cellules préincubées avec la Mélatonine. La mélatonine joue ici un rôle protecteur contre le mercure dans la mesure où elle possède un fort pouvoir antioxydant. En effet, les graphes montrent que la préincubation avec la mélatonine prévient l'élévation du taux de peptides A β 1-40 et 1-42 (*Figure 20*). De la même manière, les cellules incubées avec le Hg seul présentent un taux significativement plus élevé de protéine Tau phosphorylée que le contrôle et les cellules préincubées avec la mélatonine ou incubées avec la mélatonine seule (*Figure 21*) (Oliveri et *al.*, 2000).

L'effet protecteur de la mélatonine contre les capacités pro-oxydantes du Hg a été confirmé dans plusieurs études, notamment celles de Sener et Kim et leurs collaborateurs (Sener et *al.*, 2003 ; Kim et *al.*, 2000).

2.5.3 Intoxications aiguës et chroniques au mercure

Mercure métallique :

L'intoxication aiguë massive de Hg métallique sous forme de vapeurs est possible chez les travailleurs et cause préférentiellement une insuffisance respiratoire entraînant une hypoxie mais peut aussi s'accompagner de troubles neurologiques comme des tremblements, une perte de mémoire et une irritabilité qui sont généralement réversibles à l'arrêt de l'exposition (Bernhoft, 2012 ; Park et *al.*, 2012).

L'intoxication chronique dans la population générale se fait essentiellement par inhalation de vapeurs de mercure provenant d'amalgames dentaires et entraîne des dysfonctionnements du SNC. La libération du Hg sous forme de vapeurs dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels le nombre d'amalgames, leur âge et leur taille, les habitudes alimentaires ou encore le bruxisme. Des chercheurs ont en effet démontré que l'imprégnation mercurielle cérébrale est corrélée au nombre de plombages et que les teneurs cérébrales en Hg étaient significativement plus élevées chez les patients atteints de MA que chez les témoins possédant des amalgames dentaires (*Tableau 7*) (Grosman et *al.*, 2007 ; Eggleston et Nylander, 1987).

Analyse du Hg dans la substance grise		
	Contrôles	Sujets
Nombre	16	51
Nombre d'amalgames	0 - 1	5 - 14,5
Tranche d'âge	17 - 40	14 - 59
Age moyen	27,7	30
Hg (ng/g)	1,9 – 22,1	3 – 121,4
Hg moyen (ng/g)	6,70	15,21
Ecart type	5,08	18,26
Analyse du Hg dans la substance blanche		
	Contrôles	Sujets
Nombre	13	35
Nombre d'amalgames	0 - 1	5 – 14,5
Tranche d'âge	17 - 40	14 - 59
Age moyen	27,1	31,8
Hg (ng/g)	1,4 – 7,1	1,7 – 110,1
Hg moyen (ng/g)	3,80	11,22
Ecart type	1,90	18,41

Tableau 7 - Analyse des taux de Hg dans la substance blanche et la substance grise de contrôles et de sujets possédant des amalgames dentaires (Eggleston DW, Nylander M; Correlation of dental amalgam with mercury in brain tissue; Journal of Prosthetic Dentistry, 1987)

Les tissus cérébraux de patients décédés ont été prélevés lors de l'autopsie. Les contrôles ont été définis avec au maximum un amalgame dentaire et un minimum de 14 dents postérieures afin d'éliminer les extractions dentaires récentes qui auraient conduit à une mauvaise classification. Les sujets présentent au minimum 5 amalgames dentaires et 10 dents postérieures. Test unilatéral de Wilcoxon-Mann-Whitney pour la substance grise : $u = 252$; $z = 2.29$; $p < 0,011$. Test unilatéral de Wilcoxon-Mann-Whitney pour la substance blanche : $u = 105$; $z = 2.84$; $p < 0,0025$.

L'exposition à de faibles doses de Hg a montré des signes cliniques non spécifiques tels que fatigue, anorexie, faiblesse et troubles digestifs. A des doses plus élevées les premiers signes à se manifester sont des tremblements dits mercuriels. Ils sont associés à des troubles du comportement et de la personnalité, à des pertes de mémoire, des troubles du sommeil, une dépression et une fatigue et parfois des hallucinations. Dans la plupart des cas les troubles persistent malgré l'arrêt de l'exposition (Bernhoft, 2012 ; Park et al., 2012). Les études effectuées sur des travailleurs industriels exposés quotidiennement au Hg ont montré une corrélation négative entre la quantité de Hg excrétée dans les urines et les performances cognitives. Cependant, malgré le fait que les études aient toutes été menées en comparaison avec un groupe contrôle, les résultats n'étaient pas toujours significatifs. Ceci peut être dû à un manque d'harmonisation des méthodes de recherches, mais aussi à la variabilité interindividuelle d'élimination et de stockage

du Hg qui fait de l'excrétion urinaire un marqueur peu fiable de la charge mercurielle de l'organisme. Par ailleurs, d'autres équipes ont étudié les performances cognitives de travailleurs exposés 5 à 18 ans auparavant et ont trouvé des performances significativement plus faibles que celles du groupe contrôle (Frumkin et *al.*, 2001 ; Mathiesen et *al.*, 1999 ; Kishi et *al.*, 1993).

Des études effectuées parmi des dentistes et leurs personnels, exposés quotidiennement à de faibles doses de Hg, ont montré de plus faibles délais de réaction, un déficit des fonctions motrices fines, un déficit de concentration et de vocabulaire ainsi que des troubles de l'humeur. Les taux de Hg dans le sang, les urines, les ongles et les cheveux ont été significativement corrélés à l'intensité des troubles observés. Les taux sanguins n'étaient pas systématiquement corrélés avec les résultats du MMSE, cependant ce taux n'est pas un reflet fiable du Hg accumulé et stocké dans l'organisme (Bernhoft, 2012 ; Mutter et *al.*, 2010).

Mercuré minéral :

Les sels mercuriques présentent la principale forme toxique, les sels mercurieux étant très faiblement absorbés ou convertis en sels mercuriques avant absorption. L'intoxication aiguë cible généralement le tube digestif et les reins, mais également la peau en raison d'un effet corrosif. On retrouve des douleurs abdominales, vomissements et diarrhées sanglantes avec une nécrose de la muqueuse digestive pouvant causer la mort. Ces symptômes sont associés à une nécrose tubulaire rénale (Bernhoft, 2012 ; Park et *al.*, 2012).

L'intoxication chronique est rare et implique généralement une co-intoxication aux vapeurs de Hg⁰. La toxicité rénale se manifeste sous forme de nécrose tubulaire rénale ou de glomérulonéphrite autoimmune. Elle est associée à des troubles de la fonction immunitaire. Les troubles neuronaux sont moins visibles qu'avec les autres formes de Hg, les sels minéraux possédant une faible capacité à traverser la BHE (R. Bernhoft, 2012 ; Park et *al.*, 2012).

Chez l'enfant, l'exposition chronique aux sels de mercure a été observée par Warkany et Hubbard et nommée acrodynie ou pink disease. Il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité (rash cutané, hyperhydrose...) (Park et *al.*, 2012).

Mercuré organique :

L'étude de jeunes rongeurs exposés chroniquement à de faibles doses de méthylmercure dans l'eau de boisson de femelles gestantes permet de mimer l'impact du méthylmercure sur la population pédiatrique humaine. Ces études ont montré des dysfonctionnements sensoriels et moteurs (troubles de la coordination motrice ou encore de la marche), une diminution des scores aux tests de mémoire, des troubles de l'attention. Chez l'adulte, les effets du méthylmercure sont semblables à ceux observés avec le Hg élémentaire (Bisen-Hersh et *al.*, 2014).

La pollution de la baie de Minamata au Japon par le Hg dans les années 1930 a causé l'intoxication de la population locale à travers la consommation de poissons contaminés présentant de forts taux de méthylmercure. Plusieurs décennies plus tard, les chercheurs ont découvert qu'une exposition massive prénatale au méthylmercure était responsable de déficits importants chez les nouveaux nés associant une paralysie cérébrale (troubles permanents du développement du mouvement et de la posture), une microcéphalie, de sévères retards mentaux ainsi que de nombreuses malformations (Harada, 1995 ; Akagi, 1998). A de plus faibles doses, les chercheurs ont observé un retard du développement cérébral ainsi que des déficits cognitifs chez des enfants exposés *in-utero* (Grandjean et *al.*, 1997). Une exposition post-natale est responsable de paresthésies, ataxie, troubles visuels et auditifs, troubles extrapyramidaux et crises tonico-cloniques (R. Bernhoft, 2012).

En conclusion, le Hg est un neurotoxique avéré, responsable notamment d'une détérioration cognitive avec des troubles de la mémorisation ou de l'attention et de troubles comportementaux, autant de signes retrouvés dans la MA. Cependant, les études montrent également un ensemble de troubles non spécifiques chez les travailleurs exposés tels que des troubles du sommeil ou une asthénie. Les études chez l'animal et celles effectuées *in vitro* montrent un lien entre l'exposition au Hg et des modifications cérébrales retrouvées dans la MA (altération du réseau de microtubules, formation de peptides A β et hyperphosphorylation de Tau). L'action toxique du Hg reposerait notamment sur sa capacité à inhiber les enzymes clefs des mécanismes antioxydants en se liant à leurs groupements thiol ou aux sélénoprotéines, notamment au niveau du SNC qui est particulièrement sensible à l'oxydation, ce qui pourrait favoriser la neurodégénérescence. De plus, en se liant à ces groupements, le Hg peut s'accumuler au niveau cérébral et causer des

dommages similaires à ceux observés dans la MA sur le long terme. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle pas de documentation suffisante pour établir un lien de causalité entre ce facteur de risque environnemental et le développement de la maladie. De plus, les études sur l'impact des amalgames dentaires mériteraient de plus amples investigations dans la mesure où la majorité d'entre elles se basent sur des résultats obtenus sans connaissance des antécédents dentaires de patients âgés exclusivement, et présentent donc des résultats divergents et peu concluants qui sont fréquemment cités à tort pour clamer l'innocuité des amalgames. Enfin, des études comparatives sur les taux de Hg dans le sang, les urines ou les ongles de patients atteints de la MA ont été effectuées mais montrent des résultats discordants ou non significatifs en raison d'échantillons de faibles tailles ou encore des méthodes utilisées. Des études longitudinales de grande ampleur, qui n'existent pas encore à ce jour, sont donc nécessaires afin de déterminer s'il existe ou non un lien entre l'exposition chronique au Hg et le développement de la MA.

2.6 Le Cadmium

Le cadmium (Cd), découvert en 1817 par Stromeyer, est un métal ubiquitaire mais tout de même rare dans l'environnement, dans lequel il n'existe pas sous forme pure (Benadda, 2002). Il s'agit d'un métal classifié comme cancérigène chez l'homme (Nawrot et *al.*, 2006). On le trouve dans le minerai de zinc, les phosphates naturels et les minerais de cuivre et de plomb (Wang et *al.*, 2013). La majorité du Cd émis dans l'environnement provient de sources anthropiques (*Figure 22*). Son utilisation connaît un essor au début des années 80 avec une production de 20.10^3 tonnes annuelles en raison de ses propriétés anticorrosives. Pourtant, de nombreuses intoxications par des boissons ou aliments contaminés ont mis en lumière ses propriétés toxiques (Benadda, 2002). Le cas le plus célèbre reste celui du Japon avec la contamination de la rivière Zintzu après la seconde guerre mondiale ayant provoqué la contamination des cultures de riz et favorisé l'apparition d'une maladie caractérisée par des fractures spontanées et alors dénommée "Itaï-Itaï". A ce jour, il reste encore présent dans les industries (fabrication de batterie, galvanoplastie, fabrication de pigments...) mais aussi dans le tabac (Benadda, 2002). En 2010, la

CPSC (Consumer Product Safety Commission) a estimé le seuil d'exposition chronique acceptable au Cd à 0,1 µg/kg/j (Mead, 2010).

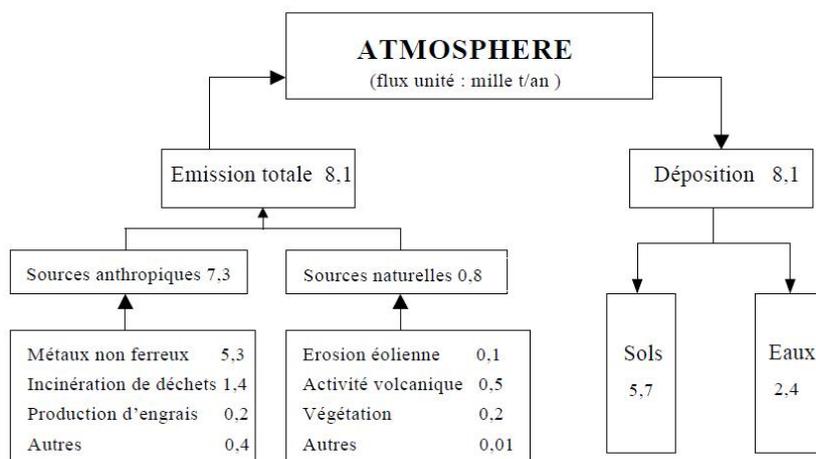


Figure 22 - Cycle géochimique du Cadmium (Benadda, Mesure des émissions et le traitement des métaux dans les fumées, 2002)

2.6.1 Toxicocinétique du cadmium

Le Cd est un élément que l'on retrouve naturellement dans le corps humain dès la vie foetale à hauteur de 1µg, puis 30 à 40mg à l'âge adulte en raison d'un phénomène de bioaccumulation (Benadda, 2002).

2.6.1.1 Absorption

Voie digestive :

Environ deux tiers du cadmium absorbé proviennent des denrées d'origine végétale et un tiers d'origine animale. Les végétaux absorbent le cadmium du sol par le biais des racines et les dépôts résultant de la pollution atmosphérique par l'intermédiaire des feuilles. L'absorption digestive est faible, de l'ordre de 3 à 7%. De nombreux facteurs peuvent influencer l'absorption du Cd, c'est par exemple le cas d'une carence en fer et d'une faible teneur en calcium ou en protéines dans l'alimentation. Chez la femme en âge de procréer, l'absorption du Cd peut atteindre 10% en raison d'un déficit fréquent en fer (Benadda, 2002 ; Kitamura et al., 1970).

Voie inhalée :

Environ 10 à 50% des particules inhalées se déposent dans les alvéoles pulmonaires, le reste étant capté par la muqueuse ciliée et dégluti. Au total, 25 à 50% du Cd serait absorbé par voie pulmonaire chez les sujets exposés. Cette absorption dépend de la taille des particules et de la solubilité des composés. Le Cd est également capable d'atteindre le SNC à travers la muqueuse nasale sans être intercepté par la BHE (Rapport ToxProbe, Toronto Public Health, 1994).

Voie cutanée :

Cette voie d'absorption est considérée comme très négligeable et n'est donc pas prise en compte (Benadda, 2002).

2.6.1.2 Distribution

La fraction absorbée est retrouvée liée à l'hémoglobine au sein des érythrocytes à 70%. Une fraction est distribuée aux organes, notamment le foie, les poumons, le pancréas, les testicules, la thyroïde, les glandes salivaires, le cœur et les artères, mais l'accumulation du Cd a principalement lieu au niveau du rein. Chez les sujets jeunes dont la BHE est encore immature (durant la vie fœtale notamment), le Cd a la capacité de pénétrer le SNC à partir du système sanguin. Chez l'adulte, une très faible fraction du Cd est capable d'atteindre le SNC en raison de la présence de la BHE, cependant les études chez l'animal montrent que le Cd est capable d'augmenter la perméabilité de cette barrière, lui permettant alors d'exercer son effet toxique également chez les sujets adultes. Il se concentre ensuite dans les plexus choroïdes (structures tapissant les ventricules cérébraux, riches en vaisseaux sanguins et responsables de la sécrétion du LCR) dans lesquels il peut atteindre des concentrations jusqu'à trois fois supérieures à celles retrouvées dans le LCR (Benadda, 2002 ; Wang et *al.*, 2013).

2.6.1.3 Elimination

Une partie du Cd absorbé est éliminée dans les selles et les urines à hauteur de 0,01 à 0,02% de la charge quotidienne totale (Nordberg et *al.*, 2007). Sa demi-vie dans le sang est de 40 à 80 jours. Cependant en raison de sa forte bioaccumulation dans les tissus et de son excrétion très lente, sa demi-vie biologique est estimée à 15-20 ans (Benadda, 2002 ; Wang et *al.*, 2013).

2.6.2 Mécanismes d'action du cadmium suggérés dans la MA

Induction de stress oxydatif et d'apoptose :

Les études menées *in vivo* montrent que l'exposition au Cd entraîne une augmentation précoce suivie d'une diminution des enzymes impliquées dans les phénomènes d'oxydoréduction au sein des microvaisseaux, notamment la glutathion peroxydase (sélénoprotéine luttant contre les radicaux libres en oxydant le glutathion), la superoxyde dismutase (catalyse la dismutation du superoxyde) et la catalase (catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène). Ces perturbations entraînent un déficit de défense et donc une plus haute sensibilité aux phénomènes pro-oxydants et aux dommages cellulaires (Shukla et *al.*, 1996).

L'exposition au Cd peut induire l'expression de certaines protéines pouvant lier les métaux lourds comme les métallothionéines, très riches en cystéine. La métallothionéine 3 (MT3) est spécifiquement retrouvée dans le SNC et en forte proportion dans les plexus choroïdes, ce qui pourrait en partie expliquer la concentration du Cd dans cette zone cérébrale particulière. Cependant, elle est déficiente chez les sujets atteints de MA. L'hypothèse énoncée par les chercheurs consiste à dire que les métallothionéines, en piégeant les ions métalliques, exercent un rôle protecteur de l'organisme face au stress oxydatif et donc contre leur neurotoxicité. L'absence de MT3 au sein du SNC des patients Alzheimer pourrait alors favoriser l'action du Cd chez ces patients et induire la mort neuronale (Mendez-Armenta et *al.*, 2003).

Enfin, des études suggèrent que l'exposition au Cd entraîne la production de ROS de manière temps et concentration dépendante, causant ainsi l'apoptose des cellules neuronales. La figure 23 montre que plus la concentration en Cd est élevée, plus on

observe de condensation nucléaire (flèches) et une réduction du nombre de cellules par apoptose. Le Cd exerce donc une toxicité concentration dépendante (Chen et al., 2008).

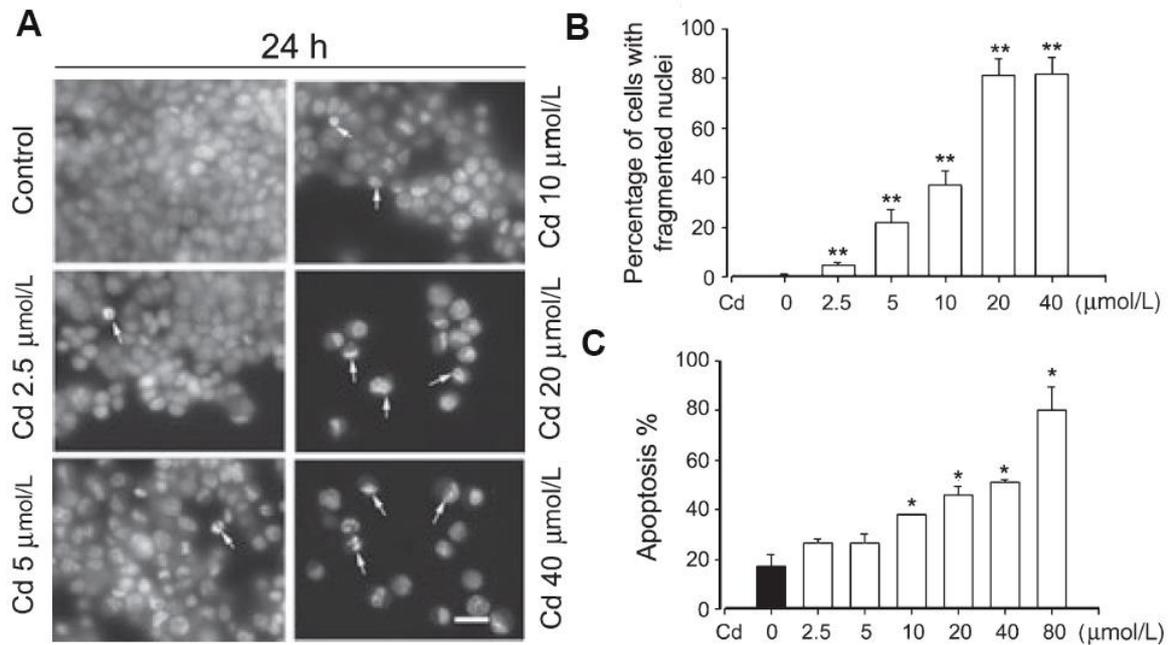


Figure 23 – Apoptose de neurones induite par le Cd (Chen et al., MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis, Journal of Neurochemistry, 2008)

Des cellules de phéocytocrome (cellules tumorales dérivées des cellules chromaffines) de rat PC12 ont été exposées à des concentrations croissantes de Cd (0 à 40 µmol/L) pendant 24h.

A – Observation des cellules exposées au Cd par microscopie à contraste de phase. Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI. **B** – Pourcentage de cellules PC12 présentant une fragmentation nucléaire en fonction de la concentration en Cd. **C** – Pourcentage de cellules en apoptose en fonction de la concentration en Cd analysé par cytométrie en flux après marquage par annexin-V-FITC et iodure de propidium. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ par test de Student.

L'apoptose des cellules neuronales serait due à la capacité du Cd à interférer avec les voies de survie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin).

Il existe plusieurs types de protéines appartenant à la famille des MAPK et ayant des rôles très différents dans l'organisme. Erk1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1/2) est activée en aval de facteurs de croissance ou de facteurs mitogènes et participe ainsi à la différenciation, à la croissance et à la survie cellulaire. A l'inverse, les kinases JNK (c-Jun N-terminal kinases) et p38 sont préférentiellement activées par le stress oxydatif et certaines cytokines, résultant notamment en des processus inflammatoires et en phénomènes apoptotiques (Fan et Chambers, 2001) (Figure 24). En effet, en plus du rôle p38 dans la survie et la prolifération cellulaire,

elle peut également dans certaines conditions favoriser l'apoptose (Vachon, 2006). Le Cd a la capacité d'activer, par des mécanismes encore inconnus, les trois types d'effecteurs de la voie des MAPK de manière concentration dépendante (Chen et *al.*, 2008). Cette activation diffère en fonction des types cellulaires concernés et pourrait donc favoriser la mort neuronale par apoptose.

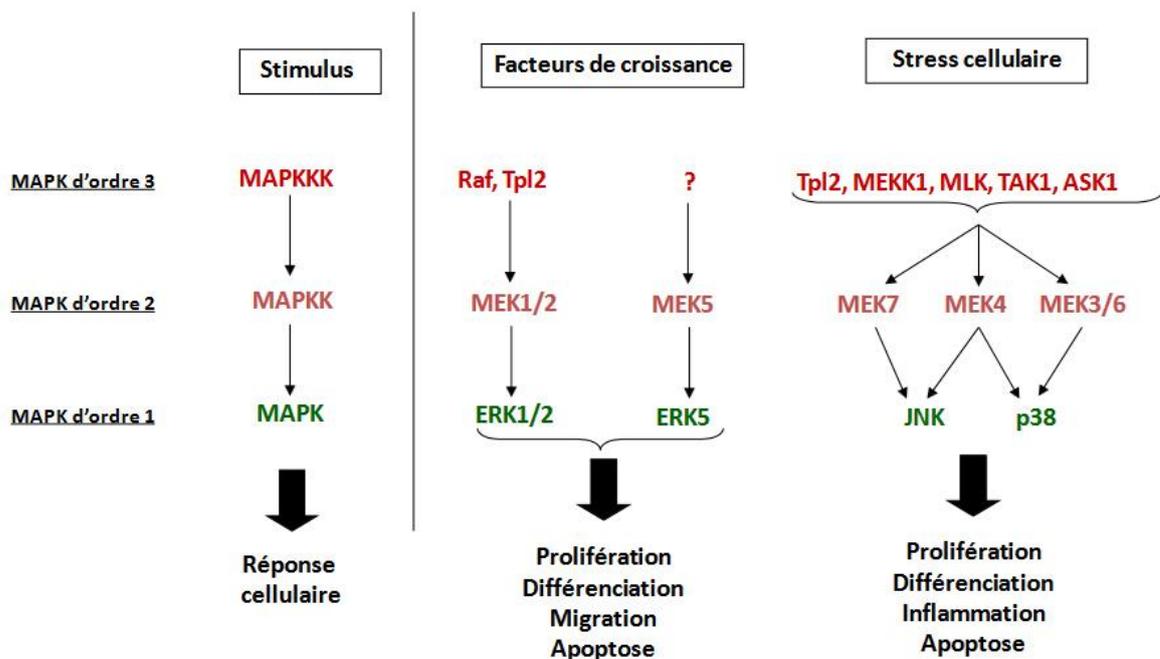


Figure 24 - Schématisation des effecteurs de la voie des MAPK chez les mammifères (Châtel, Voies de signalisation des MAP kinases et apoptose chez l'éponge *Suberites domuncula* et la moule *Mytilus galloprovincialis*, Ecotoxicologie, Université de Bretagne occidentale, 2009)

La kinase mTOR est quant à elle un facteur bien identifié dans le contrôle de la prolifération, de la croissance et de la survie cellulaire. mTOR régule de nombreux effecteurs eux-mêmes dérégulés par le Cd, ce qui suggère que le Cd pourrait exercer son activité cytotoxique en ciblant les voies de signalisation mTOR et ainsi conduire à une neurodégénérescence (Chen et *al.*, 2008). Les mécanismes par lesquels le Cd interfère avec la voie mTOR sont cependant inconnus et mériteraient plus d'intérêt.

Interaction avec d'autres métaux :

Les neurones corticaux font partie des cibles du Cd au sein du SNC et les données issues de la recherche montrent que l'apoptose de ces neurones induite par le Cd est médiée par la signalisation mitochondriale Ca-dépendante et implique la voie des caspases (Xu et *al.*, 2011). Le Cd exerce donc ici sa toxicité en dérégulant l'homéostasie calcique, primordiale pour tous types cellulaires dans le domaine de la signalisation, prolifération, différenciation et mort cellulaire. Les chercheurs suggèrent que l'interaction serait due à un blocage de l'influx calcique intracellulaire par le Cd mais les mécanismes exacts n'ont pas encore été clairement identifiés et méritent plus ample attention (Wang et *al.*, 2013).

Le Cd peut également modifier l'homéostasie du Zinc (Zn) dans la mesure où les cations Cd^{2+} et Zn^{2+} partagent une taille et une charge similaire. Ainsi le Cd peut inhiber l'absorption cellulaire du Zn en entrant en compétition pour ses systèmes de transport cérébraux. Etant donné que la BHE est peu perméable au Cd, il est possible que son interaction avec le SCN soit indirecte et s'effectue à partir d'une perturbation de l'homéostasie zincique. De plus, MT3 qui est majoritairement présente dans le SNC est très riche en Zn et est absente dans le cerveau des patients atteints de MA. Ceci suggère que la perturbation de l'homéostasie zincique par le Cd pourrait être en partie responsable du défaut de MT3 dans le cerveau des sujets atteints de MA, favorisant ainsi l'action toxique du Cd (Gupta et Shukla, 1996 ; Jin et *al.*, 1998).

Perturbation de la neurogénèse :

Certains chercheurs pensent que le Cd est capable de perturber la neurogénèse et d'entraîner la mort neuronale en réduisant la différenciation cellulaire et l'axogénèse (Son et *al.*, 2011). Des études sur des cellules progénitrices neuronales humaines et murines exposées à des concentrations en Cd de 0.001 à 100 μM ont montré une viabilité cellulaire réduite d'au moins 50% dans les deux cas par rapport aux contrôles. Cependant, les mécanismes de neurogénèse étant très complexes et impliquant une multitude de cibles potentielles, il est à ce jour impossible de préciser quel est le mécanisme d'action toxique du Cd sur cette dernière (Culbreth et *al.*, 2012).

L'exposition au Cd avant la naissance pourrait modifier l'expression de gènes menant à une altération du développement du SNC. Chez le poisson zèbre (*Danio*

rerio), des embryons exposés au Cd possèdent une différenciation diminuée des neurones et des cellules gliales due à une diminution d'expression du gène zn-12 (codant pour une protéine en doigt de zinc). Une diminution de la transcription des gènes *ngn1* et *neuroD* impliqués dans la neurogénèse a également été observée chez cette espèce (Chow et *al.*, 2008). De plus, certains gènes spécifiques du SNC sont régulés par les taux sériques en hormones thyroïdiennes. C'est notamment le cas de la neurogranine et de la MBP (Myelin Basic Protein). L'exposition au Cd est capable d'influencer les hormones thyroïdiennes, pouvant ainsi altérer indirectement l'expression de ces gènes (Farsetti et *al.*, 1991).

Modifications épigénétiques :

Concernant l'épigénétique, des études ont montré qu'une exposition prolongée au Cd pouvait influencer sur le phénomène de méthylation de l'ADN. Cela pourrait être dû à un impact négatif du stress oxydatif sur les méthyltransférases et leur action sur l'ADN selon les chercheurs. Il est donc probable que d'autres métaux lourds exercent le même impact sur la méthylation de l'ADN, la plupart d'entre eux étant responsable d'un stress oxydatif (Takiguchi et *al.*, 2003 ; Valinluck et *al.*, 2004). Trois études effectuées chez l'homme ont mis en évidence un lien entre l'exposition périconceptionnelle au Cd dans l'alimentation et une hypométhylation d'une séquence répétée d'ADN nommée LINE-1 (human long interspersed nuclear element 1) dans le sang de cordon. Les chercheurs pensent que l'hypométhylation de LINE-1 est responsable d'une instabilité génomique due à l'altération de l'expression de certains gènes, ainsi qu'à des modifications dans l'organisation de la chromatine, ces anomalies pouvant avoir un impact dans la vie adulte (Romanish et *al.*, 2010). Cependant, ces études s'appuient sur des questionnaires afin de déterminer la quantité de Cd ingérée et rendent les résultats imprécis et discutables. D'autres chercheurs ont découvert un lien entre le Cd et la méthylation de gènes impliqués dans la mort cellulaire, comme PRR13 (Proline Rich 13), avec une expression augmentée de ces gènes chez les individus de sexe masculin qui n'est pas retrouvée chez le sexe opposé. Concernant les études chez l'animal, celles effectuées sur des embryons de poulet ont montré un taux global de méthylation de l'ADN diminué suite à l'administration de Cd par rapport à un groupe contrôle, accompagné d'une diminution du taux de méthyltransférases, également confirmé *in vitro* (Doi et *al.*, 2011). Par la suite, les travaux effectués sur des rats présentent des résultats

opposés en fonction du sexe, ce qui est retrouvé dans certaines études chez l'homme, laissant penser que les effets du Cd sur l'organisme peuvent différer en fonction du sexe des individus (Vilahur et *al.*, 2015).

Ces hypothèses méritent donc une analyse plus approfondie étant donnée l'importance de la méthylation dans le développement neuronal.

Influence sur les neurotransmetteurs :

Plusieurs équipes ont étudié l'influence du Cd sur les différents systèmes de neurotransmission. Des études sur le rat ont démontré qu'une exposition à de faibles doses de Cd sur le long terme (5 mois) *via* l'alimentation entraîne une augmentation de l'activité de l'AchoE, donc un déficit de transmission cholinergique (Gonçalves et *al.*, 2012). Dans la figure 25, les mesures de l'activité de l'AchoE ne montrent pas de différences significatives dans le cortex cérébral des différents groupes après traitement au Cd (A), cependant dans l'hippocampe (B), l'hypothalamus (C), le cervelet (D) et le striatum (E), une augmentation significative de l'activité de l'AchoE est retrouvée en présence de certaines concentrations en Cd rapport aux contrôles.

Ces résultats rappellent le déficit en Acho chez les patients atteints de la MA que l'on traite par un IAchoE et présentent un intérêt certain dans la compréhension de la maladie (Gonçalves et *al.*, 2012). De plus amples études sont donc nécessaires afin de comprendre l'impact du Cd sur le système cholinergique.

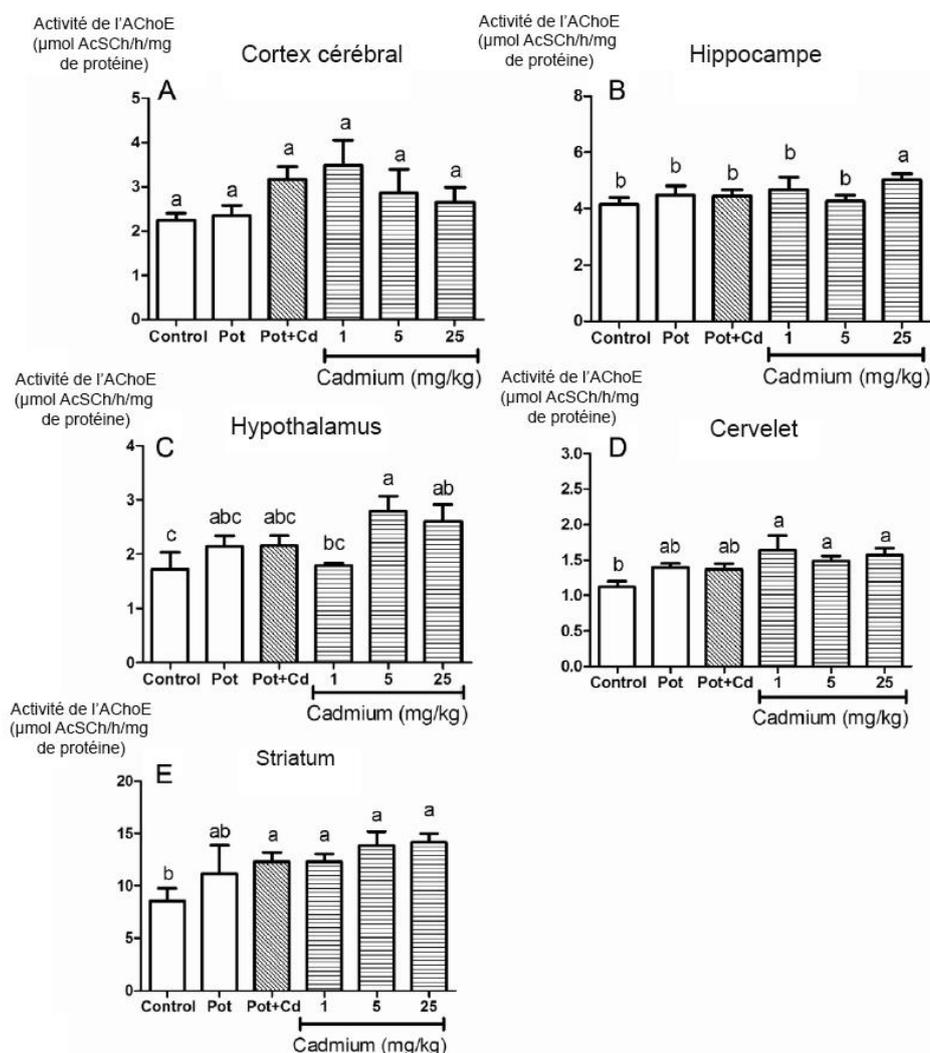


Figure 25 - Activité de l'AchoE dans différentes régions cérébrales de rats exposés ou non au Cd (Gonçalves et al., Behavior and brain enzymatic changes after long-term intoxication with cadmium salt or contaminated potatoes, Food and Chemical Toxicology, 2012)

Pour l'expérimentation, des rats âgés de 3 semaines ont été étudiés durant 5 mois. Le groupe contrôle a reçu une alimentation sans pomme de terre (Pot) et n'a pas été exposé au Cd. Le groupe « Pot » a reçu une alimentation composée de 10% de pommes de terre cultivées sans Cd. Le groupe « Pot+Cd » a reçu une alimentation composée de 10% de pommes de terre cultivées avec 10µM de Cd. Les trois autres groupes ont reçu une alimentation de base mixée à des solutions de Cd à concentrations de 1, 5 ou 25 mg/kg. Les histogrammes présentent la mesure de l'activité de l'AchoE dans le cortex cérébral (A), l'hippocampe (B), l'hypothalamus (C), le cervelet (D) et le striatum (E). Les lettres minuscules symbolisent des différences significatives entre les différents groupes après analyse de variance (ANOVA) et test de Duncan ($p < 0.05$).

D'autres perturbations ont également été rapportées, notamment une augmentation de la sensibilité du SNC à la sérotonine, ou encore une altération du système glutamatergique avec une observation de la diminution de l'exocytose du glutamate ou encore la stimulation de la liaison de ce dernier à ses récepteurs

plaquettaires (Desi et *al.*, 1998 ; Borisova et *al.*, 2011). Ces résultats semblent contradictoires avec la suractivation des récepteurs NMDA au glutamate dans la MA. Cependant, le système glutamatergique est une des cibles actuelles de traitement de la MA, des recherches plus approfondies sont donc nécessaires afin de déterminer l'impact du Cd sur celui-ci chez l'homme.

2.6.3 Intoxications aiguës et chroniques au cadmium

Chez l'homme, l'intoxication aiguë au Cd provoque des symptômes de type parkinsoniens (Okuda et *al.*, 1997). Concernant l'intoxication chronique, de nombreuses études ont répertorié les effets observés chez l'adulte, majoritairement chez des travailleurs exposés ou des rongeurs. Le plus souvent, les désordres observés sont neurologiques avec des difficultés d'apprentissage, notamment chez les enfants exposés de manière pré ou postnatale, des troubles du comportement, des troubles de la mémoire, des déficits moteurs et sensoriels ou encore des neuropathies (Bonithon-Kopp et *al.*, 1986).

Les études menées sur des enfants de tous âges ont mis en évidence une corrélation négative significative entre l'exposition au Cd et les résultats de QI (Thatcher et *al.*, 1982). Une étude prospective sur près de 1500 couples mère-enfant a démontré une association négative entre le taux de Cd urinaire maternel au cours du 1^{er} trimestre de grossesse et les performances de leurs enfants à 5 ans en terme de langage et de QI, laissant envisager un impact sur la vie adulte. Les autres études montrent un lien significatif entre l'exposition au Cd et une altération des performances cognitives ainsi que des troubles du comportement (Sanders et *al.*, 2015).

Les concentrations plasmatiques et les quantités de Cd provenant de cheveux de patients atteints de pathologies motrices ont montré des quantités de Cd significativement plus importantes que celles de patients exempts de pathologies. De plus des quantités de Cd et Pb élevées dans les échantillons de cheveux sont associées à des difficultés d'apprentissage, montrant ainsi l'intérêt d'une étude approfondie sur les malades d'Alzheimer (Bonithon-Kopp et *al.*, 1986).

Les effets toxiques du Cd ont été largement étudiés durant la période prénatale et chez le jeune enfant, mais pas chez le sujet âgé. Les études mettent en évidence des altérations neurobiologiques certaines. Les mécanismes d'action probables de ce métal, tels que l'induction d'un stress oxydatif, l'influence sur les systèmes de neurotransmetteurs ainsi que les modifications épigénétiques sont autant de mécanismes qui pourraient expliquer au moins en partie les altérations retrouvées chez les malades d'Alzheimer. Cependant il n'existe à ce jour pas suffisamment d'investigations recherchant le lien entre le développement de la MA et l'exposition au Cd. Ainsi, l'influence du Cd sur le développement de plaques amyloïdes ou sur la phosphorylation de Tau n'a pas encore été étudiée, pas plus que les taux de Cd chez les patients atteints de la maladie en comparaison à des adultes sains.

Ce métal lourd mériterait donc plus d'attention concernant la MA et les maladies neurodégénératives dans un sens plus large.

2.7 Le Manganèse

Le Mn est un métal ubiquitaire que l'on ne retrouve pas sous forme métallique libre dans la nature, mais dans la composition de minéraux. C'est le douzième élément en termes d'abondance dans la croûte terrestre (Santé Canada, 2010). Il est essentiel à la croissance, au développement, ainsi qu'à l'homéostasie cellulaire. Entre autres, le Mn est nécessaire à la formation osseuse, à la régulation des métabolismes lipidique, protidique et glucidique, ainsi qu'à l'absorption du Ca. Il s'agit également d'un cofacteur pour de nombreuses enzymes clés des fonctions cellulaires neuronales et gliales, mais également pour des enzymes impliquées dans la synthèse et le métabolisme de neurotransmetteurs. Il s'agit en outre d'un métal polyvalent, largement utilisé dans de nombreux secteurs industriels comme la production de verre et de céramique, d'adhésifs, de peinture, d'additif pour l'essence et entre autres la production de pesticides et engrais. Il est également utilisé comme produit de contraste pour l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) (Bowman et *al.*, 2012 ; Santé Canada, 2010).

Il n'existe à l'heure actuelle aucune recommandation quant à l'apport minimal de Mn requis chez l'homme en raison de données insuffisantes, mais les carences sont extrêmement rares car il est présent dans un grand nombre d'aliments. L'Académie

Nationale des Sciences en collaboration avec l'organisation canadienne de santé (Santé Canada) a déterminé que « l'apport suffisant » en Mn était de 2,3 mg/jour chez l'homme et de 1,8 mg/jour chez la femme, avec un apport maximal « tolérable » de 11 mg/jour (Santé Canada, 2010).

2.7.1 Toxicocinétique du manganèse

2.7.1.1 Voie orale

Seule une faible fraction (environ 1-5%) du Mn ingéré est absorbée (Davis et *al.*, 1993). Une alimentation plus riche en Mn entraîne un système de protection de l'organisme avec une absorption intestinale réduite ainsi qu'un métabolisme et une élimination accrus de ce métal. L'absorption du Mn est fortement augmentée durant la grossesse et en cas de carence martiale (Dorman et *al.*, 2002 ; Zlotkin et *al.*, 1995).

Après absorption, plus de 80 % du manganèse se trouve lié à la bétoglobuline et à l'albumine, une faible fraction étant retrouvée sous forme de Mn trivalent lié à la transferrine. Le reste du Mn est présent sous forme d'ions libres dans le plasma (Ueda et *al.*, 1993 ; Harris et Chen, 1994). Concernant la distribution dans les tissus, la majorité du Mn se situe dans le cerveau, plus particulièrement dans les ganglions de la base du bulbe olfactif, puis dans le foie, les reins et le pancréas. Les similitudes existant entre le Fer et le Mn impliquent la présence de transporteurs communs entre les deux métaux, ce qui pourrait expliquer le transport du Mn à travers la BHE, notamment grâce à des systèmes de transport médiés par la transferrine ou le DMT-1 (Divalent Metal Transporter 1) (Aschner et *al.*, 2002 ; Crossgrove et Yokel, 2004).

Son élimination est biphasique, elle concerne tout d'abord le Mn non absorbé qui est éliminé dans les selles avec une demi-vie jusqu'à deux jours, puis le Mn absorbé qui présente une demi-vie plus lente de 10 à 30 jours en moyenne avec une excrétion majoritairement biliaire. Cotzias et ses collaborateurs ont déterminé que la demi-vie d'élimination du Mn cérébral était en moyenne de 53 jours chez l'homme en raison d'un passage lent de la BHE lié à une diffusion passive, d'où une possible accumulation du Mn dans les structures cérébrales lors d'une exposition chronique (Cotzias et *al.*, 1968).

2.7.1.2 Voie inhalée

La voie pulmonaire est la seconde voie d'absorption du Mn. Elle concerne plus particulièrement les travailleurs exposés. Cette absorption dépend, comme pour les autres métaux, des caractéristiques intrinsèques des particules en suspension. Les particules les plus fines, pouvant parvenir au niveau alvéolaire, sont absorbées tandis que les particules de grande taille sont évacuées par le système mucociliaire, une partie étant déglutie. Le Mn peut également emprunter le système olfactif et parvenir au SNC sans passer par la circulation sanguine. Ce type de transport du Mn a été mis en évidence chez des rongeurs et des poissons, mais reste encore controversé (Brenneman et *al.*, 2000 ; Dorman et *al.*, 2002).

2.7.1.3 Voie cutanée

Le Mn peut être absorbé par voie cutanée lorsqu'il est organiquement lié, cependant cette voie est très négligeable (Rodier, 1955).

2.7.2 Mécanismes d'action du manganèse suggérés dans la MA

Perturbation des systèmes de neurotransmetteurs :

La majorité des études sur des animaux de laboratoire (rongeurs et primates) montrent que l'exposition au Mn entraîne une perturbation des voies dopaminergiques avec une diminution du taux de dopamine et de sa liaison à ses récepteurs, et une dégénérescence des terminaisons nerveuses dopaminergiques (Eriksson et *al.*, 1992 ; Kobayashi et *al.*, 2003). Ces altérations seraient cohérentes avec certaines pathologies neurodégénératives, notamment Parkinson, cependant d'autres études ne sont pas parvenues aux mêmes conclusions et n'ont pas pu démontrer de lien entre l'exposition au Mn et le système dopaminergique (Shinotoh et *al.*, 1995; Olanow et *al.*, 1996).

D'autres équipes de recherche ont étudié l'impact du Mn sur les systèmes GABAergique et glutamatergique. Concernant ce dernier, de solides données indiquent que l'exposition au Mn entraîne une augmentation de la fréquence de libération du glutamate et une diminution du captage de celui-ci par les astrocytes,

entraînant ainsi une élévation des concentrations extracellulaires et pouvant mener à une excitotoxicité (Erikson et Aschner, 2003). Ces résultats semblent cohérents avec l'activation du système glutamatergique dans la MA et mériteraient donc plus d'attention. Concernant le système GABAergique, les études chez l'animal sont en faveur d'une modulation de ce neurotransmetteur par le Mn. Cette modulation est variable en fonction de la région cérébrale touchée et peut donc être positive ou négative, cependant les mécanismes ne sont pas encore élucidés (Santé Canada, 2010).

Altération des fonctions mitochondriales :

Le Mn se concentre de façon spécifique dans les mitochondries dans lesquelles il serait probablement lié à l'ATP. Les tissus les plus riches en mitochondries présentent ainsi des teneurs en Mn supérieures aux autres tissus. L'excrétion du Mn hors de la mitochondrie suit en outre une cinétique très lente (Gavin et *al.*, 1990). L'action cytotoxique du Mn serait alors due à un dysfonctionnement mitochondrial mais également du métabolisme énergétique. En effet, les résultats d'études *in vivo* et *in vitro* indiquent que le Mn serait capable d'inhiber la phosphorylation oxydative, entraînant ainsi un dysfonctionnement mitochondrial. Ce dysfonctionnement serait alors responsable d'anomalies métaboliques, notamment au niveau de la glycolyse et du cycle de Krebs (Malthankar et *al.*, 2004 ; Zwingmann et *al.*, 2004). D'autres résultats montrent que le Mn possède la capacité d'altérer la production d'ATP au niveau mitochondrial (Zwingmann et *al.*, 2004 ; Zhang et coll., 2005).

Les dysfonctionnements observés suite à l'exposition au Mn expliquent en partie l'effet cytotoxique de ce métal et peuvent donc constituer une hypothèse pour expliquer la mort neuronale constatée dans les maladies neurodégénératives comme la MA.

Induction de stress oxydatif :

L'impact du Mn sur le stress oxydatif est très controversé. En effet, certaines études affirment que l'exposition au Mn entraîne la production de ROS et pourrait altérer les systèmes antioxydants dans des structures comme le striatum et l'hippocampe (structures touchées dans la MA) (Dobson et *al.*, 2003; Erikson et *al.*, 2005). D'autres suggèrent que le Mn favoriserait le stress oxydatif en entraînant une diminution du glutathion et de la glutathion peroxydase. Le Mn pourrait également

activer des facteurs de transcription et de kinases sensibles au stress comme NF-kB (Sidoryk et *al.*, 2013).

Certains chercheurs pensent à l'inverse que le Mn posséderait des propriétés antioxydantes et les études les plus récentes tendent à réfuter l'implication directe du Mn dans la production de ROS, laissant entendre que le stress oxydatif généré suite à une exposition au Mn serait indirectement le résultat de la perturbation de la phosphorylation oxydative mitochondriale (Sziraki et *al.*, 1998; Chen et *al.*, 2000).

Dérégulation des fonctions astrocytaires :

Les astrocytes sont essentiels dans la régulation des fonctions cérébrales. De plus, le métabolisme astrocytaire est intimement lié à celui des neurones, avec lesquels les astrocytes interagissent en permanence. Les neurones dépendent fortement des astrocytes car ils ne possèdent pas de pyruvate carboxylase permettant la synthèse de glutamate ainsi que la reconstitution d'intermédiaires du cycle de Krebs. En effet, le glutamate n'est pas transporté efficacement à travers la BHE (Yu et *al.*, 1983 ; Bak et *al.*, 2006).

Or, le Mn est préférentiellement déposé au sein des astrocytes en raison de la présence sur ces cellules de transporteurs de haute capacité, permettant un afflux important de Mn dans le milieu intracellulaire. La concentration en Mn dans les astrocytes est jusqu'à 60 fois plus élevée que dans les neurones. Le stress oxydatif généré entraîne la perturbation de synthèse du glutathion qui génère un défaut de protection des astrocytes contre l'oxydation, favorisant la mort de ces cellules. Il en résulte également une diminution du soutien des fonctions neuronales par les astrocytes, pouvant mener à des dysfonctionnements, voire à une cytotoxicité neuronale (Sidoryk et *al.*, 2013).

Perturbation de l'homéostasie calcique et du fer :

Le Mn présent en quantités anormalement élevées dans l'organisme pourrait, sous sa forme divalente et par mimétisme des ions calciques, pénétrer dans les terminaisons nerveuses au travers des canaux calciques pendant leur stimulation. Ce phénomène favoriserait la mobilisation des ions Ca^{2+} présents dans ces terminaisons avec pour effet une libération du neurotransmetteur concerné, menant à une perturbation de la signalisation neuronale (Powis et *al.*, 1996).

Une autre hypothèse serait une perturbation de l'homéostasie du fer, en raison de ses similitudes avec le Mn, qui pourrait contribuer à la cytotoxicité neuronale en raison de phénomènes de compétition pour les récepteurs du fer (Zheng et Zhao, 2001 ; Kwik-Urbe et *al.*, 2003).

Induction de neurodégénérescence *in vivo* :

Les études effectuées sur des animaux de laboratoire mettent en évidence une dégénérescence neuronale et une gliose réactionnelle suite à une exposition subchronique ou chronique au Mn. Les données indiquent que la cytotoxicité du Mn fait intervenir le système apoptotique, mais les chercheurs n'excluent pas l'intervention éventuelle du système nécrotique (Hirata, 2002 ; Roth et *al.*, 2000).

Formation de dépôts amyloïdes :

L'exposition chronique de macaques au Mn a provoqué une activation de l'amyloid- β precursor-like protein 1 (APLP1) et la formation de dépôts de peptides A β au niveau du cortex frontal (*Figures 25 et 26*) (Bowman et *al.*, 2012).

La figure 26 montre que le marquage de l'APLP1 chez les contrôles est faible, que ce soit dans les neurones corticaux (a) ou dans la substance blanche (d). Dans le cortex frontal des animaux exposés au Mn, un marquage brun foncé est visible dans les cellules pyramidales (b) et les interneurones corticaux (c, h), ainsi que les neurones interstitiels constituant la substance blanche (e, i). Certaines cellules gliales surexprimant l'APLP1 présentent un noyau condensé évoquant une cellule en apoptose (f). D'autres ont une apparence perlée et semblent en neurodégénérescence (g) (Guilarte et *al.*, 2008).

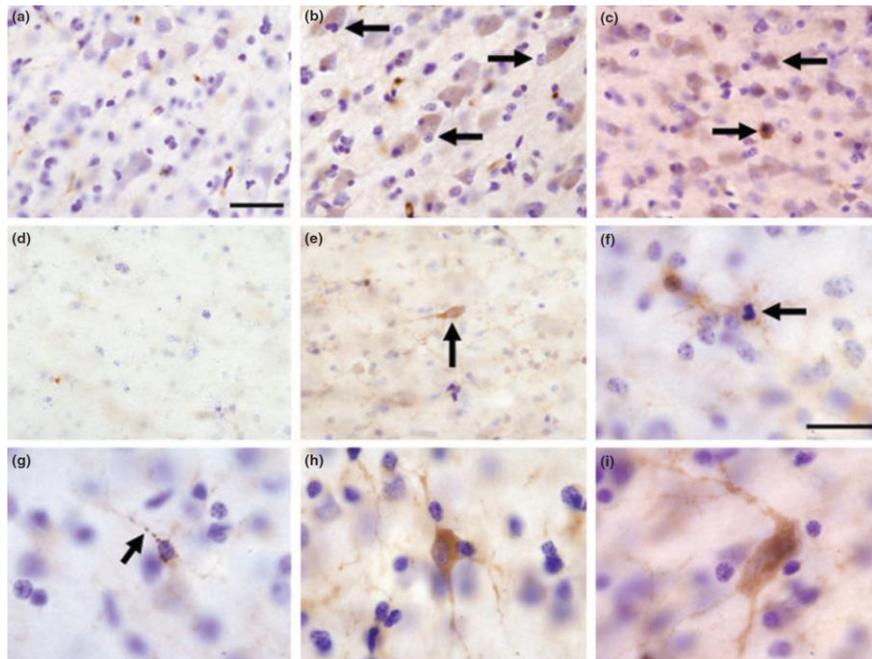


Figure 26 – Marquage de l'APLP1 dans des coupes de cortex frontal de primates exposés ou non au Mn, par immunohistochimie (Guilarte et al., *Increased APLP1 expression and neurodegeneration in the frontal cortex of manganese-exposed non-human primates*, *Journal of Neurochemistry*, 2008)

Pour cette expérimentation, sept macaques de 5 à 6 ans ont été sélectionnés. Trois d'entre eux n'ont reçu aucun traitement et présentent le groupe contrôle (**a, d**). Les quatre autres ont reçu entre 3.3 et 5.0 mg/kg de Mn par semaine durant 40 semaines. Ils constituent le groupe des animaux exposés (**b, c et e-i**). Les flèches indiquent le marquage de plaques amyloïdes dans la substance grise (**b-e**). Les flèches des figures f et g présentent respectivement une cellule en apoptose et une cellule en dégénérescence.

Aucun agrégat de peptides A β n'a été mis en évidence dans le cortex frontal des contrôles (*Figure 27*). Cependant, chez les animaux exposés au Mn, des plaques amyloïdes diffuses sont présentes dans la substance grise des animaux (b-e). Des agrégats de peptides A β extracellulaires sont parfois visibles avec perte du corps cellulaire d'un neurone (f).

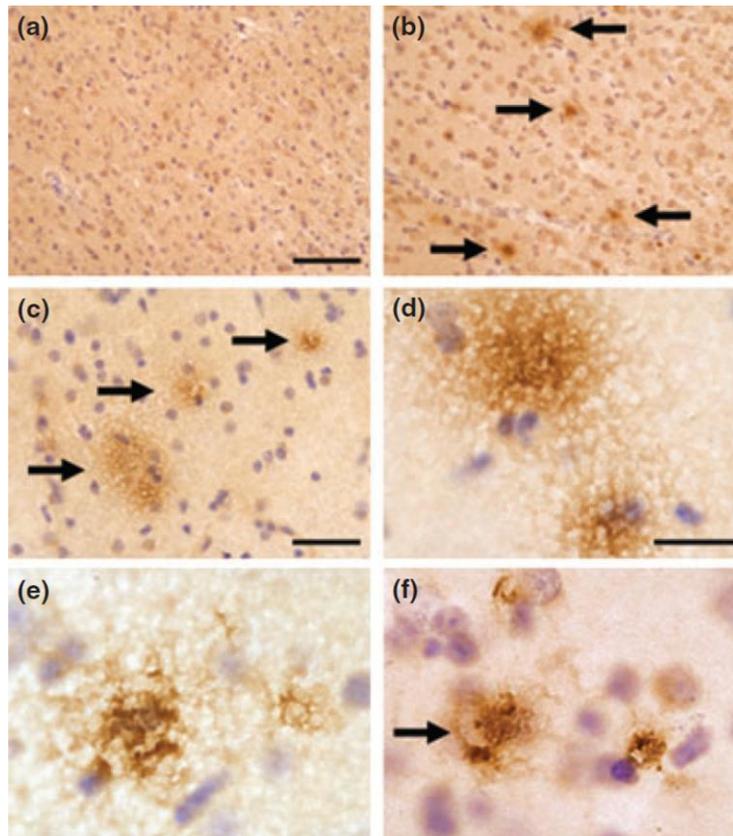


Figure 27 - Marquage des peptides A β dans le cortex frontal de primates exposés ou non au Mn, par immunohistochimie (Guilarte et al., *Increased APLP1 expression and neurodegeneration in the frontal cortex of manganese-exposed non-human primates*, *Journal of Neurochemistry*, 2008)

Dans cette seconde expérimentation, les tissus des sept mêmes macaques ont été examinés. **a-** Contrôles. **b-f-** Animaux exposés au Mn.

Ces résultats confirment qu'il existe une augmentation de l'expression de l'APLP1 suivie de la formation de dépôts amyloïdes dans le cortex frontal suite à une exposition chronique au Mn. Cependant, ces études ont été effectuées sur de faibles échantillons (4 animaux exposés au Mn et 3 animaux contrôles) avec des variabilités concernant l'âge et les doses de Mn administré. Il serait donc intéressant de renouveler ces expérimentations sur des échantillons plus importants avec un protocole uniforme. De plus amples investigations sont donc nécessaires pour connaître le lien entre le Mn et les dépôts amyloïdes. De plus, il serait intéressant de savoir si le Mn exerce un effet sur la phosphorylation de la protéine Tau, qui fait partie des éléments caractéristiques de la MA.

2.7.3 Intoxications aiguës et chroniques au manganèse

Les études effectuées sur des rongeurs en gestation suggèrent qu'une exposition au Mn durant la vie fœtale et après la naissance induit une accumulation du Mn au niveau cérébral et conduit à un retard de croissance. Les nouveaux nés sont très sensibles au Mn durant leur développement postnatal avec une accumulation du métal plus intense à cette période (Santé Canada, 2010).

Une exposition aiguë au Mn induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques selon de récentes études (Bowman et *al.*, 2012).

L'exposition chronique à des doses élevées de Mn cause le « Manganisme » ou Parkinsonisme induit par le Mn. Celui-ci est dû à une neurodégénérescence touchant les ganglions cérébraux notamment le striatum et le globus pallidus. Il se manifeste par des troubles comportementaux avec irritabilité et agressivité, mais aussi par une expression clinique évoquant la maladie de Parkinson (MP) (bradykinésie, rigidité, troubles de l'écriture, troubles de l'élocution...) associée à des troubles de la démarche. L'atteinte est symétrique, il n'existe pas de tremblements de repos et la réponse à la Lévodopa est nulle, ce qui permet de différencier le Manganisme d'une MP à proprement parler. Le Manganisme n'est pas réversible et peut même progresser après l'arrêt de l'exposition au Mn (Olanow, 2004 ; Santé Canada, 2010).

L'exposition chronique à de plus faibles doses de Mn semble responsable de manifestations subcliniques telles que troubles moteurs, troubles de la mémoire à court terme et des fonctions cognitives. De nombreuses études rapportent également la présence de symptômes généraux aspécifiques tels qu'asthénie, troubles de l'humeur et troubles du sommeil chez les travailleurs exposés (Santé Canada, 2010 ; Myers et *al.*, 2003).

En conclusion, le Mn comme les autres métaux lourds évoqués précédemment, est un métal présentant une toxicité indéniable sur le système nerveux. L'induction de stress oxydatif, la perturbation de l'homéostasie des neurotransmetteurs, notamment le glutamate, ainsi que la dérégulation des fonctions astrocytaires permettant un fonctionnement neuronal physiologique sont autant d'éléments pouvant expliquer la neurodégénérescence observée dans les pathologies neurodégénératives comme la MA. Les récentes publications démontrant un lien

entre l'exposition chronique au Mn et la formation de dépôts amyloïdes est également une piste non négligeable sur l'implication du Mn dans le développement de la MA. Enfin, la symptomatologie suite à l'exposition chronique chez l'homme à de faibles doses de Mn inclut des troubles cognitifs avec notamment des troubles mnésiques qui rappellent ceux observés chez les patients atteints de MA.

De nombreuses questions restent encore sans réponse en ce qui concerne l'effet du Mn sur la santé humaine. Il est donc important de continuer à explorer l'effet de ce métal à la fois *in vitro* et *in vivo* pour en comprendre les mécanismes dans son implication dans la MA.

2.8 Autres métaux lourds suspectés dans la MA

Hormis les ETM cités ci-dessus, d'autres métaux lourds commencent à susciter l'intérêt des chercheurs dans la MA. C'est le cas du fer (Fe), du cuivre (Cu) et du zinc (Zn), éléments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme mais qui peuvent, en quantités anormalement élevées, être responsables de dysfonctionnements métaboliques.

2.8.1 Rôle du fer dans la MA

Le Fe est essentiel au fonctionnement neurologique normal et est un cofacteur de nombreux processus métaboliques comme le transport de l'oxygène, la synthèse d'ADN ou encore la respiration cellulaire. Au niveau cérébral, le Fe est présent en majorité dans les oligodendrocytes dans lesquels il participe à la myélinisation axonale.

2.8.1.1 Impact du fer sur le stress oxydatif

Cependant, suite à une accumulation anormale dans le cerveau, il peut être responsable de la génération de ROS. Le Fe en grandes quantités induit la production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton résultant en une consommation accrue de glutathion, une peroxydation lipidique membranaire, une agrégation protéique et une altération des acides nucléiques. L'ensemble de ces phénomènes peuvent mener à un dysfonctionnement et à la mort neuronale (Nunez

et *al.*, 2012). Il est donc possible que le Fe participe indirectement au développement de maladies neurodégénératives, notamment la MA, selon de récentes études (Liu et Connor, 2012).

Lors du vieillissement cérébral normal, l'homéostasie du Fe est assurée par une augmentation de la synthèse de l'hème-oxygénase 1 responsable de la dégradation de l'hème et libérant ainsi de la biliverdine, puissant antioxydant, du monoxyde de carbone (CO) et du Fe. Même s'il s'agit d'un mécanisme neuroprotecteur, il est probable que la libération de Fe supplémentaire augmente la susceptibilité neuronale aux ROS (Schipper et *al.*, 2009). De plus, de nombreuses pathologies génétiques du métabolisme du Fe conduisent à une neurodégénérescence associée à une accumulation de Fe au niveau cérébral. C'est entre autres le cas de la neurodégénérescence associée à la pantothénate kinase et de la neuroferritinopathie (Williams et *al.*, 2013 ; Keogh et *al.*, 2012).

La dérégulation de l'homéostasie du Fe est observable dans les stades précliniques de la MA et les études effectuées chez l'homme démontrent que les dommages causés par le stress oxydatif précèdent les lésions cérébrales observées dans la pathologie (Smith et *al.*, 2010). Il a également été démontré que l'accumulation du Fe se produit dans les mêmes régions cérébrales que celles contenant des dépôts de peptides A β chez les patients atteints de MA (Zecca et *al.*, 2004).

2.8.1.2 Influence du fer sur les peptides A β

Le Fe, comme d'autres métaux, possède la capacité d'altérer l'agrégation des peptides A β et d'augmenter leur toxicité. De plus, il présente une haute affinité pour les peptides A β (*Figure 28*) (Falangola et *al.*, 2005). Les chercheurs pensent que la liaison du fer à ces composants de la MA est due à la mise en place d'un mécanisme antioxydant visant à réduire les ROS, mais devient pathologique au fur et à mesure de la progression de la maladie et de la formation des agrégats (Honda et *al.*, 2004). Selon plusieurs équipes, dont celle de Crichton, la présence de Fe induit la production d'APP et une inhibition de l' α -sécrétase, favorisant ainsi la formation de peptides A β au niveau des sites axonaux comportant des dommages dus à l'oxydation. La présence de ces peptides serait alors un mécanisme de réparation des dommages, cependant, au fil du temps les peptides A β se lient au Fe³⁺ qui ne

peut être stocké ou transporté par les mécanismes habituels. Le Fe^{3+} est alors rapidement réduit en Fe^{2+} qui entraîne à son tour la production de ROS. De plus, la liaison du Fe à l'APP et aux peptides $A\beta$ accélère l'agrégation de ces mêmes peptides sous forme de fibres. Le Fe peut s'associer aux peptides $A\beta$ quel que soit leur niveau d'agrégation, cependant il peut difficilement se dissocier des formes fibrillaires avancées (Crichton et *al.*, 2011).

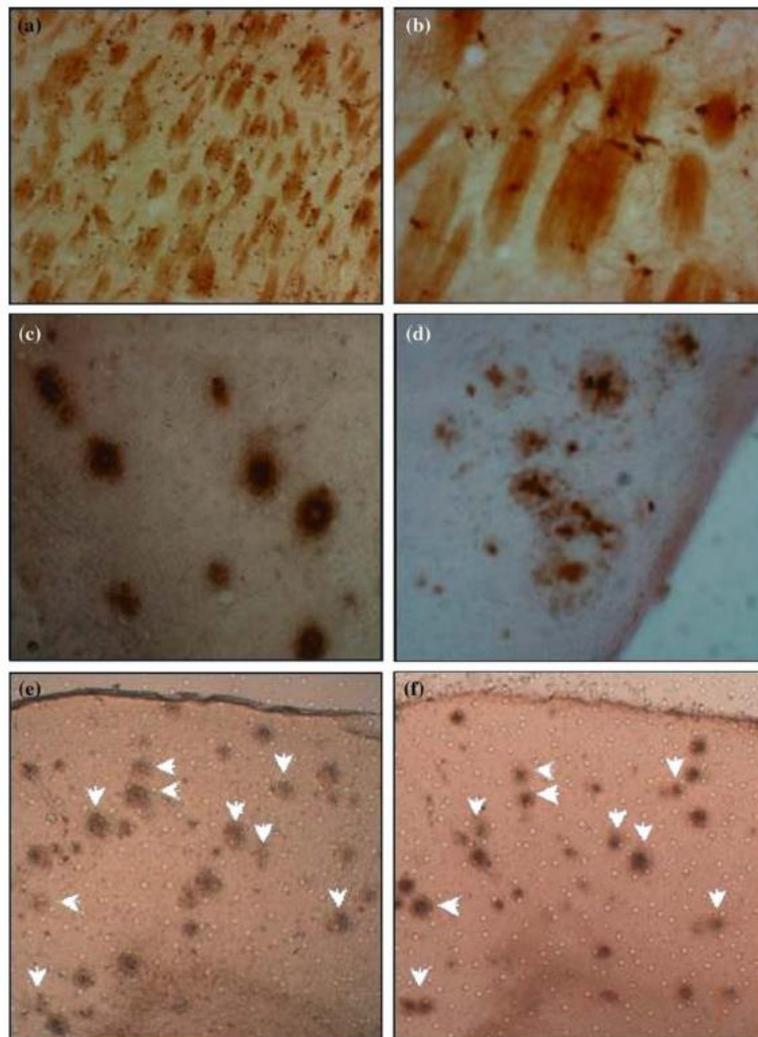


Figure 28 - Colocalisation du fer et des peptides $A\beta$ (Falangola et al., *Histological Co-Localization of Iron in $A\beta$ Plaques of PS/APP Transgenic Mice, Neurochemical Research, 2005*)

Trois souris transgéniques PS/APP modèles de la MA et une souris contrôle de 18 mois ont été sélectionnées. Les cerveaux de deux des souris PS/APP et du contrôle ont été fixés à l'aide de formol, celui de la troisième souris PS/APP a été fixé au méthacarn. Les sections cérébrales ont ensuite été traitées avec un anticorps anti- $A\beta$ ou ont subi une réaction de Perls couplée au DAB (3,3-diaminobenzidine) afin de localiser les ions Fe^{3+} dans les cellules. **a** : section histologique du putamen avec agrandissement (**b**) montrant la présence de Fe^{3+} intracellulaire dans et autour de la substance blanche. **c**, **d** : Fe^{3+} dans les plaques amyloïdes de souris transgéniques traitées par formol (**c**) ou méthacarn (**d**). **e**, **f** : distribution similaire des plaques $A\beta$ et du Fe dans les régions cérébrales voisines du putamen, confirmant leur colocalisation (flèches).

Les résultats d'études effectuées *in vitro* sur des cellules de neuroblastome par Rottkamp et ses collaborateurs montrent que les fibres A β prétraitées par la desferrioxamine, agent chélateur du fer, présentent une toxicité moindre par rapport à un groupe contrôle non traité (Rottkamp et *al.*, 2001). Lorsque du Fe est ensuite ajouté en excès au mélange, la toxicité des peptides A β est restaurée, laissant penser que l'association du Fe à ces peptides leur confère leur toxicité (*Figure 29*). L'hypothèse avancée par les chercheurs est que les peptides A β associés au Fe pourraient réduire ce métal et le transporter au niveau de la membrane cytoplasmique, créant ainsi un déséquilibre oxydatif qui favoriserait la peroxydation des lipides membranaires (*Figure 30*) (Rottkamp et *al.*, 2001). Cette hypothèse est appuyée par les essais cliniques qui mettent en évidence le fait que la desferrioxamine est efficace pour ralentir la progression de la MA et mérite donc plus d'attention et de recherches (Rottkamp et *al.*, 2001 ; Crapper et *al.*, 1991). Cependant, il est important de garder à l'esprit que la desferrioxamine n'est pas seulement un chélateur du fer, mais aussi d'autres métaux comme l'Al. Les résultats obtenus par Rottkamp et son équipe sont donc à relativiser car ils ne prennent pas en compte la présence d'autres ions métalliques dans le cerveau qui peuvent potentialiser l'effet toxique du Fe ou au contraire le contrecarrer.

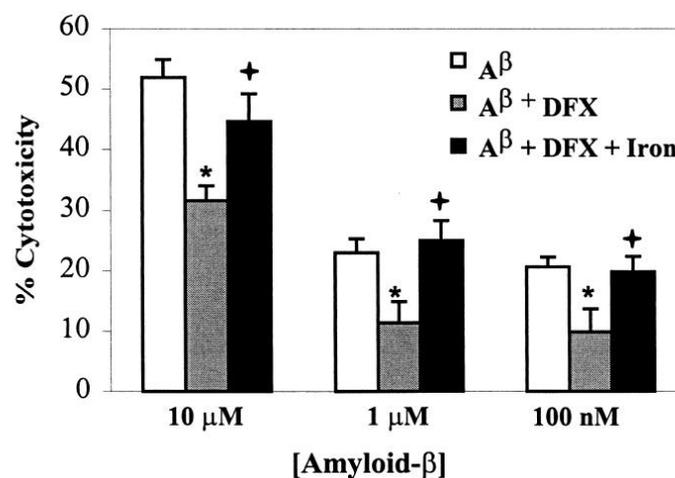


Figure 29 - Cytotoxicité induite par les peptides A β en présence ou absence de fer et de desferrioxamine, exprimée en pourcentage (Rottkamp et *al.*, *Redox-active iron mediates amyloid- β toxicity, Free Radical Biology & Medicine, 2001*)

Cellules de neuroblastome incubées avec des concentrations de peptides A β de 10 μ M, 1 μ M ou 100nM (contrôle en blanc), traitées pendant 2h avec 0,1 M de desferrioxamine (DFX), chélateur du fer (en gris), puis incubées pendant 2h avec 0,1 mM de chlorure de fer/ citrate ferrique. Au bout de 24h la toxicité cellulaire a été évaluée par détermination colorimétrique de la concentration de lactate déshydrogénase dans le milieu de culture. « * » : différence significative entre le contrôle et les cellules traitées par la desferrioxamine ($p < 0,05$). « + » : différence significative entre les cellules traitées par la desferrioxamine et les cellules incubées par la suite avec le fer ($p < 0,05$).

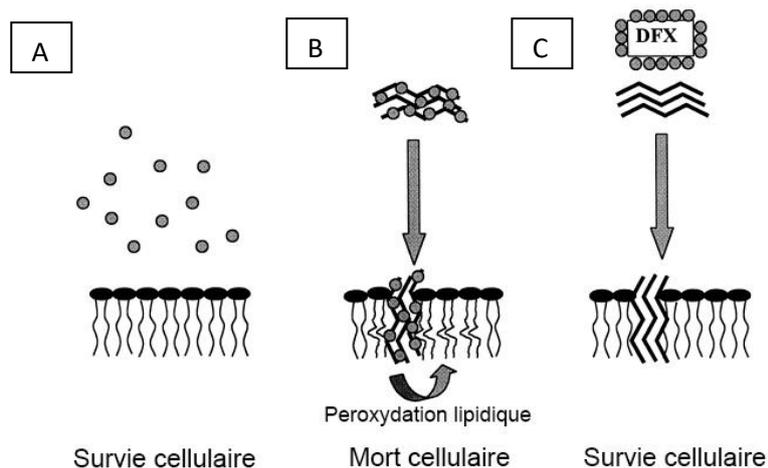


Figure 30 - Schématisation du potentiel rôle protecteur de la desferrioxamine dans la MA (Rottkamp et al., Redox-active iron mediates amyloid- β toxicity, *Free Radical Biology & Medicine*, 2001)

A – Membrane cellulaire intacte en présence de Fe (points gris) sous forme libre. **B** – Fibres amyloïdes (traits noirs) associées aux ions Fe entraînant une peroxydation lipidique membranaire. **C** – Chélation du Fe par la desferrioxamine (DFX) et inhibition de l'effet toxique des fibres amyloïdes.

2.8.1.3 Impact du fer sur la cognition

En termes de symptomatologie, les études *in vivo* sur des souris transgéniques modélisant la MA montrent qu'une surcharge en fer cérébral conduit à une signalisation neuronale anormale et à un déclin cognitif (Becerril et al., 2014). En outre, les analyses IRM démontrent que la présence de quantités anormalement élevées de Fe dans l'hippocampe, structure de grande importance dans la MA, est associée à une diminution des scores aux tests de mémoire, notamment le MMSE (Ding et al., 2009).

De plus, la MA se déclare généralement après l'âge de 65 ans, période qui coïncide avec une augmentation des taux de Fe cérébral chez les patients sujets à une surcharge en Fe. La MA du sujet jeune se présente elle chez les patients à partir de 40 ans, ce qui correspond au plateau des taux de Fe cérébral. En effet, le Fe s'accumule dans le cerveau au fil du temps jusqu'à une 40^{aine} d'années (Koedam et al., 2010).

Le Fe est un élément essentiel à l'organisme, cependant une dérégulation de son homéostasie peut compromettre le fonctionnement cérébral. Une forte augmentation des concentrations en Fe peut ainsi favoriser un stress oxydatif délétère pour les

neurones. En outre, la colocalisation de Fe avec les peptides A β suggère un impact de ce métal sur les pathologies neurodégénératives telles que la MA.

Cependant, une carence en Fe durant l'enfance peut aussi avoir un impact sur le développement cérébral qui est alors ralenti, avec des troubles de l'apprentissage et de la mémoire en raison d'une myélinisation anormale (Radlowski et *al.*, 2013).

Le maintien de l'homéostasie du Fe est donc essentiel au développement cérébral. Pourtant, les spécialités contenant du Fe sont actuellement non listées et peuvent faire l'objet d'une automédication. De plus amples recherches sont nécessaires afin d'évaluer son impact dans la MA, mais au vu des travaux parus à l'heure actuelle, ce métal devrait faire l'objet de plus d'intérêt de la part des autorités sanitaires.

2.8.2 Rôle du cuivre dans la MA

Le Cu, comme le Fe, est un cofacteur de nombreuses protéines et enzymes ayant un rôle fondamental dans la production énergétique, le transport d'oxygène, l'hématopoïèse ou encore le métabolisme cellulaire. Son métabolisme est étroitement lié à celui du Fe et du Zn. En termes de stockage, le cerveau fait partie des organes dans lesquels la concentration en Cu est la plus importante, avec une localisation prédominante dans l'hippocampe, la substantia nigra et le locus coeruleus (Manto, 2014). La toxicité du Cu serait due au Cu inorganique et non au Cu organique présent dans la nourriture, qui lui est lié aux protéines et est donc dénué d'effets néfastes sur l'organisme. Le Cu inorganique est retrouvé dans l'eau de boisson sous forme de sel libre qui participe ensuite à la fraction libre de Cu sanguin, non lié à la céruléoplasmine. Le Cu inorganique est libéré dans l'eau par les plomberies en cuivre toujours utilisées à l'heure actuelle.

La question est alors de savoir si le Cu auquel est exposé quotidiennement l'homme contribuerait au développement de la MA.

2.8.2.1 Troubles cognitifs liés au cuivre

En 2003, Sparks et Schreurs ont effectué des recherches sur des lapins modèles de la MA et ont découvert que l'ajout de faibles quantités de Cu dans l'eau de boisson (à hauteur de 0,12ppm) accentuait la pathologie et le déclin cognitif. Ces

résultats ont également été confirmés chez des souris (Sparks et Schreurs, 2003 ; Singh et *al.*, 2013). Par la suite, Brewer et ses collaborateurs ont mesuré les taux de Cu dans l'eau de 280 foyers américains. Un tiers de ces foyers présentait des valeurs de Cu excédant 0,1 ppm (seuil toxique chez le lapin), un tiers présentait des valeurs inférieures à 0,01 ppm (seuil considéré comme sûr) et un tiers des valeurs intermédiaires dont la toxicité est inconnue (Brewer, 2014). Certains auteurs font même un parallèle entre l'historique de la MA et l'utilisation massive de plomberies au Cu depuis le milieu du 20^{ème} siècle. Ils font également le lien entre la faible incidence de MA au Japon et le fait que les plomberies au cuivre sont très peu utilisées dans ce pays (Ueda et *al.*, 1992). Ces remarques méritent certes l'intérêt des autorités sanitaires mais il est important de ne pas tirer de conclusions trop hâtives. En effet, nous avons vu précédemment que des auteurs associent la faible incidence de MA dans ce pays à une utilisation moindre des plombages dentaires au mercure. De plus, il est probable que le seuil de toxicité du Cu ne soit pas le même chez le lapin et l'homme mais les auteurs n'en ont pas tenu compte dans leur analyse.

Enfin, il est prouvé que chez l'homme les concentrations en Cu plasmatique libre augmentent avec l'âge et il existe une corrélation négative entre le taux de Cu plasmatique libre et la cognition dans la MA avec une diminution des scores au MMSE (Arnal et *al.*, 2013 ; Squitti et *al.*, 2006).

2.8.2.2 Mécanismes d'action du cuivre suspectés dans la MA

Impact du Cu sur le stress oxydatif :

Les études menées *in vitro* et *in vivo* montrent que les patients atteints de MA présentent des anomalies dans le métabolisme du Cu. Les taux de Cu sanguin libre sont significativement plus élevés chez les patients atteints de MA que chez les contrôles et des concentrations très élevées en Cu ont été trouvées dans les plaques amyloïdes (Squitti et *al.*, 2005). Ces anomalies métaboliques conduisent, comme pour le Fe, à la génération de ROS. Le Cu est un catalyseur de la réaction de Fenton, entraînant la formation de radical hydroxyle capable de générer un stress oxydatif responsable d'une peroxydation lipidique et donc d'une cytotoxicité. La liaison du Cu aux peptides A β pourrait favoriser à la fois les cycles redox du stress

oxydatif mais aussi l'agrégation et la précipitation de ces peptides (Squitti et *al.*, 2013).

En outre, certaines équipes émettent l'hypothèse qu'une alimentation riche en lipides aurait un effet potentialisateur sur la toxicité du Cu. En effet, le Cu possède la capacité d'oxyder certaines molécules lipidiques en dérivés toxiques pour les neurones. Il peut également interagir avec l'homocystéine (acide aminé) pour oxyder le cholestérol en une substance neurotoxique (Seshadri et *al.*, 2002).

Lien entre le Cu et le gène codant l'ApoE :

D'un point de vue génétique, le gène codant pour l'ApoE pourrait intervenir dans la toxicité médiée par le Cu. En effet, l'allèle APOE ϵ_4 est un facteur de risque important dans la MA, alors que l'APOE ϵ_3 est neutre, et l'APOE ϵ_2 constitue un facteur protecteur. L'hypothèse des chercheurs est que l'ApoE pourrait lier le Cu pour l'éliminer du cerveau. En effet, l'APOE ϵ_2 possède deux cystéines pouvant se lier au Cu, l'APOE ϵ_3 , une seule et l'APOE ϵ_4 , aucune (Miyata et Smith, 1996).

Effet pro-inflammatoire du Cu :

Des études menées *in vitro* ont montré que le Cu pouvait déclencher des processus proinflammatoires par la modulation de la production de molécules telles que les interleukines IL1 α et IL12 (*Figure 31*) (Spisni et *al.*, 2009).

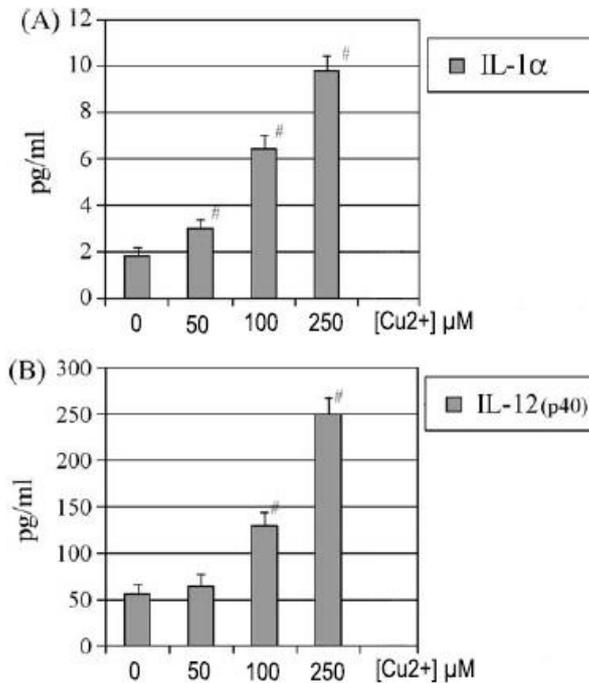


Figure 31 - Impact de concentrations croissantes de cuivre sur la production d'IL-1α et d'IL12 (Spisni et al., Effect of copper on extracellular levels of key pro-inflammatory molecules in hypothalamic GN11 and primary neurons, Neurotoxicology, 2009)

Des neurones hypothalamiques murins de type GN11 ont été incubés durant 96h avec des concentrations croissantes de cuivre (de 0 à 250 μM). Les concentrations en interleukines ont été déterminées par analyse immunologique Bio-Plex. IL-1α : Interleukine 1α. IL-12 (p40) : sous-unité p40 de l'interleukine 12. * : p < 0.05; # : p < 0.01 par test ANNOVA.

La figure ci-dessus illustre qu'en présence de concentrations croissantes en Cu, les taux d'IL-1α et d'IL-12 sécrétés par les neurones hypothalamiques augmentent. Le Cu pourrait donc exercer un effet pro-inflammatoire sur les cellules hypothalamiques notamment. Les mécanismes complexes mis en jeu ne sont cependant pas encore élucidés à l'heure actuelle. Il est vraisemblable qu'ils mettent en jeu de nombreuses autres molécules impliquées dans l'inflammation. Il serait intéressant de déterminer s'il existe un lien entre l'exposition au Cu et la neurodégénérescence observée dans la MA, notamment au niveau de l'hypothalamus, en analysant par exemple le taux de survie cellulaire avant et après exposition.

Il est cependant difficile de conclure malgré le nombre croissant de corrélations reliant le Cu et la MA. Certains auteurs affirment qu'un excès de Cu n'a pas d'impact sur le SNC et d'autres vont même jusqu'à émettre l'hypothèse qu'un déficit en Cu

pourrait causer la maladie, mais sans apporter de données concrètes pour étayer leurs propos (Klevay, 2008 ; Kessler et *al.*, 2008).

2.8.3 Rôle du zinc dans la MA

Le Zn est l'ETM le plus abondamment présent dans le SNC où il est associé à de nombreuses protéines ayant un rôle structural ou catalytique. Une importante fraction du Zn est faiblement liée à ces protéines et se retrouve séquestrée au niveau de vésicules présynaptiques, formant un groupes de neurones dits « enrichis en zinc ». Lorsqu'ils sont stimulés, ces neurones libèrent le Zn simultanément avec le glutamate. Le Zn contribue alors à moduler la plasticité synaptique et l'excitabilité neuronale. Environ 50% des neurones glutamatergiques contiennent ces vésicules riches en Zn (Tian et *al.*, 2010).

2.8.3.1 Taux cérébraux et plasmatiques en zinc

La présence de hautes concentrations (jusqu'à 1 mM) en Zn dans le cerveau de patients a été mise en évidence au sein des plaques amyloïdes, de même que pour le Cu et le Fe (Lovell et *al.*, 1998).

Concernant les taux de Zn dans le sang ou le cerveau, il n'existe à l'heure actuelle aucun consensus. Certains auteurs ont détecté des taux de Zn augmentés dans le sérum et l'hippocampe de patients atteints de la MA (Danscher et *al.*, 1997) alors que d'autres n'ont pas mis en évidence de différences avec les contrôles dans les taux sériques (Jimenez-Jimenez et *al.*, 1998). D'autres encore ont trouvé une diminution des taux de Zn dans le sérum et le LCR des patients atteints de la maladie (Baum et *al.*, 2010). Ces disparités sont vraisemblablement dues à la variabilité de méthodes ou d'échantillons utilisées (Rulon et *al.*, 2000 ; Baum et *al.*, 2010).

2.8.3.2 Mécanismes d'action du zinc suggérés dans la MA

Rôle des métalloprotéases liant le Zn :

Un site de liaison du Zn à l'APP a été découvert dans un domaine riche en cystéine (Bush et *al.*, 1993). Dans un cerveau sain, la voie normale de dégradation de l'APP (non-amyloïdogénique) s'effectue grâce à l' α -sécrétase. L'activité de cette protéase est attribuée à une famille de métalloprotéases nommée ADAM (A desintegrin and metalloprotease) contenant une séquence de liaison au Zn dans leur structure. Dans les études réalisées sur des souris transgéniques modèles de la MA, l'expression augmentée d'une des métalloprotéases (ADAM10) entraîne une augmentation du clivage de l'APP par l' α -sécrétase, une diminution de la formation des peptides A β et des plaques amyloïdes et une réduction des déficits cognitifs (Postina et *al.*, 2004). Il est envisageable qu'une anomalie dans l'homéostasie du Zn soit à l'origine de perturbations des métalloprotéases citées ci-dessus et soit indirectement liée à un déséquilibre de la dégradation des peptides A β .

Rôle de la Néprilysine et du Zn sur la dégradation des peptides A β :

Dans un cerveau sain, les peptides A β sont dégradés en permanence par des enzymes, identifiées en majorité comme des métalloprotéases à zinc, en particulier la Néprilysine. Des souris transgéniques déficientes en Néprilysine ont des taux de peptides A β significativement plus élevés que les contrôles en raison de leur incapacité à dégrader les peptides A β . L'expression de cette enzyme diminue avec l'âge à la fois chez les souris et chez l'homme et il est probable que ce phénomène ait des conséquences sur la cognition même s'il n'en existe à ce jour pas de preuve formelle (Farris et *al.*, 2007). De plus, les études postmortem sur des patients atteints de la MA suggèrent que l'expression de la Néprilysine est inversement corrélée au développement de la pathologie (Hellström et *al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que le déficit en Néprilysine chez les patients atteints de la MA pourrait être causé par une dérégulation de l'homéostasie zincique, elle-même à l'origine d'un défaut d'élimination des peptides A β , menant à une accumulation de ces peptides dans le cerveau.

Impact de chélateurs du Zn dans la MA :

Un essai clinique de phase II a montré que l'utilisation de Clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline), molécule possédant une affinité modérée pour le Cu et le Zn, entraînait une diminution du déclin cognitif (*Figure 32*) et une diminution des taux plasmatiques de peptides A β (*Figure 33*) par rapport au placebo (Ritchie et al., 2003). Les chercheurs pensent donc que le Clioquinol peut chélater ces métaux et favoriser la désagrégation des peptides A β . Les essais n'ont cependant pas été poursuivis en raison de la génération d'un contaminant toxique lors de la production du potentiel médicament.

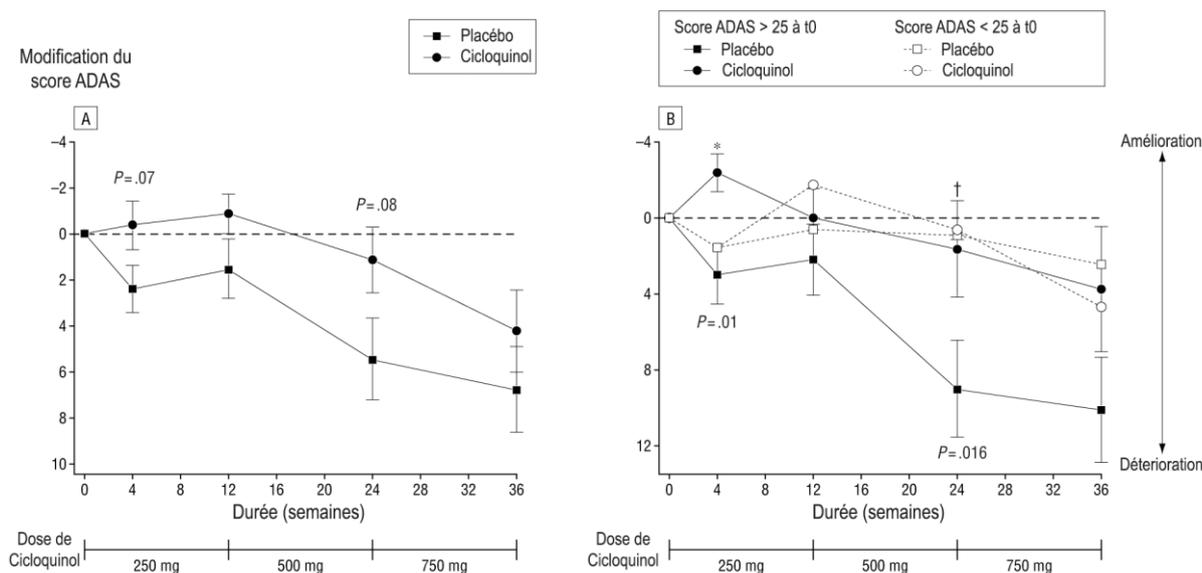


Figure 32 - Modification du score ADAS sous traitement au Clioquinol versus placebo (Ritchie et al., Metalprotein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial, Archives of Neurology, 2003)

Essai clinique de phase II en double aveugle chez 36 patients atteints d'une forme modérément sévère de la MA dont le score ADAS-cog était compris entre 20 et 45, le score MMSE entre 10 et 24, et traités par 5 à 10 mg/j de Donépézil depuis au moins 6 mois. L'essai clinique a duré 36 semaines. Les doses de Clioquinol administrées au groupe traité étaient de 125 mg deux fois par jour de 0 à 12 semaines, 250 mg deux fois par jour de 13 à 24 semaines et 375 mg deux fois par jour de 25 à 36 semaines. Le score ADAS a été mesuré toutes les 4 semaines. **A** : comparaison de la modification du score ADAS-cog chez les sujets traités par Clioquinol ou placebo. **B** : comparaison de la modification du score ADAS-cog chez les patients traités par Clioquinol ou donépézil dont le score ADAS-cog était au départ supérieur ou inférieur à 25. ADAS-cog : sous échelle cognitive de l'Alzheimer's Disease Assessment Scale (échelle de 0 à 70). MMSE : Mini Mental State Examination (échelle de 0 à 30). * : $p = 0,01$; † : $p = 0,02$ par test ANOVA.

La figure 31A illustre les changements du score ADAS-cog chez des sujets atteints de MA traités avec le Clioquinol ou un placebo. Ici la détérioration de ce score est significativement moindre chez les sujets traités par le Clioquinol. Cette substance serait donc capable de ralentir le déclin cognitif chez les patients atteints de la MA. Le graphe B s'intéresse à l'impact du score ADAS-cog avant traitement sur

l'efficacité du Clioquinol. En effet, chez les patients qui présentaient un score supérieur à 25 avant le début du traitement, l'écart des mesures entre le groupe traité et le groupe placebo est plus important que chez les patients qui présentaient un score inférieur à 25 au début de l'étude. Ces résultats suggèrent que l'efficacité du Clioquinol est fortement dépendante de l'état cognitif du patient avant traitement.

Cependant, le fait que les patients aient été traités par Donépézil au préalable peut représenter un biais dans l'interprétation des résultats, d'autant plus que le traitement a été poursuivi durant l'essai clinique et que la dose administrée pouvait varier du simple au double d'un patient à un autre. Il est connu que le Donépézil ne présente pas un puissant intérêt dans l'amélioration des troubles cognitifs chez les patients atteints de la MA, mais la question se pose sur un potentiel impact de la molécule sur l'essai clinique en question et sur les interactions possibles avec le Clioquinol.

Dans la seconde partie de l'étude, les chercheurs s'intéressent à l'impact du Clioquinol sur les taux de peptides A β , que l'on retrouve en proportions anormalement élevées chez les patients atteints de la MA (*Figure 33*).

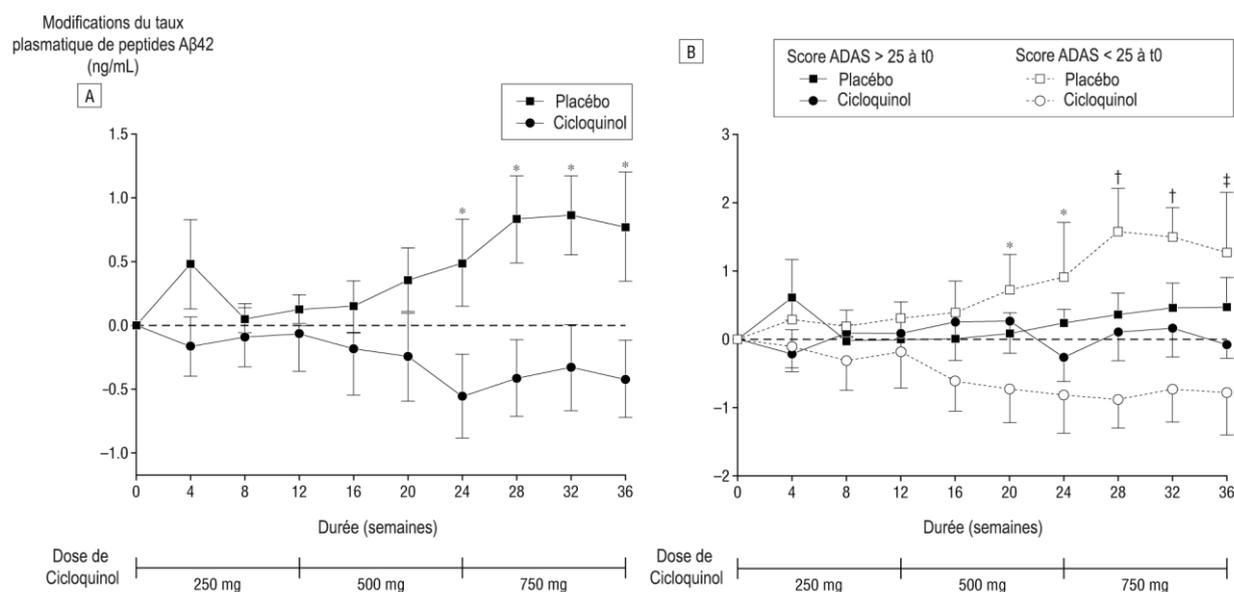


Figure 33 - Modifications des taux plasmatiques de peptides A β -42 au cours du traitement par Clioquinol vs placebo (Ritchie et al., Metalprotein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial, Archives of Neurology, 2003)

Essai clinique de phase II (cf. figure 31). Les taux plasmatiques de peptides A β -42 ont été mesurés toutes les 4 semaines par un test ELISA sandwich à l'aide d'anticorps anti-peptides A β -42. **A** : comparaison de la modification du taux plasmatique de peptides A β -42 chez des sujets atteints de MA et traités avec du Clioquinol ou un placebo. **B** : De même chez les patients présentant un score ADAS-cog supérieur ou inférieur à 25. * : p \leq 0,05; † : p \leq 0,001 ; ‡ : p \leq 0,01 par test ANOVA.

La figure 33A illustre que les sujets traités par Clioquinol présentent une diminution significative des taux plasmatiques de peptides A β -42 par rapport au groupe placebo. Le graphe B s'intéresse à la réponse du Clioquinol sur les taux plasmatiques de peptides A β -42 en fonction du score ADAS-cog des patients avant le traitement. Il est observable que l'effet du Clioquinol est plus marqué chez les patients ayant un score inférieur à 25 au début de l'étude. Ce résultat est donc opposé à celui observé sur la cognition dans la figure 32B. L'efficacité du Clioquinol sur la diminution du taux de peptides A β -42 est donc probablement indépendante du score ADAS-cog. Il est possible que l'effet plus intense de la molécule chez les patients présentant un déclin cognitif élevé soit dû à un taux plus important de peptides A β .

Le Donépézil est un inhibiteur de l'AchoE et permet l'inhibition de la dégradation de l'Acho au niveau synaptique. Il ne présente donc à priori pas d'effet sur les taux de peptides A β -42. Le Clioquinol est donc vraisemblablement à lui seul responsable de la diminution du taux plasmatique de ces peptides. La chélation du Cu et du Zn par le Clioquinol permettrait donc de diminuer les taux de peptides A β circulants et probablement leur accumulation au niveau cérébral. Ces hypothèses méritent d'être approfondies. Le Clioquinol n'ayant pas pu être développé, d'autres chélateurs pourraient être étudiés dans le cadre de la MA. Cependant, il serait complexe de produire une molécule pouvant chélater tous les métaux lourds auxquels l'organisme est exposé quotidiennement. De plus, certains de ces métaux sont essentiels au fonctionnement de l'organisme et des effets indésirables pourraient être à craindre en fonction de leur efficacité et des taux de métaux lourds présents dans l'organisme. Une régulation fine des quantités de métaux lourds est alors indispensable.

Rôle d'une déplétion en Zn dans la MA :

Certains chercheurs proposent que l'affinité des peptides A β pour le Zn induirait une carence en Zn pour les neurones. Or, le Zn a de nombreux effets protecteurs sur ces cellules. Il permet, comme vu plus haut, de moduler les voies glutamatergiques et inhibe la calcineurine (protéine phosphatase intervenant notamment dans la synthèse d'IL2) qui peut avoir des effets néfastes lors d'une stimulation excessive (Crouch et *al.*, 2011).

Impact du Zn sur la phosphorylation de Tau :

Il est également possible que le Zn joue indirectement un rôle dans la phosphorylation de la protéine Tau. En effet, l'exposition au Zn augmente la phosphorylation d'effecteurs au sein des voies dépendantes de la Pi3K (Phosphoinositol 3 Kinase) et de la MAPK, possédant toutes deux un rôle important dans la phosphorylation de Tau (An et *al.*, 2005). Des études *in vitro* ont en effet montré que de nombreuses kinases impliquées dans les voies Pi3K et MAPK (telles que JNK, p38 ou encore ERK) ont la capacité de phosphoryler la protéine Tau de manière semblable à ce qui est observé dans la MA. Par ailleurs, nombre de ces kinases ont en commun la possibilité de moduler la phosphorylation de la protéine kinase ribosomale S6 de 70 kDa (p70S6K) (Reynolds et *al.*, 2000; Ksiezak-Reding et *al.*, 2003 ; Zhang et *al.*, 2001). Et des taux significativement élevés de p70S6K et de ses substrats ont été retrouvés dans le cerveau de patients atteints de la MA (An et *al.* 2003). L'hypothèse privilégiée par les chercheurs est que p70S6K pourrait médier la phosphorylation de la protéine Tau. Les études effectuées démontrent que la phosphorylation et l'activation de p70S6K sont préférentiellement régulées par la voie Pi3K conjointement à la voie MAPK (An et *al.*, 2005). De plus, les travaux sur l'investigation du lien entre la phosphorylation de p70S6K et la protéine Tau ont révélé que p70S6K sous forme phosphorylée (p-p70S6K) est colocalisée avec les paires de filaments hélicoïdaux constitués de protéine Tau hyperphosphorylée au sein des ENF. Les mêmes travaux ont démontré une corrélation significative entre p-p70S6K et le taux de protéine Tau anormalement phosphorylée (An et *al.*, 2003). En outre, il existe une occurrence simultanée entre p-p70S6K et la progression de pathologies cérébrales associées à la protéine Tau (Pei et *al.*, 2006). Enfin, les données de Pei et ses collaborateurs démontrent que l'incubation de Tau avec p-p70S6K entraîne une phosphorylation de plusieurs sites de cette protéine, impliquant la probabilité d'une phosphorylation directe de Tau par p-p70S6K (Pei et *al.*, 2006).

L'exposition chronique de l'organisme au Zn serait donc capable d'activer p70S6K *via* les voies Pi3K et MAPK, qui à son tour pourrait phosphoryler la protéine Tau de manière directe et d'autres effecteurs de ces voies pourraient aussi impacter directement ou indirectement la phosphorylation de cette protéine.

Afin de déterminer le lien entre le Zn et la MA, d'autres équipes de chercheurs tentent d'évaluer l'impact du Zn sur les peptides A β .

Colocalisation du Zn avec les peptides A β :

Les expériences *in vitro* montrent que la présence de Zn induit une agrégation des peptides A β dans l'hippocampe et la région frontale. De plus, chez les sujets atteints de MA, le Zn est colocalisé avec ces mêmes peptides (*Figure 34*) (Miller et al., 2006 ; Bush et al., 1994).

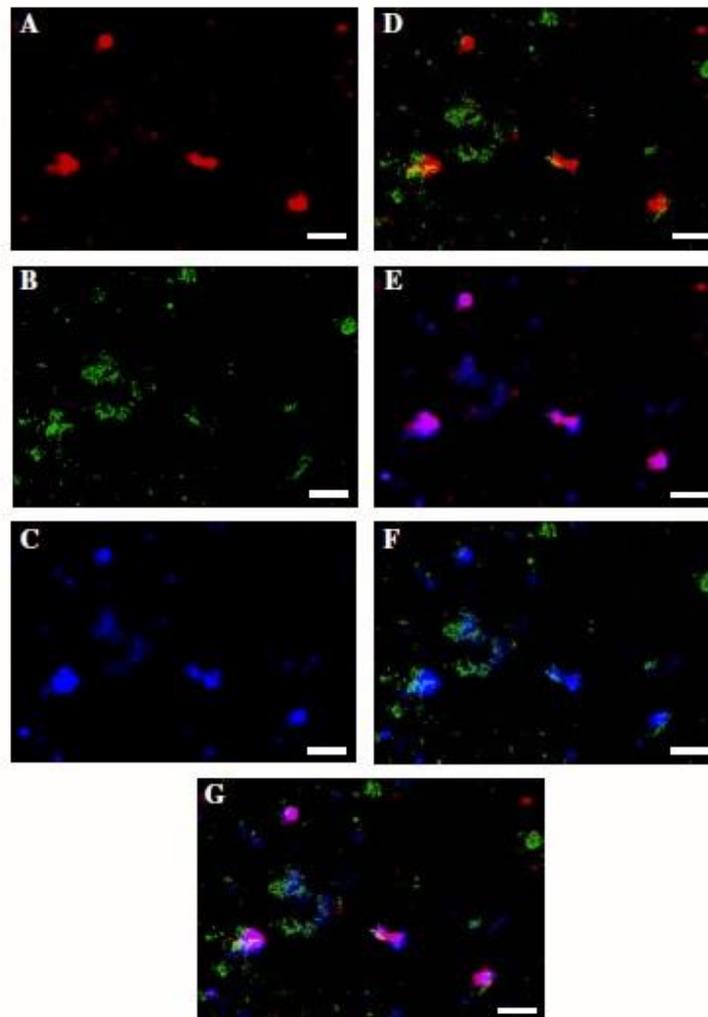


Figure 34 – Analyse microscopique de la localisation du Zn et des peptides A β dans les tissus cérébraux de patients atteints de MA par fluorescence synchrotron-rayons X (Miller et al., *Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn colocalized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease, Journal of Structural Biology, 2006*)

Des tissus cérébraux ont été prélevés après autopsie de deux cas confirmés de MA. Les tissus hippocampiques et frontaux ont été conservés pour analyse. **A** : L'analyse du Zn a été effectuée à l'aide d'une microsonde par la technique de fluorescence rayons-X (X-ray fluorescence microprobe) (en rouge). **B** : Les plaques amyloïdes ont été marquées grâce à une coloration par Thioflavine-S (en vert). **C** : la structure secondaire des protéines en feuillets β a été analysée par micro-spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (en bleu). **D** : Corrélation entre Zn et plaques amyloïdes. **E** : Corrélation entre Zn et protéines de structure en feuillets β . **F** : Corrélation entre plaques amyloïdes et protéines en feuillets β . **G** : Corrélation totale entre Zn, plaques amyloïdes et protéines en feuillets β .

L'image E montre l'importante corrélation entre la localisation du Zn et des protéines dont la structure secondaire est en feuillets β . Le Zn est donc vraisemblablement colocalisé avec les peptides A β dans les tissus hippocampiques et frontaux des sujets atteints de MA. L'image D présente une colocalisation moins évidente entre le Zn et les plaques amyloïdes, mais non négligeable. En revanche, les protéines en feuillets β (donc les peptides A β) sont comme attendu colocalisées avec les plaques amyloïdes, comme l'illustre l'image F (Miller et *al.*, 2006).

Afin de conclure sur la colocalisation entre Zn et peptides A β , des échantillons de plus grande ampleur doivent être étudiés, la présente publication ne prenant en compte que deux patients qui plus est sans contrôle sain. De plus, si le Zn semble colocalisé avec les peptides A β et en moindre proportion les plaques amyloïdes, ces résultats ne permettent pas d'affirmer que le Zn soit la cause de l'agrégation de ces peptides.

Comme le Fe et le Cu, le Zn est essentiel au fonctionnement de l'organisme, notamment du cerveau. Son homéostasie est primordiale dans l'intégrité des fonctions cérébrales. Les études s'intéressent particulièrement aux effets délétères d'un excès de Zn dans la MA, mais il semble qu'une carence en Zn présente également des effets néfastes qu'il faudrait approfondir.

2.9 Conclusion sur l'impact des métaux lourds dans la MA

De nombreux métaux lourds semblent impliqués dans la MA et les travaux parus à ce jour tendent à montrer qu'ils participent au développement de cette pathologie. Les hypothèses concernant les mécanismes d'action possibles suscitent un certain intérêt. Les différentes publications montrent que la plupart des métaux lourds favorisent le stress oxydatif de manière directe ou indirecte, ce qui pourrait en partie expliquer la neurodégénérescence observée dans la MA. L'interaction de certains ETM avec les neurotransmetteurs est également intéressante, notamment concernant les systèmes cholinergique et glutamatergique, dont on sait la fonction perturbée dans la MA. Les résultats les plus frappants restent sans nul doute l'impact des métaux lourds sur les peptides A β ou sur la phosphorylation de la protéine Tau, qui ne sont à ce jour que trop peu mis en avant dans les études. Cependant, il

n'existe pas encore de démonstration incontestable de l'impact des métaux lourds dans la MA, c'est pourquoi nombre des travaux parus sont encore contestés au sein de la communauté scientifique.

Par ailleurs, très peu d'équipes se sont intéressées à l'heure actuelle à l'effet de l'association de plusieurs métaux dans l'organisme, se limitant à l'étude de chaque métal séparément. Pourtant, l'organisme étant chaque jour exposé à un cocktail de ces ETM, il est probable que certains auront des effets toxiques synergiques sur le SNC alors que d'autres auront des effets antagonistes. Ces études peuvent alors au mieux être interprétées comme des mécanismes possibles de l'action individuelle de ces ETM sur le cerveau. Il serait donc très intéressant, bien qu'extrêmement complexe, d'étudier la relation entre les différents métaux lourds et leur impact possible dans la MA.

Pour finir, nous pouvons nous demander ce qu'il en est des compléments alimentaires et autres médicaments enrichis en certains métaux comme le Fe, le Cu, le Zn ou l'Al qui contiennent des taux bien supérieurs aux normes recommandées par les autorités sanitaires. Leur absorption dépend de leur biodisponibilité, mais l'exposition quotidienne à ces compléments pourrait favoriser la surcharge corporelle en métaux lourds.

Les métaux lourds ne sont cependant pas les seules substances suspectées comme ayant un impact dans les pathologies neurodégénératives. L'intérêt croissant pour les pesticides, les polluants industriels ou encore les nanoparticules et leurs propriétés toxiques sur de nombreuses fonctions biologiques a amené les chercheurs à étudier leur potentielle implication dans la MA.

3 Les Pesticides

3.1 Définition

Les pesticides sont des substances chimiques dont l'utilisation principale consiste à prévenir ou lutter contre les organismes jugés nuisibles aux cultures. Mais ils peuvent également être utilisés pour contrôler la croissance des végétaux ou améliorer leur transport et leur stockage. Il s'agit de substances très hétérogènes pouvant être classées selon leur cible (insecticides, rodenticides, molluscicides, fongicides, herbicides...), leur mode d'action, leur classe chimique ou encore la réglementation européenne à laquelle ils répondent (les produits phytopharmaceutiques, les biocides, les médicaments vétérinaires et les médicaments à usage humain). Les molécules d'une même classe chimique peuvent avoir des cibles bien distinctes (*Tableau 8*) (Baldi et al., 2013 ; Dufaure, 2012).

Famille chimique	Exemples de molécules	Classement selon cible
Organochlorés	DDT, Chlordane, Lindane, Dieldrine, Heptachlore...	Insecticides
Organophosphorés	Malathion, Parathion, Chlorpyrifos ^a , Diazinon...	Insecticides
Pyréthrinoides	Perméthrine...	Insecticides
Carbamates	Aldicarbe, Carbaryl, Carbofuran, Méthomyl	Insecticides
	Asulame, Diallate, Terbucarbe, Triallate	Herbicides
	Benthiavalicarbe	Fongicides
Dithiocarbamates	Mancozèbe, Manèbe...	Fongicides
Phtalimides	Folpel, Captane, Captafol	Fongicides
Triazines	Atrazine, Simazine...	Herbicides
Phénoxyherbicides	MCPA, 2,4-D, 2,4,5-T...	Herbicides
Chloroacétamides	Alachlore...	Herbicides
Pyridines, bipyridiliums	Paraquat, Diquat...	Herbicides
Aminophosponates glycine	Glyphosate	Herbicides

^a Appelé aussi Chlorpyrifos-éthyl en France

Tableau 8 - Exemple de classification des pesticides selon leur famille chimique et leur cible (Baldi et al., Expertise collective de l'Inserm, Pesticides : Effets sur la santé, Les éditions Inserm, 2013)

2,4-D: Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ; 2,4,5-T : Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique ; DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane ; MCPA : Acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique.

L'utilisation de ces substances a augmenté de manière exponentielle au cours des quarante dernières années en raison de l'accroissement de la population et de la demande croissante dans l'industrie agroalimentaire. Dans les années 2010, au niveau Européen, la France et l'Italie se situent en tête des ventes de pesticides en tonnes d'ingrédients actifs malgré une tendance à la baisse (*Figure 35*) (Baldi et al., 2013). Il existe de nombreuses familles de pesticides utilisées dans le domaine agroalimentaire dont l'utilisation est depuis plusieurs années très controversée en raison de leur effet néfaste sur l'environnement et la santé humaine. De nombreux pesticides ont un effet neurotoxique sur les nuisibles et peuvent avoir une action similaire sur l'organisme humain. L'usage de certaines molécules a ainsi été réglementé et des pesticides ont été retirés de la vente. Cependant, de nombreux pesticides restent à l'heure actuelle largement utilisés sur les récoltes destinées à la consommation, exposant la population à un risque toxique dépendant de leurs sources d'exposition (Yegambaram et al., 2015).

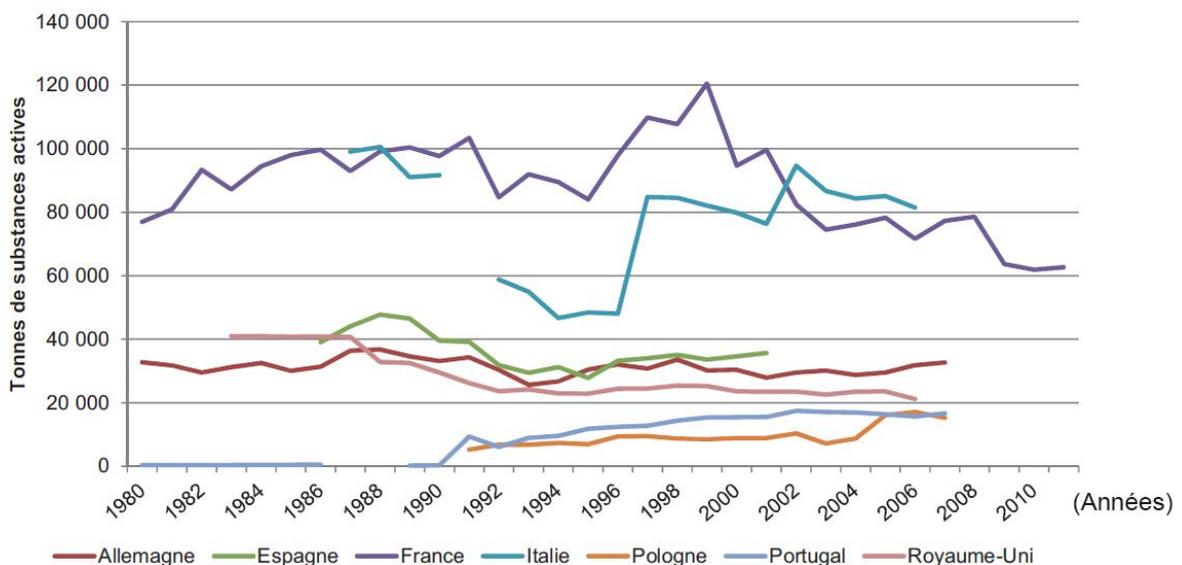


Figure 35 - Ventes de pesticides en tonnes de substances actives dans certains pays européens entre 1980 et 2010 (Baldi et al., Expertise collective de l'Inserm, Pesticides : Effets sur la santé, Les éditions Inserm, 2013)

3.2 Sources d'exposition

Une proportion importante des pesticides appliqués n'atteint pas la cible choisie et se disperse dans l'environnement. Dans le traitement des feuilles par exemple, les pertes sont estimées entre 10 et 70% sur les sols et entre 30 et 50% dans l'air (Sabbagh et De Menthière, 2005). Les pesticides peuvent être drainés dans les sols, contaminer l'eau, et polluer l'air environnant, représentant ainsi un danger à la fois pour les travailleurs agricoles, les consommateurs, mais aussi la population locale. La dégradation des différentes substances dans l'environnement dépend ensuite de plusieurs facteurs, comme leur structure chimique et les conditions climatiques, géochimiques ou environnementales. Certaines molécules sont dégradées en métabolites actifs qui exerceront l'activité toxique (Baldi et *al.*, 2013).

Concernant les travailleurs, l'exposition peut avoir lieu au moment de la préparation, du transport ou de l'épandage. Après cette étape, une certaine quantité de produit persiste dans les champs traités, mais aussi sur le matériel utilisé et les bâtiments. En France, pour limiter le risque d'exposition aux pesticides un arrêté datant de 2006 définit des délais de « ré-entrée » pour le travail dans les zones traitées en fonction des substances utilisées (*Tableau 9*) (Ramwell et *al.*, 2005 ; Baldi et *al.*, 2013).

Phrases de risque (au moins une des)	Délais de ré-entrée
Aucune	6 heures en milieu aéré 8 heures dans des locaux fermés (ex : serres)
R36 R38 R41	24 heures
R42 R43	48 heures

R36 : irritant pour les yeux ; R38 : irritant pour la peau ; R41 : risques de lésions oculaires graves ; R42 : peut entraîner une sensibilisation par inhalation ; R43 : peut entraîner une sensibilisation par contact de la peau

Tableau 9 - Délais de ré-entrée dans un espace traité en fonction du risque lié à l'utilisation des pesticides (Baldi et *al.*, Expertise collective de l'Inserm, Pesticides : Effets sur la santé, Les éditions Inserm, 2013)

En ce qui concerne la population générale, les chercheurs ont mis en évidence différents facteurs influençant l'exposition. Parmi eux, l'alimentation, la proximité du domicile avec un champ de culture, l'utilisation de pesticides à domicile ou encore la contamination du domicile par un travailleur exposé (Bouvier et *al.*, 2005). En France

91% des cours d'eau et 59% des eaux sous-terraines présentaient des traces de pesticides en 2007 (Commissariat général au développement durable, 2010). En Europe, la directive 98/83/E relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine fixe à 0,1 µg/L la concentration maximale pour chaque pesticide et à 0,5 µg/L la concentration maximale de l'ensemble des pesticides présents dans l'eau (Directive 98/83/E).

Alors que certaines molécules ont une demi-vie de quelques heures ou jours (l'atrazine par exemple, dans la famille des triazines, dans certaines conditions), d'autres ont des demi-vies beaucoup plus importantes, jusqu'à plusieurs dizaines d'années (par exemple les organochlorés comme le Dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT, ou l'hexachlorobenzène ou HCB). Ce sont ces dernières qui inquiètent particulièrement les autorités sanitaires en raison de leur persistance dans l'environnement. Malgré les nombreuses interdictions, ils peuvent en effet être retrouvés dans les tissus humains plusieurs décennies après l'arrêt de commercialisation (Yegambaram et *al.*, 2015).

Les pesticides sont cités dans l'implication de nombreux cancers et un lien a été officiellement reconnu avec la maladie de Parkinson (Décret n° 2012-665 du 4 mai 2012 sur les maladies professionnelles en agriculture). Les parties suivantes de la présente thèse étudieront la neurotoxicité de ces substances et leur lien possible avec la MA en fonction de leur classification chimique.

3.3 Différentes classes chimiques de pesticides

3.3.1 Pesticides organochlorés

3.3.1.1 Généralités

Les pesticides organochlorés (OC) sont des insecticides obtenus par chloration de différents hydrocarbures aromatiques ou alicycliques. Le DDT, leur chef de file, a été mis sur le marché en 1942 pour la lutte anti-vectorielle contre le paludisme. Son utilisation irraisonnée à large échelle a cependant été à l'origine de résistances et d'effets toxiques sur les espèces non visées, notamment les oiseaux. C'est pourquoi l'utilisation phytosanitaire du DDT a été prohibée dès 1972 en Europe et en France la dernière spécialité anti-poux à base de DDT disparaît en 1998. Par la suite, de nombreux organochlorés ont été retirés du marché en raison de leur cancérogénicité

chez l'animal ou de leur forte persistance dans l'environnement. A l'heure actuelle, ils ne sont donc plus utilisés dans les pays industrialisés (Dufaure, 2012).

3.3.1.2 Propriétés physicochimiques et toxicocinétiques des organochlorés

Les organochlorés appartiennent à une classe hétérogène d'insecticides, mais présentent cependant des caractéristiques communes. Ce sont des composés très lipophiles et rémanents, présentant la capacité de se bioaccumuler dans les tissus. Ils présentent une structure chimique très stable et sont ainsi extrêmement résistants à la dégradation, que ce soit dans l'environnement ou dans l'organisme (Coats, 1990).

La lipophilie importante des organochlorés leur permet d'être efficacement absorbés et de s'accumuler préférentiellement dans les tissus riches en graisses tels que le foie, le tissu adipeux et le cerveau. Leur demi-vie peut atteindre une dizaine d'années dans l'environnement. La demi-vie du DDT chez l'homme atteint 3,4 ans (Dufaure, 2012).

3.3.1.3 Mécanismes d'actions des organochlorés

En raison de l'hétérogénéité de leurs sites d'action, les organochlorés peuvent être divisés en deux groupes distincts : les diphényles aromatiques et les organochlorés alicycliques (Coats, 1990).

Diphényles aromatiques :

Il s'agit du groupe le plus ancien qui comprend le DDT et ses dérivés. Les molécules de ce groupe présentent la même structure de base dont découle leur mécanisme d'action (*Figure 36*).

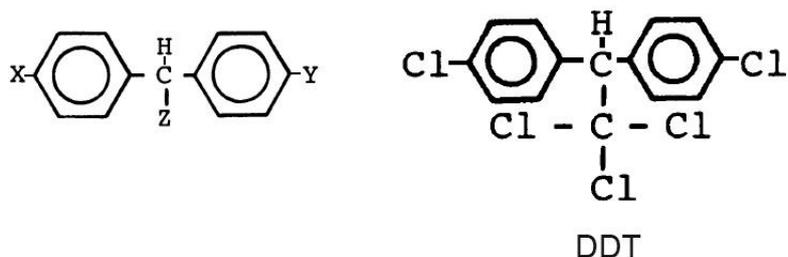


Figure 36 – Structure du DDT et des pesticides organochlorés apparentés au DDT (Coats JR; Mechanisms of Toxic Action and Structure-Activity Relationships for Organochlorine and Synthetic Pyrethroid Insecticides; Environmental Health Perspectives, 1990)

Les lettres X, Y et Z représentent les substitutions possibles de la molécule.

Leur toxicité, découverte par Holan, s'exerce en premier lieu dans le SNP au niveau des canaux sodiques axonaux. Ils empêchent alors la fermeture de ce canal après la dépolarisation membranaire, provoquant une fuite d'ions sodium à travers la membrane neuronale et créant ainsi une hyperexcitabilité (Holan, 1969).

Organochlorés alicycliques :

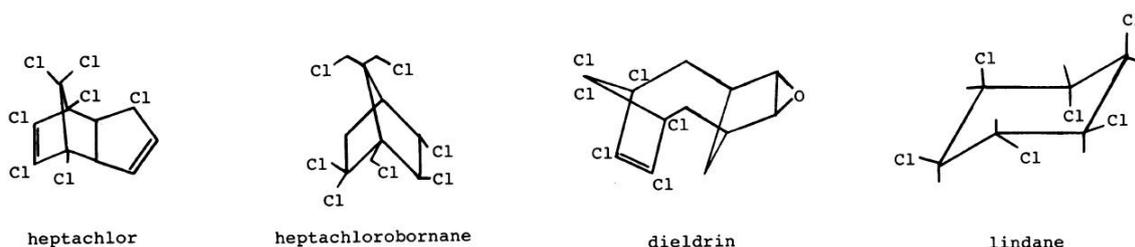


Figure 37 - Structures de quatre organochlorés alicycliques (Coats JR; Mechanisms of Toxic Action and Structure-Activity Relationships for Organochlorine and Synthetic Pyrethroid Insecticides; Environmental Health Perspectives, 1990)

Le mécanisme d'action de ce deuxième groupe d'organochlorés a été élucidé plus récemment. Il implique la liaison de ces molécules au site de la picrotoxine du récepteur ionophore GABA_A, inhibant ainsi l'influx d'ions chlore au sein du neurone et favorisant une hyperexcitabilité neuronale (Bloomquist et Soderlund, 1985).

3.3.2 Pesticides organophosphorés

3.3.2.1 Généralités

Les organophosphorés (OP) sont eux aussi utilisés comme insecticides. Ce sont des amides ou esters des acides phosphorique, phosphonique, thiophosphorique et thiophosphonique (*Figure 38*).

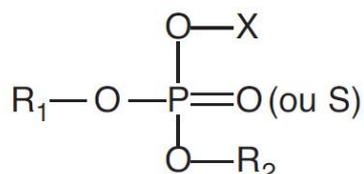


Figure 38 - Structure commune aux organophosphorés (Testud et Grillet, *Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers, Toxicologie - Pathologie professionnelle, 2007*)

R₁ et R₂ représentent des radicaux alkyles et X représente un substituant.

Le premier organophosphoré à voir le jour est le tétraéthyl-pyrophosphate dès 1930 en Allemagne, mais il s'est avéré trop toxique et instable pour une utilisation à large échelle. A la même époque, la recherche s'oriente vers l'utilisation de ces molécules comme armes chimiques avec la production du tabun et du sarin. Il faut attendre 1944 avec la synthèse du parathion pour une utilisation en agriculture et dans la lutte antivectorielle. La production mondiale des organophosphorés a connu une croissance exponentielle entre 1955 et 1985 en raison des nombreuses interdictions concernant les organochlorés. Cependant, les intoxications involontaires comme volontaires survenues avec ces produits ont par la suite entraîné, dans les pays industrialisés, leur remplacement par des classes d'utilisation plus sûre (Testud et Grillet, 2007).

3.3.2.2 Propriétés physicochimiques et toxicocinétiques des organophosphorés

Les OP sont en grande majorité des substances très lipophiles et peu volatiles. Ce sont des composés instables qui subissent une hydrolyse rapide au contact du sol et des végétaux. Le risque de contamination de l'eau et des aliments est ainsi très réduit. Certaines de ces molécules doivent subir une activation métabolique par les cytochromes P-450 (CYP) hépatiques pour exercer leur activité toxique. C'est notamment le cas du malathion et du parathion (Testud et Grillet, 2007).

En milieu professionnel, l'absorption cutanée est la principale source d'exposition et représente de 3 à 6% de la dose selon le produit utilisé. L'absorption par voie orale est très importante en raison de la liposolubilité des produits et peut atteindre 70 à 100% de la dose ingérée. Les molécules se distribuent par la suite dans tous les tissus et traversent efficacement la BHE. Les composés les plus lipophiles sont majoritairement stockés dans les tissus riches en graisses. Puis, les molécules mères et leurs métabolites sont hydrolysés et conjugués afin d'être éliminés majoritairement dans les urines (Testud et Grillet, 2007). En cas d'exposition modérée, environ 80% de la dose absorbée est éliminée dans les 48h suivant l'ingestion. Certains OP ont cependant une demi-vie plus longue, comme le chlorpyrifos avec 41 heures (Griffin et *al.*, 1999). De plus, au cours d'une ingestion massive, certains métabolites actifs peuvent être retrouvés dans les urines durant plusieurs semaines en raison d'un relargage à partir du tissu adipeux (Vale, 1998).

3.3.2.3 Mécanisme d'action des organophosphorés

La cible principale des OP est l'AchoE, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'Acho. L'inhibition irréversible de l'AchoE entraîne alors une accumulation d'Acho au niveau synaptique ainsi qu'au niveau de la plaque motrice. Leur toxicité est donc exclusivement neurologique avec l'association d'effets nicotiniques, muscariniques et centraux. L'exposition chronique entraîne des manifestations psycho-neurologiques avec une altération des capacités cognitives dose-dépendante (Farahat et *al.*, 2003).

L'affinité pour l'AchoE varie selon la conformation de la molécule, ce qui explique les disparités en termes d'action toxique au sein de la classe (*Figure 39*) (Testud et Grillet, 2007).

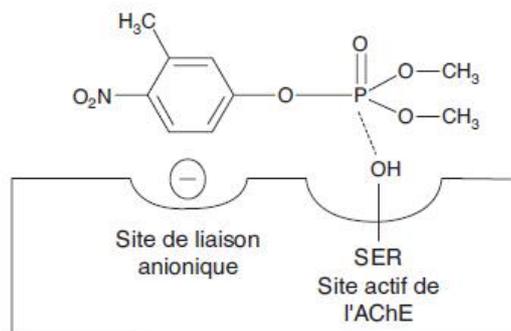


Figure 39 - Schéma du mécanisme d'action des organophosphorés (Testud et Grillet, *Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers, Toxicologie - Pathologie professionnelle*, 2007)

Les OP présentent tous deux sites de liaison à l'AChE, un site anionique, chargé négativement, et un site de liaison à la sérine qui constitue le site actif de l'enzyme. La liaison de la molécule à l'AChE entre en compétition avec l'acétylcholine pour inhiber sa dégradation par l'enzyme. L'acétylcholine s'accumule alors dans la fente synaptique ce qui entraîne la toxicité des OP.

SER : Serine ; AchE : Acétylcholinestérase.

Les OP ont également la capacité d'inhiber la butyrylcholinestérase plasmatique (pseudocholinestérase), ainsi que d'autres estérases non spécifiques. Cependant, aucun signe clinique ne découle de ces interactions qui ne sont étudiées que dans le diagnostic des intoxications aiguës. De plus, les chercheurs ont découvert une autre cible des OP, la « neuropathy target esterase » (carboxylestérase présente dans la myéline) qui intervient dans le métabolisme lipidique neuronal et dont le dysfonctionnement serait à l'origine d'un syndrome neurotoxique retardé avec dégénérescence neuronale (Testud et Grillet, 2007).

Cependant, les cibles évoquées ne représentent en réalité que 20% des sites de liaison des OP au niveau cérébral et une multitude de cibles secondaires reste encore à découvrir.

3.3.3 Carbamates anticholinestérasiques

3.3.3.1 Généralités

Les carbamates sont des insecticides dérivés de l'acide carbamique (Figure 40).

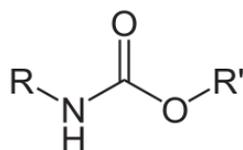


Figure 40 - Structure générale des carbamates (Dufaure, Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie; Insecticides et santé humaine : Aspects toxicologiques, épidémiologiques et juridiques, 2012)

R et R' représentent des groupes alkyles.

Leur découverte remonte aux années 1950 et ils partagent le mécanisme d'action des OP, ainsi que leurs utilisations. En raison de graves intoxications aux OP, ces derniers ont peu à peu été remplacés par les carbamates et une autre classe de pesticides, les pyréthriinoïdes. Cependant, comme pour les OP, certains carbamates ont été retirés du marché en raison du durcissement de la réglementation et ils ont à présent quasiment disparu des insecticides à usage ménager en faveur des pyréthriinoïdes de synthèse (Testud et Grillet, 2007).

3.3.3.2 Propriétés physicochimiques et toxicocinétiques des carbamates

Les carbamates sont pour la plupart des substances très lipophiles et peu volatiles. Leur cinétique est similaire à celle des OP : leur absorption par voie digestive est très rapide et quasi-complète et ils possèdent une bonne absorption cutanée. Cette dernière voie est la source d'exposition majoritaire chez les travailleurs exposés. Ils sont par la suite distribués dans tous les tissus, notamment les plus riches en graisses et ont la capacité de traverser la BHE ainsi que le placenta. Leur métabolisation par les CYP hépatiques et leur conjugaison permet ensuite leur élimination dans les urines dans les 24h qui suivent l'absorption. Parmi les carbamates, tous ont une activité directe sur l'AchoE, sauf le thiodicarbe qui nécessite une activation métabolique (Dufaure, 2012).

3.3.3.3 Mécanisme d'action des carbamates

Le mécanisme d'action des carbamates est le même que celui des OP. En effet, ils ont la capacité d'inhiber de manière réversible les différentes cholinestérases, leur cible prédominante étant l'AchoE. De même que pour les OP, l'intoxication aiguë résulte en une conjonction de syndromes nicotiniques, muscariniques et centraux qui expliquent leur toxicité. Cependant, la symptomatologie est ici de plus courte durée que pour les OP en raison de l'hydrolyse spontanée de la liaison carbamate-AchoE qui n'est ici que de quelques heures. Le pronostic en cas d'intoxication aiguë est ainsi favorable dans la majorité des cas (Testud et Grillet, 2007).

3.3.4 Pyréthrinoïdes de synthèse

3.3.4.1 Généralités

Ces molécules sont des analogues synthétiques des alcaloïdes naturellement présents dans la fleur du Pyrèthre (*Chrysanthemum Cinerariaefolium*). En termes de structure chimique, ce sont des esters de l'acide cyclopropane-carboxylique (Figure 41).

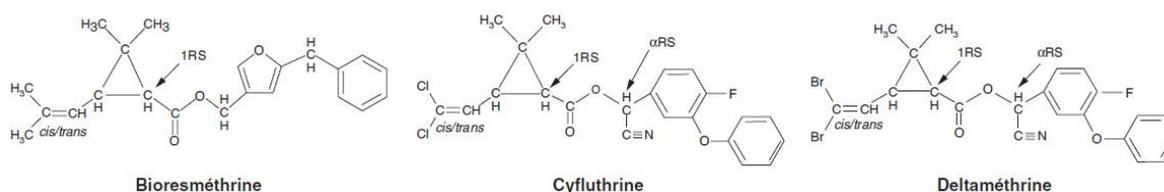


Figure 41 - Structures de quelques pyréthrinoïdes de synthèse (Testud et Grillet, *Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers, Toxicologie - Pathologie professionnelle*, 2007)

Les alcaloïdes naturels du Pyrèthre ont été utilisés jusque dans les années 1940 et remplacés ensuite par des molécules synthétiques toujours utilisées à l'heure actuelle. L'inconvénient dans l'utilisation des pyréthrinoïdes de synthèse est leur inactivation à la lumière qui compromet leur efficacité en extérieur. On distingue deux familles de pyréthrinoïdes de synthèse, la première comportant les dérivés les plus photolabiles et la seconde des dérivés photostables.

La toxicité des classes d'insecticides citées précédemment a fait des pyréthrinoïdes les molécules les plus utilisées de nos jours dans le secteur

phytosanitaire. En effet, ce sont des molécules efficaces à très faibles doses, très peu toxiques pour l'homme et les autres mammifères et qui ne présentent pas de persistance dans l'environnement. Elles représentent à présent plus de 50% du marché mondial des insecticides (Testud et *al.*, 2001).

3.3.4.2 Propriétés physicochimiques et toxicocinétiques des pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes de synthèse sont des produits très lipophiles et peu volatils. Après utilisation, ils sont adsorbés par les particules du sol et subissent une hydrolyse rapide, d'où l'absence de persistance dans l'environnement qui limite leur toxicité (Bradberry et *al.*, 2005).

Leur biodisponibilité est faible, toutes voies confondues. L'absorption cutanée est inférieure à 1%, de même que l'absorption pulmonaire. Après ingestion, les pyréthrinoïdes sont hydrolysés par des estérases digestives dont l'action limite l'absorption intestinale. Celle-ci peut cependant atteindre 60% de la dose ingérée pour certaines molécules. Leur distribution s'effectue dans tous les tissus, mais préférentiellement ceux riches en graisses. Ils sont ensuite rapidement métabolisés au niveau hépatique en métabolites inactifs qui subissent une conjugaison avant d'être éliminés par voie principalement rénale. A titre d'exemple, la demi-vie de la deltaméthrine se situe entre 10 et 13 heures (Bradberry et *al.*, 2005).

3.3.4.3 Mécanisme d'action des pyréthrinoïdes

La toxicité des pyréthrinoïdes est très variable en fonction des molécules. Les composés du groupe 2 (ou de 2^{ème} génération) sont plus toxiques que ceux du groupe 1 (1^{ère} génération). Selon les hypothèses, leur toxicité serait due à une interaction avec les canaux sodiques membranaires des axones. Ils prolongeraient le temps d'ouverture de ces canaux après le potentiel d'action, inhibant ainsi l'inactivation de ce dernier. L'absence de repolarisation membranaire conduit par la suite à la libération de divers neurotransmetteurs et finit par bloquer la conduction nerveuse. De plus, concernant les molécules du groupe 2, un effet anti-GABAergique a été mis en évidence, ainsi qu'une interaction avec les canaux calciques ou encore

avec des enzymes mitochondriales. Cependant ces mécanismes n'ont à l'heure actuelle pas été élucidés (Soderlund et *al.*, 2002).

3.3.5 Néonicotinoïdes

3.3.5.1 Généralités

Cette dernière classe d'insecticides a été découverte de manière fortuite dans les années 70. La première molécule de cette classe fut la Nithiazine dont l'importante photosensibilité a empêché son utilisation agricole (Jeschke et Nauen, 2008). Suite à d'intenses recherches, l'Imidaclopride fut le premier néonicotinoïde introduit sur le marché en 1991. Ils sont peu à peu devenus une alternative aux autres classes de pesticides au même titre que les pyréthrinoïdes de synthèse et occupent aujourd'hui la première place mondiale en terme de ventes.

Les néonicotinoïdes peuvent être classés selon leur structure chimique qui détermine leur activité, leur photostabilité, ainsi que leur toxicité (*Tableau 10*) (Bodereau, 2011).

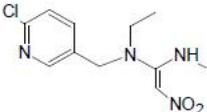
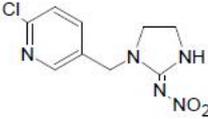
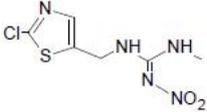
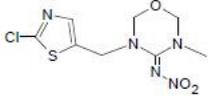
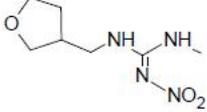
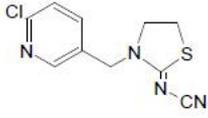
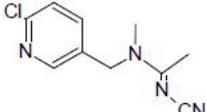
pharmacophores [-N-C(E)=X-Y]	composés à cycle de 5 et 6 éléments	composés à chaîne ouverte
nitroenamines/nitrométhylènes [-N-C(E)=CH-NO ₂]	nithiazine 	nitenpyrame 
	imidaclopride 	clothianidine 
N-nitroguanidines/N-nitro-imines [-N-C(E)=N-NO ₂]	thiaméthoxame 	dinotefuran 
N-cyano-amidines/N-cyano- imines [-N-C(E)=N-CN]	thiaclopride 	acétamipride 

Tableau 10 - Structures chimiques des néonicotinoïdes (Bodereau, Récepteurs nicotiniqes neuronaux d'insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes, Thèse en Neurosciences de l'Université d'Angers, 2011)

3.3.5.2 Propriétés physicochimiques et toxicocinétiques des néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont les insecticides les moins persistants dans l'environnement avec une demi-vie estimée entre 2 et 3 mois. Ils sont de plus efficaces à bien plus faibles doses que les autres pesticides du marché, d'où leur utilisation croissante au détriment des autres molécules (Gupta et Gajbhiye, 2007).

Ce sont des produits très peu volatils. Leur absorption par inhalation est donc négligeable, tout comme leur absorption cutanée. L'absorption digestive en revanche est rapide et complète, mais la BHE est peu perméable à ces composés. La métabolisation hépatique donne naissance à de nombreux métabolites excrétés majoritairement par voie biliaire et faiblement par voie rénale. Pour l'Imidaclopride, par exemple, plus de 95% de la dose absorbée *per os* est éliminée dans les 48 heures (Testud et Grillet, 2007).

3.3.5.3 Mécanisme d'action des néonicotinoïdes

Ce sont des agonistes des récepteurs nicotiques à l'Acho. Leur particularité réside dans leur forte sélectivité pour les récepteurs des insectes en comparaison avec les récepteurs de mammifères (*Tableau 11*). En effet, après les pyréthriinoïdes, les néonicotinoïdes possèdent le facteur de sélectivité le plus intéressant. Ce dernier est évalué par le rapport entre la dose létale 50 (DL₅₀, dose causant le décès de 50% des individus testés) des mammifères et celle des insectes pour un insecticide donné. Plus ce facteur est important, plus la sélectivité pour les récepteurs des insectes est importante (Bodereau, 2011). Cette sélectivité confère aux néonicotinoïdes une meilleure innocuité pour l'homme que la plupart des insecticides (Elbert et *al.*, 2008).

Classe de pesticides	Facteur de sélectivité
Pyréthriinoïdes	4500
Néonicotinoïdes	456
Organochlorés	91
Organophosphorés	33
Carbamates	11

Tableau 11 - Facteurs de sélectivité des différentes classes de pesticides (Bodereau, Récepteurs nicotiques neuronaux d'insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes, Thèse en Neurosciences de l'Université d'Angers, 2011)

Les pyréthriinoïdes présentent une bien meilleure sélectivité que les néonicotinoïdes. Cependant ces derniers possèdent en plus une action systémique qui offre une protection aux plantations de la semence à l'âge adulte (Bodereau, 2011).

3.4 Liens entre l'exposition aux pesticides et le développement de la MA

Les autorités sanitaires ont reconnu qu'il existait un lien de causalité entre l'exposition aux pesticides et le développement de la maladie de Parkinson. En effet, en 2012 est paru un décret reconnaissant la maladie de Parkinson comme maladie professionnelle due à l'utilisation de pesticides (Décret n° 2012-665 du 4 mai 2012). Mais qu'en est-il pour la MA ?

3.4.1 Etudes de cohortes

Plusieurs études de cohortes ont été menées dans différents pays afin de déterminer s'il existe un lien entre l'exposition aux pesticides et la survenue de la MA. Si les études cas-témoins n'ont pas donné de résultats concluants, les études de cohortes procurent des données différentes. Une équipe de l'INSERM présente les résultats de trois cohortes (Tyas et *al.*, 2001 ; Baldi et *al.*, 2003 ; Hayden et *al.*, 2010). La première a été effectuée au Canada sur 694 patients, la seconde en France sur 1 507 patients et la dernière aux Etats-Unis sur 3 084 patients. Ces cohortes mettent toutes trois en évidence un risque de MA plus élevé chez les personnes exposées aux pesticides après ajustement sur l'âge, le sexe, le niveau d'études, ainsi que le gène de l'APOE pour l'étude américaine et le tabagisme pour l'étude française. L'étude canadienne obtient un risque de développer une MA multiplié par 4 chez les utilisateurs de fumigants et défoliants et multiplié par plus de 2 chez les agriculteurs (Tyas et *al.*, 2001). L'étude française retrouve un risque de MA doublé chez les hommes exposés aux pesticides durant leur vie professionnelle, mais pas chez les femmes (*Tableau 12*). Selon l'enquête, ces résultats s'expliquent par le fait que les tâches agricoles effectuées par les hommes et par les femmes diffèrent (Baldi et *al.*, 2003).

		RR	RR ajusté	IC 95%
Exposition professionnelle	Hommes	2,86	2,39	1,02 ; 5,63
	Femmes	1,23	0,89	0,49 ; 1,62
Emploi en agriculture	Hommes	1,75	1,32	0,43 ; 1,10
	Femmes	1,15	0,85	0,40 ; 1,86
Résidence Rurale	Hommes	0,96	0,74	0,30 ; 1,86
	Femmes	0,93	0,76	0,44 ; 1,31
Résidence dans un quartier avec vignobles	Hommes	1,00	0,84	0,35 ; 2,01
	Femmes	1,03	0,88	0,52 ; 1,50

Tableau 12 - Incidence de la MA entre les 5 et 10 ans de suivi de l'étude PAQUID de 1992 à 1998 (Baldi et al., *Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly, American Journal of Epidemiology, 2003*)

Sur les 1 507 patients de l'étude PAQUID, 96 ont été sélectionnés pour mesurer l'incidence de la maladie. Les sujets ont été inclus avant le développement de la MA, ils étaient donc tous exempts de pathologie au commencement de l'étude. L'exposition aux pesticides a été déterminée à l'aide de questionnaires. Les données ont été analysées sur un modèle de régression de Cox, l'évènement étudié étant la découverte de la MA. RR : Risque Relatif ; RR ajusté : Risque Relatif ajusté à l'éducation et au tabac ; IC 95% : Intervalle de Confiance à 95%.

Pour finir, l'étude américaine évoque une augmentation de 40 à 50% du risque de développement d'une MA chez les personnes exposées aux pesticides (Hayden et al., 2010).

Les résultats des trois cohortes sont significatifs. Cependant, ils reposent sur des interrogatoires, donc des données subjectives. Les résultats sont donc soumis au biais de la mémoire des personnes interrogées. De plus, ils peuvent être remis en question en considérant le manque de fiabilité des réponses fournies par des patients atteints de démence ou même par leurs proches qui n'ont bien souvent pas pris part à l'activité agricole (Baldi et al., 2013).

Enfin, une étude écologique andalouse a comparé en 2011 les données d'hospitalisation pour MA dans des régions à forte ou à faible utilisation de pesticides et a démontré une corrélation significative entre l'utilisation des pesticides et la MA (Parron et al., 2011).

A ce jour il existe encore trop peu d'études sur le lien entre MA et utilisation de pesticides. Les résultats des études de cohortes et l'étude écologique concluent sur un lien significatif entre l'exposition aux pesticides et le développement de la MA, sans étudier les classes de pesticides séparément. Deux équipes de chercheurs ont tenté d'explorer le lien entre les organophosphorés et la maladie en raison de leur impact sur le système cholinergique, mais n'ont pas pu démontrer de risque supérieur à celui des pesticides dans leur globalité (Gun et *al.*, 1997 ; Hayden et *al.*, 2010).

Il est de plus probable que l'exposition à la fois des travailleurs agricoles et de la population générale à plusieurs pesticides différents de manière simultanée entraîne une toxicité synergique. La partie ci-dessous s'intéressera à cette toxicité en lien avec la MA et ses lésions.

3.4.2 Taux sériques et cérébraux de pesticides

Concernant les taux sanguins de pesticides, une étude de grande ampleur montre que les taux observés chez les patients atteints de MA sont significativement plus élevés que chez les contrôles (*Figure 42*) (Richardson et *al.*, 2014).

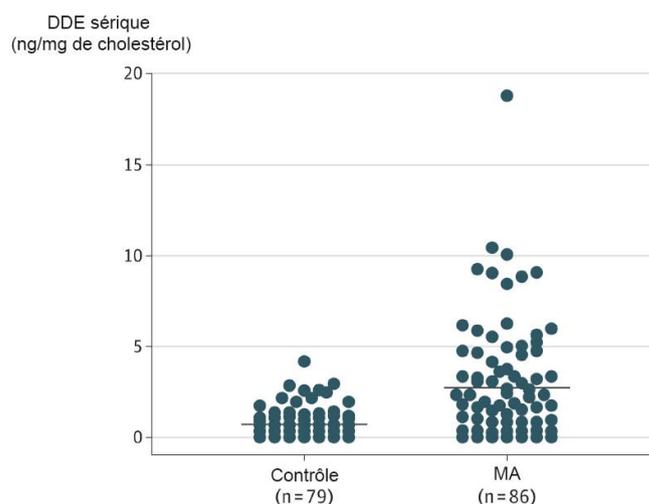


Figure 42 - Taux sériques de DDE chez les patients atteints de MA (Richardson et al., Elevated Serum Pesticide Levels and Risk for Alzheimer Disease, JAMA Neurology, 2014)

Des échantillons sanguins ont été prélevés sur des sujets exempts de pathologie neurodégénérative (contrôles) dont le MMSE se situe entre 28 et 30 et ne présentant aucune anomalie cérébrale, et des sujets atteints de MA selon les critères du National Institute of Neurological and Communicative Disorders et de l'Alzheimer Disease and Related Disorders Association. Au total, 79 contrôles et 86 sujets atteints de la MA ont été testés. Les taux sériques de DDE ont été déterminés par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Les valeurs moyennes obtenues pour les contrôles et les sujets atteints de MA sont respectivement de 0.69 [0.1] ng/mg de cholestérol et 2.64 [0.35] ng/mg de cholestérol. Les données ont été analysées par test non paramétrique Kruskal-Wallis ($p < 0.001$).

Pour le Dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE, métabolite du DDT), par exemple, ils sont trois à quatre fois plus importants, même après ajustement par rapport au génotype de l'APOE. L'étude montre que les taux cérébraux de DDE chez les patients atteints de MA sont significativement corrélés aux taux sanguins. Ces derniers sont donc un bon reflet de la charge cérébrale en DDE (Richardson et al., 2014). Une autre étude a confirmé ces résultats pour plusieurs organochlorés (Singh et al., 2013).

3.4.3 Mécanismes d'action des pesticides potentiellement en lien avec la MA

Développement de troubles cognitifs :

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les effets des pesticides sur la cognition. La grande majorité d'entre elles s'est concentrée sur les organophosphorés en raison de leur mécanisme d'action, ainsi que sur les carbamates en moindre proportion.

Dans les années 90, quatre études transversales ont comparé les performances cognitives de patients ayant subi une intoxication aiguë massive aux organophosphorés et les performances des proches de ces mêmes patients n'ayant pas été intoxiqués. Ces études ont toutes mis en évidence une diminution des performances aux tests réalisés, notamment concernant la mémoire, l'abstraction et l'attention visuelle (Savage et *al.*, 1988 ; Rosenstock et *al.*, 1991 ; Reidy et *al.*, 1992 ; Steenland et *al.*, 1994). Cependant, la grande variabilité des paramètres utilisés, notamment les modalités d'exposition, les molécules étudiées et le délai entre l'exposition et les tests cognitifs, empêche de conclure fermement sur l'effet des pesticides (Baldi et *al.*, 2013). Dans des études plus récentes, une diminution aux tests cognitifs a été observée chez les travailleurs exposés de façon aiguë aux pesticides agissant sur le système cholinergique par rapport aux travailleurs non exposés, avec des effets plus néfastes chez les sujets exposés aux organophosphorés qu'aux carbamates (*Tableau 13*). De plus, l'effet de l'intoxication aiguë sur la cognition était comparable à celui d'une exposition chronique de plus de dix ans (Wesseling et *al.*, 2002 ; Roldan-Tapia et *al.*, 2006).

Test Neurocomportemental	Exposés Moyenne (ET) n = 81	Non exposés Moyenne (ET) n = 130	Différence Brute des Moyennes	Coefficient de Régression (a)	IC 95% (b)	Direction (c)
Test de rétention visuelle de Benton	6.3 (2.2)	6.9 (2.1)	-0.5*	-0.4	-1.0, 0.2	-
Test d'apprentissage auditivo- verbal de Rey-Taylor	8.5 (2.9)	8.6 (2.5)	-0.1	-0.2	-0.9, 0.6	-
DVT	218 (49)	218 (55)	0	-9	-24, 7	+
Test de mémoire des chiffres	4.2 (1.6)	4.5 (2.0)	-0.3	-0.1	-0.7, 0.4	-
Test de dextérité (deux mains)	53.02 (7.9)	54.7 (8.5)	-1.7	-1.3	-3.7, 1.2	-
Visée en poursuite (PAIL)	60.8 (14.1)	63.3 (16.4)	-2.5	-5.3	-14.2, 3.6	-
Test de tapotement des doigts	92.1 (14.4)	94.0 (13.2)	-1.9	-2.4	-6.4, 1.7	-
Temps moyen de réaction simple	314 (78)	301 (65)	13	21*	-1, 43	-
Test des Chiffres et Symboles (DST)	28.3 (8.7)	30.8 (12.0)	-2.5*	-2.7†	-5.3, -0.1	-
Test des tracés - A	82.3 (34.31)	75.5 (31.5)	9.8	7.1	-2.4, 16.7	-
Test des cubes de Kohs	14.1 (8.0)	15.3 (7.8)	-1.2	-1.5	-3.6, 0.7	-
Vocabulaire	26.2 (12.9)	29.2 (16.5)	-3.0	-3.1	-7.4, 1.2	-
Questionnaire Q16 (symptômes neurotoxiques)	9.1 (4.2)	6.5 (3.8)	2.6‡	1.7‡	0.5, 3.0	-
Inventaire abrégé de symptômes	45.8 (25.3)	26.8 (40.7)	19.0‡	15.7‡	5.5, 25.8	-

Tableau 13 - Comparaison des performances de sujets exposés ou non à des pesticides anticholinestérasiques à différents test neurocomportementaux standardisés (Wesseling et al., Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticides among banana workers, International Journal of Occupational and Environmental Health, 2002)

L'étude a été conduite sur des hommes du Costa Rica âgés de 15 à 55 ans ayant travaillé au moins un an dans une plantation de bananiers et n'ayant aucun antécédent médical pouvant interférer avec l'analyse. Les sujets ayant été victimes d'une contamination systémique d'origine professionnelle dans l'année précédant l'étude ont été inclus dans le groupe « exposés ». Le reste des sujets exposés a été identifié à partir de rapports d'accidents professionnels obligatoires au National Insurance Institute. Au total 81 sujets ont été sélectionnés pour former le groupe « exposés ». Un groupe contrôle de 130 travailleurs non exposés a été constitué au hasard parmi les sujets ayant travaillé dans des plantations de bananiers, la condition d'inclusion étant qu'ils n'aient jamais été traités pour une intoxication aiguë aux pesticides. Dans ce groupe contrôle ont été inclus à la fois les employés n'ayant jamais été en contact avec les pesticides anticholinergiques et ceux ayant travaillé avec ces derniers à différents degrés.

a : ajusté sur l'âge, l'éducation, l'exposition à long terme aux inhibiteurs de cholinestérase, la consommation d'alcool, l'exposition aux solvants, la perte de connaissance, l'examineur, l'heure du test et les taux plasmatiques de cholinestérase. **b** : Intervalle de confiance à 95%. **c** : la direction indique si les sujets exposés ont réalisé une meilleure performance « + » ou une moins bonne performance « - » que les contrôles.

ET : Ecart Type ; DVT : Digit Vigilance Test ; PAIL : Pursuit Aiming II test ; DST : Digit-symbol test ; * : $p < 0,10$; † : $p < 0,05$; ‡ : $p < 0,01$ (logiciel d'analyses statistiques BMDP).

Comme le présente le tableau 13, les performances aux tests neurocomportementaux des sujets exposés de manière aiguë aux pesticides anticholinestérasiques sont systématiquement moins bonnes que celles des contrôles, hormis une. Malgré le fait que toutes les variations ne soient pas significatives, l'exposition aiguë aux OP et carbamates semble entraîner un déclin des fonctions cognitives des sujets en comparaison avec des sujets n'ayant pas souffert d'intoxications (Wesseling et al., 2002).

La même conclusion a été apportée suite à une attaque au gaz sarin, organophosphoré, à Tokyo. Chez les personnes exposées, des troubles mnésiques se sont manifestés trois ans après l'attentat (Nishiwaki et al., 2001).

Au sujet des intoxications chroniques, les résultats sont similaires. La plupart des études décrivent une altération des performances aux tests cognitifs chez les travailleurs exposés chroniquement aux IACoE (Roldan-Tapia et *al.*, 2005 ; Rohlman et *al.*, 2007). Quelques études ne sont pas parvenues aux mêmes conclusions, ce qui peut s'expliquer par un délai trop court entre l'exposition et les tests cognitifs, ou par un contraste d'exposition insuffisant entre les différents groupes étudiés (Ames et *al.*, 1995 ; Steenland et *al.*, 2000).

Très peu de chercheurs ont étudié les effets d'autres classes de pesticides sur les fonctions cognitives, mais les rares études sur le sujet sont parvenues aux mêmes conclusions que pour les organophosphorés et les carbamates. L'ensemble des données semble donc en faveur d'un impact négatif des pesticides sur les fonctions cognitives, et plus particulièrement les pesticides interagissant avec le système cholinergique. Ces troubles se sont parfois manifestés avec une latence de plus d'une dizaine d'années et tendent à montrer une détérioration progressive au cours du temps qui rappelle les pathologies neurodégénératives, notamment la MA (Baldi et *al.*, 2013).

Induction de stress oxydatif :

Tout comme les métaux lourds, les pesticides semblent capables d'induire un stress oxydatif au sein de l'organisme. Concernant les organochlorés, Fleming et ses collaborateurs ont mis en évidence des concentrations cérébrales post-mortem en DDT plus importantes chez les patients atteints de MA que chez les sujets exempts de maladie, corrélées avec une augmentation des marqueurs de stress oxydatifs dans le cerveau. Il en est de même pour les patients atteints de maladie de Parkinson (Fleming et *al.*, 1994).

En ce qui concerne les organophosphorés, leur métabolisme par les CYP est soumis à un polymorphisme génétique important qui est susceptible de moduler leur toxicité chez différents individus. L'analyse de ces polymorphismes a permis de découvrir un impact de ces produits sur le fonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif suite à une exposition chronique, ainsi que sur l'homéostasie neuronale (Cole et *al.*, 2011). Des marqueurs de stress oxydatifs ont également été mis en évidence chez des travailleurs exposés (Ranjbar et *al.*, 2002).

Les carbamates sont également responsables de l'induction d'un stress oxydatif, provoquant une peroxydation lipidique et une diminution des mécanismes de défense cérébraux contre l'oxydation. Gupta et ses collaborateurs ont étudié l'impact du Carbofurane (carbamate) sur des marqueurs de stress oxydatif *in vivo*, les F₂-Isoprostanes (F₂-IsoPs) en présence ou non d'antidotes au Carbofurane (*Figure 43*) (Gupta et al., 2007).

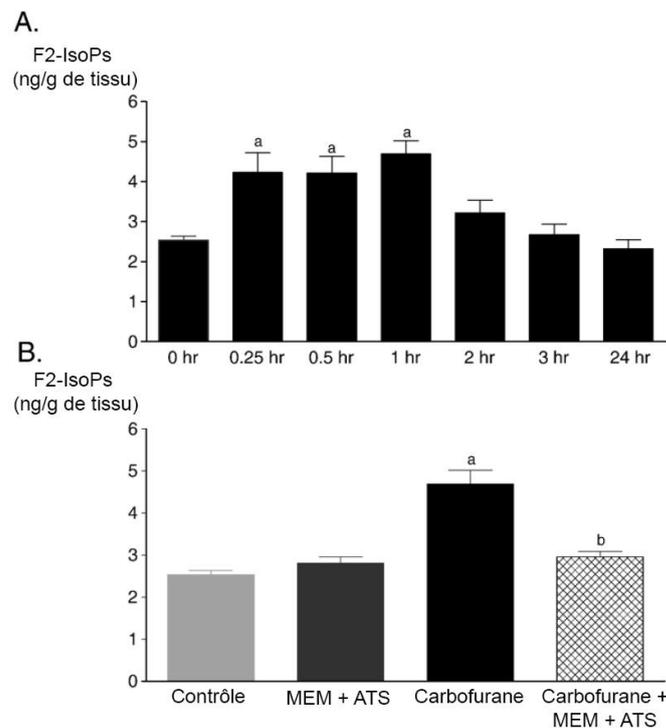


Figure 43 - Impact du Carbofurane sur le stress oxydatif en présence ou non d'antidotes (Gupta et al., Neuronal oxidative injury and dendritic damage induced by carbofuran: protection by memantine, Toxicology and Applied Pharmacology, 2007)

A - Des rats âgés de 6 à 8 semaines ont été soumis à une exposition sous-cutanée aiguë de 1,5 mg/kg de Carbofurane, puis ont été sacrifiés à des temps déterminés afin de mesurer les taux de F₂-IsoPs. **B** - Le groupe de rats exposés au Carbofurane a reçu une dose sous-cutanée aiguë de 1,5 mg/kg, comme précédemment. Le groupe contrôle a reçu une administration sous-cutané de 1 mg/kg de solution saline. Un troisième groupe de rats a reçu deux antidotes contre les carbamates, la Mémantine (MEM) et l'Atropine (ATS) à des doses respectives de 18 mg/kg et 16 mg/kg. Le quatrième groupe a reçu la Mémantine en sous-cutané à raison de 18 mg/mL 60 minutes avant l'administration de Carbofurane (temps de distribution maximale) et l'Atropine à raison de 16 mg/kg 15 minutes avant l'administration. Les quantités de F₂-IsoPs ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse par la méthode de dilution isotopique.

F₂-IsoPs : F₂-Isoprostanes ; MEM : Mémantine ; ATS : Atropine ; a : différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par Carbofurane ($p < 0,05$) ; b : différence significative entre le groupe ayant reçu le Carbofurane et le groupe ayant été traité de manière prophylactique par les antidotes (Mémantine et Atropine) avant l'administration de Carbofurane ($p < 0,05$).

La figure 43A montre une augmentation significative du taux de F₂-IsoPS jusqu'à une heure après l'administration de Carbofurane, puis le taux diminue jusqu'à 24

heures où il atteint son niveau initial. L'exposition à ce Carbamate entraîne donc une augmentation du stress oxydatif *in vivo*.

Le graphe 43B illustre l'effet protecteur de l'association de la Mémantine, traitement utilisé dans la MA, et de l'Atropine, molécule anticholinergique, contre le Carbofurane. En effet, l'administration préventive des deux antidotes avant l'administration de Carbofurane permet la normalisation du taux de F₂-IsoPS, et prévient donc le stress oxydatif (Gupta et *al.*, 2007).

Altération des fonctions mitochondriales et activation de l'apoptose :

Les études effectuées *in vitro* sur des cellules neuronales corticales de rats avec des OP comme le chlorpyrifos montrent une diminution de la viabilité cellulaire. Les résultats de la figure 44, sont en faveur d'une toxicité temps et concentration dépendante du chlorpyrifos sur les cellules du cortex cérébral. De plus, le test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) utilisé dans l'expérience est dépendant des fonctions mitochondriales. L'hypothèse avancée par les chercheurs est donc que la mort neuronale est ici due à un dysfonctionnement mitochondrial.

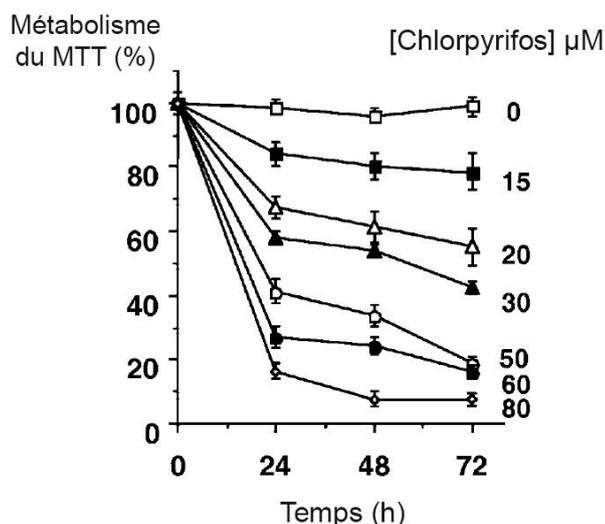


Figure 44 - Métabolisme du MTT en présence de concentrations croissantes en Chlorpyrifos dans les cellules corticales de rats (Caughlan et *al.*, Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases, Toxicological Sciences, 2004)

Des cellules neuronales de cortex de rats nouveaux nés ont été exposées à des concentrations croissantes en chlorpyrifos ou à une solution contrôle (éthanol à 0,015%) durant 24, 48 ou 72h consécutives. Ces cellules ont ensuite été soumises au test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), permettant la numération des cellules vivantes.

Afin de déterminer si la diminution de viabilité cellulaire est due à des phénomènes apoptotiques, la morphologie nucléaire des neurones corticaux a été évaluée grâce à une coloration de Hoechst (*Figure 45*) (Caughlan et al., 2004).

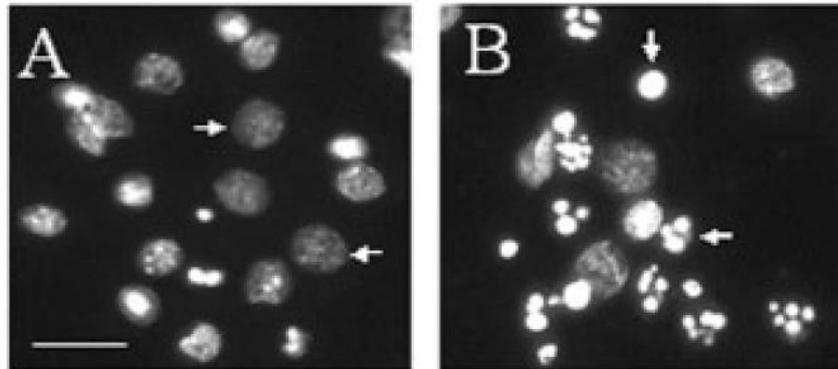


Figure 45 - Morphologie nucléaire de cellules corticales de rats exposées au chlorpyrifos (Caughlan et al., Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases, Toxicological Sciences, 2004)

Les cellules de cortex cérébral de rats nouveaux-nés ont été soumises à une coloration de Hoechst 33258.

A – Cellules incubées dans une solution d'éthanol à 0,015% (contrôle). **B** – Cellules traitées par une dose unique de chlorpyrifos.

Les cellules corticales incubées en présence de solution contrôle ont en majorité un noyau sain (A, flèches) alors que celles incubées en présence de chlorpyrifos présentent un noyau fragmenté ou condensé (B, flèches), caractéristiques d'un phénomène apoptotique. Il y a en effet une augmentation du nombre de noyaux apoptotiques suite au traitement. Il serait cependant intéressant de connaître la dose de chlorpyrifos utilisée pour l'expérimentation.

Le mécanisme apoptotique serait lié à une perturbation de l'équilibre entre les kinases JNK, ERK1/2 et p38. En effet, Caughlan et ses collaborateurs ont déterminé que le chlorpyrifos entraînait la phosphorylation, donc l'activation, d'ERK1/2 et de JNK. Les chercheurs sont parvenus à déterminer que l'activation de ces deux kinases favorisait ici les phénomènes apoptotiques observés. En outre, les résultats montrent une activation de p38 suite au traitement au chlorpyrifos. Cependant p38 jouerait cette fois un rôle protecteur en favorisant la survie cellulaire (Caughlan et al., 2004).

Ces résultats pourraient expliquer en partie les phénomènes de neurodégénérescence dans les maladies neurodégénératives comme la MA. Les

mécanismes mis en jeu sont cependant très complexes et échappent encore aux chercheurs.

Perturbation de l'homéostasie de divers neurotransmetteurs :

Le glutamate est un neurotransmetteur essentiel au bon fonctionnement du SNC. Certains pesticides, notamment les carbamates, seraient capables d'altérer son homéostasie en perturbant son transport vésiculaire synaptique (Vaccari et *al.*, 1999).

Le système cholinergique est la cible des OP et des carbamates, qui sont des IAChE. Leur toxicité principale résulte d'une forte augmentation des taux d'Acho dans la fente synaptique, qui à terme possède des effets délétères sur le SNC. Il serait intéressant d'étudier si une exposition chronique à de faibles doses de ces pesticides pourrait entraîner un mécanisme de protection visant à réduire le taux d'Acho synaptique, par exemple en stimulant sa recapture ou en favorisant son élimination. Un tel mécanisme pourrait expliquer la carence en Acho observée chez les patients atteints de MA. En outre, les effets retardés de l'exposition à ces pesticides comprennent l'inactivation d'une autre estérase, la NTE (Neuropathy Target Esterase), principalement exprimée au niveau cérébral. Son inactivation partielle entraîne une neurodégénérescence (Lotti et Moretto, 2005 ; Baldi et *al.* 2013).

Enfin, l'exposition post-natale de rats aux OP montre que ces derniers sont capables d'altérer l'expression de certains récepteurs à la sérotonine ainsi que le transport de ce neurotransmetteur notamment au sein de l'hippocampe, du tronc cérébral et du mésencéphale (Baldi et *al.*, 2013). Une perturbation du système sérotoninergique a également été mise en évidence après exposition aux OC. Cependant, la nature de l'interaction peut différer d'une molécule à une autre au sein d'une même classe de pesticides (Lafuente et *al.*, 2008).

Ces résultats ne sont pas négligeables connaissant l'importance des systèmes cholinergique et glutamatergique dans le développement de la MA. Pourtant, les études parues sur le sujet sont encore trop peu nombreuses et les résultats méritent d'être approfondis.

Induction de phosphorylation de la protéine Tau :

Une étude menée en 2012 par Chen et ses collaborateurs sur des rats exposés à un Carbamate ou à un Pyréthriinoïde montre une hyperphosphorylation de Tau associée à des troubles de l'apprentissage et de la mémoire et à une perte neuronale (Figure 46).

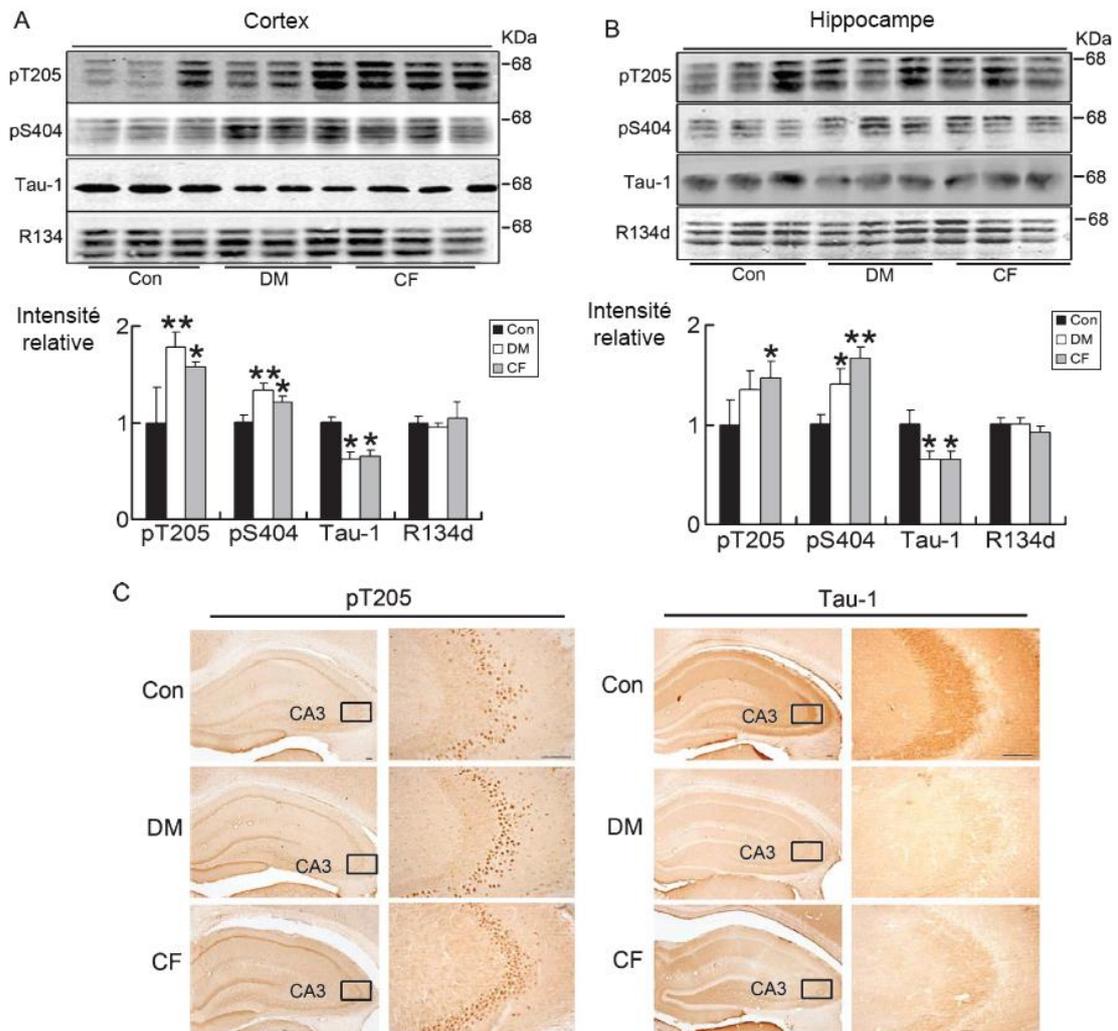


Figure 46 – Phosphorylation de la protéine Tau dans le cortex et l'hippocampe suite à l'exposition de rats à la Deltaméthrine ou au Carbofurane (Chen et al., Pesticides Induce Spatial Memory Deficits with Synaptic Impairments and an Imbalanced Tau Phosphorylation in Rats, Journal of Alzheimer's Disease, 2012).

Dans l'expérimentation, des rats ont été exposés à 12.5 mg/kg/j de Deltaméthrine (DM, Pyréthriinoïde) ou à 1 mg/kg/j de Carbofurane (CF, Carbamate) pendant 28 jours par voie orale. Les rats contrôles (Con) ont reçu uniquement de l'huile de maïs. La détection des protéines Tau à différents degrés de phosphorylation dans le cortex (A) et l'hippocampe (B) a été mise en évidence par Western Blot et par immunohistochimie (C) à l'aide d'anticorps spécifiques du site de phosphorylation. Les résultats ont été ajustés à la valeur de protéine Tau totale. Les images ont été obtenues par microscopie après coloration de Nissl (échelle : 100µm).

pT205 : protéine Tau phosphorylée sur le site thréonine 205. pS404 : protéine Tau phosphorylée sur le site sérine 404. Tau-1 : protéine Tau non phosphorylée sur les sites sérines 198/199/202. R134 : protéine Tau totale. CA3 : troisième division histologique de l'hippocampe. * : analyse de variance ANNOVA suivie d'un test post-hoc, $p < 0.05$. ** : analyse de variance ANNOVA, suivie d'un test post-hoc, $p < 0.01$.

La figure 46 démontre un taux plus important de protéine Tau phosphorylée chez les rats exposés aux pesticides que chez les contrôles (Chen et *al.*, 2012).

Cependant, les concentrations de pesticides minimales pour induire un effet chez l'homme n'étant pas connues précisément, l'équipe de chercheurs a choisi les doses connues pour générer des perturbations cognitives. Il est donc difficile de savoir si ces concentrations représentent la tranche basse ou la tranche haute de l'exposition humaine aux pesticides.

Induction de la formation de peptides A β :

En plus de l'induction de la phosphorylation de la protéine Tau par certains pesticides, des études tendent à montrer qu'une exposition *in vitro* de cellules de neurogliome humain à du DDT est également corrélée à une augmentation dose-dépendante des taux de peptides A β (*Figure 47, A et B*) (Gongbo et *al.*, 2015).

Afin de déterminer le mécanisme par lequel le DDT entraîne l'augmentation du taux de peptides A β , les taux d'APP, de BAC1 et de β -CTF ont été mesurés (*Figure 47, C et D*).

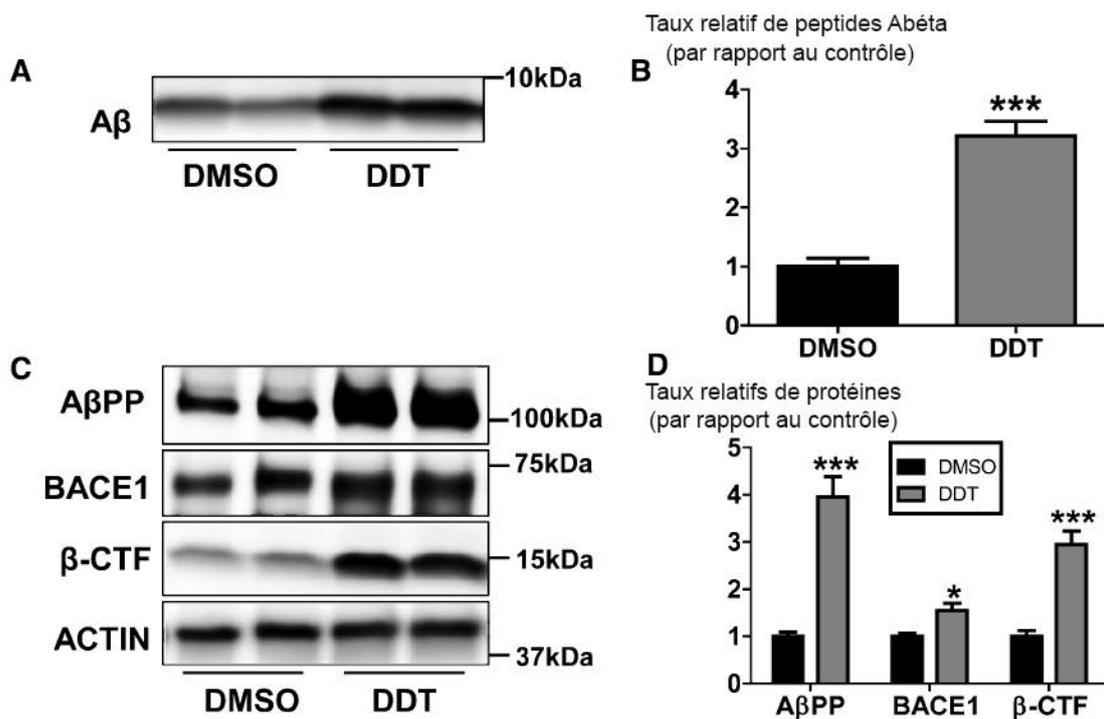


Figure 47 - Impact du DDT sur les peptides Aβ et sur les protéines liées à leur production (Gongbo et al., Common Pesticide, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), Increases Amyloid-β Levels by Impairing the Function of ABCA1 and IDE: Implication for Alzheimer's Disease, Journal of Alzheimer's Disease, 2015)

Les cellules contrôles de neurogliome humaines de type H4 ont été traitées soit par 0,1% de DMSO (Diméthylsulfoxyde), soit incubées avec 10 μM de DDT. L'expression des peptides Aβ et des protéines BACE1, β-CTF et ACTIN a été analysée par Western blot (A, C), puis quantifiée par densitométrie (B, D). Les deux pistes d'électrophorèse correspondent à la reproduction des analyses pour les mêmes concentrations en DMSO et DDT. AβPP : Amyloid-β Precursor Protein. BACE1 : AβPP-cleaving enzyme1. β-CTF : AβPP C-terminal fragment β. ACTIN : contrôle de charge pour normalisation. * : différence significative au test de Student (p < 0,05). *** : différence significative au test de Student (p < 0,01).

En effet APP est le précurseur des peptides Aβ, BACE1, l'enzyme responsable du clivage de l'APP et β-CTF, le fragment β C-terminal de l'APP. Les résultats montrent que l'exposition au DDT entraîne une augmentation de ces trois protéines dans les cellules. L'hypothèse soulevée par les chercheurs est donc que l'action du DDT aurait lieu à la fois sur l'enzyme BACE1 favorisant ainsi une augmentation du clivage de l'APP, mais aussi en amont en stimulant la production de l'APP elle-même. Il se pourrait également que la production de BACE1 soit réactionnelle à l'augmentation des taux d'APP. De plus, des tests supplémentaires ont démontré que la demi-vie des peptides Aβ était deux fois moindre après incubation avec du DDT que dans les contrôles. L'action du DDT sur les peptides Aβ serait donc double, liée à une augmentation de la production de ces peptides ainsi qu'à une diminution de leur demi-vie (Gongbo et al., 2015).

3.5 Conclusion sur l'impact des pesticides dans la MA

Pour conclure, l'exposition aiguë ou chronique aux pesticides entraîne des troubles neurologiques avérés. Ces dernières années, la préoccupation grandissante concernant le possible impact des pesticides dans la MA a permis le développement de nombreux travaux. Cependant le lien entre les pesticides et le développement de maladies neurodégénératives fait l'objet de peu d'études en comparaison avec les métaux lourds. Les études de cohorte tendent à montrer qu'une corrélation existe, mais à ce jour les données ne sont pas suffisantes pour affirmer un lien de causalité entre l'exposition chronique aux pesticides et le développement de la MA.

Les études montrent que les pesticides sont capables de favoriser le stress oxydatif ainsi que l'apoptose *via* l'altération des fonctions mitochondriales. L'impact de certains pesticides sur les taux de protéine Tau phosphorylée et de peptides A β est digne du plus grand intérêt, de même que leur impact sur les neurotransmetteurs. Cependant trop peu de travaux ont à l'heure actuelle tenté de déterminer l'implication des pesticides sur ces anomalies retrouvées dans la MA. De plus, toutes les familles de pesticides n'ont pas été prises en compte dans les travaux existants, qui se contentent de n'étudier qu'une molécule en particulier. Sachant qu'il existe une grande variabilité au sein d'une même classe de pesticides, il serait alors important d'étudier différentes molécules au sein d'une même famille de composés. De même, les chercheurs n'ont à ce jour pas orienté leurs travaux sur l'impact d'un mélange de différents pesticides sur la santé humaine, alors que la population y est quotidiennement exposée.

Conclusion sur l'impact des contaminants environnementaux dans la MA

La MA est un véritable enjeu de santé publique. L'incidence de la pathologie s'accroît au fil des années avec le vieillissement constant de la population mondiale. En 2016, la commission de la transparence de la HAS (Haute Autorité de santé) s'est positionnée en faveur d'un déremboursement total des quatre spécialités utilisées dans le traitement de la MA en raison de leur SMR jugé insuffisant. Elle estime en effet que ces médicaments n'ont plus leur place dans la stratégie thérapeutique au vu de leur efficacité modeste et de courte durée et du risque accru d'effets indésirables graves et d'interactions médicamenteuses chez les patients souvent âgés et polymédiqués. La commission préconise une prise en charge pluridisciplinaire des patients (Commission De La Transparence, Avis du 19 octobre 2016).

La compréhension des étiologies de la MA et des mécanismes précis mis en jeu devient alors primordiale. Si un facteur génétique (le gène de l'ApoE) ainsi que la qualité de vie et le niveau d'éducation ont bien été identifiés parmi les facteurs étiologiques, l'impact des contaminants environnementaux dans le développement de la MA reste controversé malgré l'intérêt grandissant qu'il suscite auprès de la communauté scientifique. Les nombreux travaux existant à ce jour tendent à montrer une corrélation positive entre l'exposition aux métaux lourds et aux pesticides et le développement de la MA, notamment lors d'une exposition chronique cumulative et plus particulièrement lorsque l'exposition a lieu lors de la vie embryonnaire ou chez les jeunes enfants. Mais aucune étude n'a pour l'instant permis de démontrer un lien de causalité formel entre l'exposition aux contaminants environnementaux et le développement de la MA.

En ce qui concerne les pesticides, les travaux ont montré que l'exposition augmentait le stress oxydatif, accompagné de troubles fonctionnels mitochondriaux contribuant à l'apoptose des cellules neuronales. De plus, certains pesticides sont capables d'altérer l'homéostasie de différents neurotransmetteurs essentiels à l'activité neuronale tels que le glutamate, l'Acho et la sérotonine. En outre, certaines molécules induisent la phosphorylation de la protéine Tau ou augmentent le taux de

peptides A β . Pour finir, plusieurs études de cohorte ont démontré un risque significativement plus élevé de développer une MA chez les sujets exposés de manière chronique aux pesticides dans leur globalité en comparaison avec des sujets non exposés. L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'une contribution des pesticides dans le développement la MA. Cependant, les effets observés peuvent varier d'une molécule à une autre au sein d'une même classe de pesticides, ce qui n'a pas été approfondi par les chercheurs.

Pour l'heure, les résultats concernant les métaux lourds sont sans nul doute les plus intéressants en ce qui concerne leur lien avec la MA, notamment en raison de leur influence sur les peptides A β , la protéine Tau ou encore sur les neurotransmetteurs. En effet, la majorité des métaux lourds est en mesure de provoquer un état de stress oxydatif et de favoriser le phénomène d'apoptose, ce qui peut expliquer la neurodégénérescence observée dans la MA. En outre, ce sont des composés neurotoxiques dans la mesure où une exposition chronique aux métaux lourds s'accompagne de troubles neurocomportementaux et cognitifs qui se rapprochent des symptômes accompagnant la MA. Différents travaux mettent en évidence une colocalisation de plusieurs métaux lourds avec les peptides A β et les ENF. L'exposition à certains métaux favorise une augmentation des taux cérébraux des peptides A β ainsi que de la protéine Tau hyperphosphorylée. Lors d'expositions aux métaux comme l'Al et le Pb, les chercheurs ont mis en évidence une agrégation des peptides A β . Enfin, plusieurs métaux lourds sont en mesure d'entraîner une perturbation de l'homéostasie calcique, primordiale pour l'activité neuronale, ainsi que de divers neurotransmetteurs dont l'activité est également altérée dans la MA. A ces effets peuvent s'ajouter d'autres interactions avec les systèmes cérébraux propres à chaque métal.

Toutefois, ces résultats sont à analyser avec précautions. Le fait que les métaux lourds semblent être de meilleurs candidats dans le développement de la MA que les autres classes de contaminants est certainement le reflet d'un nombre bien plus important de publications sur ce type de contaminants. Les pesticides font à l'heure actuelle l'objet de moins de recherches et les polluants industriels comme le Bisphénol A ou les phtalates sont encore largement sous-estimés, de même que la pollution de l'air ou les antimicrobiens (*Figure 48*) (Yegambaram et al., 2015). Il est donc probable que ces autres classes de contaminants environnementaux jouent un rôle important dans le développement de la MA qui reste à approfondir.

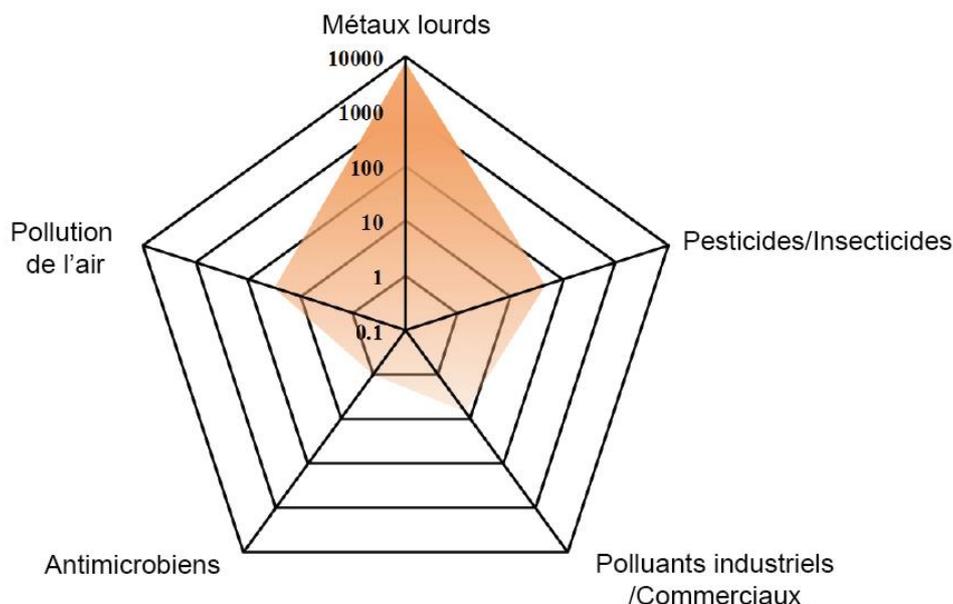


Figure 48 - Graphique représentant les études publiées sur les catégories de contaminants environnementaux pouvant être associés à la MA (Yegambaram et al., Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease : A Review, Current Alzheimer Research, 2015)

Graphique déterminé à partir de 8 102 publications.

De plus, chaque équipe de chercheurs utilise ses méthodes d'analyses, ce qui entraîne un manque d'uniformisation entre les différentes publications. Il peut également exister des variabilités au sein d'une même étude (âge des sujets, dose administrée...). Il est alors plus complexe de comparer les études entre elles pour apporter une conclusion claire.

En ce qui concerne les modèles d'étude *in vivo*, le sujet étudié est systématiquement l'animal (rongeurs et primates essentiellement). En effet, il est d'un point de vue éthique inenvisageable d'effectuer des travaux évaluant la toxicité des contaminants environnementaux chez l'homme. Il est donc possible que les effets toxiques observés chez l'animal ne soient pas le reflet exact de la toxicité chez l'homme en raison de paramètres physiologiques ou pharmacocinétiques différents.

En outre, les travaux existant à ce jour ne se sont penchés que sur l'impact d'un seul contaminant à la fois dans le développement de la MA. La multitude de composés toxiques auxquels est continuellement exposée la population est pourtant certainement responsable d'effets bien plus néfastes sur la santé humaine, plusieurs composés d'une même classe de contaminants ou de classes différentes pouvant présenter des effets synergiques. Aujourd'hui, il est pourtant extrêmement complexe,

si ce n'est impossible, d'analyser ou bien prédire l'effet de tels cocktails de polluants environnementaux.

L'enjeu est donc à ce jour d'enrayer le développement de la MA par des méthodes préventives ou le développement de nouveaux traitements plus innovants. Cependant, le diagnostic tardif de la pathologie reste un frein considérable à la prise en charge des patients, qui présentent souvent un état avancé de neurodégénérescence à la découverte de la maladie.

Si la possibilité de la mise en place d'un diagnostic précoce semble complexe et onéreuse, de nouvelles molécules sont à l'heure actuelle en cours de développement et d'essais cliniques. Les classes de médicaments qui intéressent la recherche sont principalement les anticorps monoclonaux ciblant les peptides A β , les inhibiteurs de béta-sécrétase qui permet la formation de ces peptides, ou encore les molécules permettant de réguler les neurotransmetteurs cérébraux (glutamate, sérotonine, Acho...).

Cependant, la recherche de nouveaux traitements de la MA est en difficulté. En janvier 2018, pas moins de trois essais cliniques ont été suspendus, faute de résultats. Parmi eux, le Solanezumab, anticorps monoclonal des laboratoires américains Lilly, n'a pas démontré d'efficacité significative lors des essais de phase III par rapport au placebo. Cet anticorps avait été produit pour augmenter l'élimination des peptides A β cérébraux (Honig et *al.*, 2018). De la même manière, les essais cliniques de phase III de l'Idalopirdine, du laboratoire danois Lundbeck, n'ont pas été concluants. Cet antagoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-hydroxytryptamine-6 (5-HT $_6$) devait améliorer les performances cognitives des patients souffrant de formes légères à modérées de la MA (Atri et *al.*, 2018). Enfin, les laboratoires japonais Takeda et américain Zinfandel ont mis un terme à l'essai de phase III de la Pioglitazone, un anti-diabétique agoniste sélectif des récepteurs nucléaires PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ), testé dans l'espoir de retarder l'apparition des symptômes chez des sujets à haut risque de développer une MA. Cet essai faisait suite à la découverte d'une inflammation et d'une résistance à l'insuline chez les patients atteints de la MA, cependant les résultats ne se sont pas révélés satisfaisants (Communiqué des laboratoires Takeda, janvier 2018). Il en va de même pour le Verubecestat, un inhibiteur de la β -sécrétase 1 (BACE-1), qui a passé les essais cliniques de phase I en 2016. En inhibant la BACE-1, le Verubecestat permet l'inhibition de la production des peptides A β et donc

de leur toxicité neuronale (Kennedy et *al.*, 2016). Les essais de phase III ont malheureusement été stoppés par Merck en décembre 2017, faute de résultats. Des molécules de cette classe pourraient, si elles étaient commercialisées, permettre le ralentissement du déclin cognitif chez les patients atteints de formes peu avancées de MA.

En revanche, une nouvelle piste est à l'étude en 2018 par l'équipe du Dr James Malter concernant l'utilisation d'inhibiteurs de calcineurine, médicaments antirejet utilisés dans la greffe d'organes. Il s'avère que les patients traités par ciclosporine présentent un risque réduit de développer une MA. L'étude des chercheurs montre que l'utilisation de telles molécules aurait la capacité de ralentir la progression de la MA chez la souris (Stallings et *al.*, 2018).

De nos jours, l'enjeu est donc la prévention et le traitement de la MA, pathologie complexe dont les étiologies et les mécanismes sont encore mal connus. Les travaux réalisés sur les contaminants environnementaux représentent une avancée importante dans la compréhension de la MA et leur approfondissement pourrait sans doute ouvrir de nouvelles perspectives de traitement ou entraîner la mise en place de réglementations plus strictes concernant l'exposition à ces composés toxiques.

La question se pose inévitablement pour les autres pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaques, qui n'ont pas été abordées dans la présente thèse mais pour lesquelles les contaminants de l'environnement jouent certainement un rôle qui reste à déterminer.

Bibliographie

- Ackrill P, Day JP; The use of desferrioxamine in dialysis-associated aluminium disease; *Contributions to Nephrology*, 1993, vol. 102: 125-134.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J.; Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions; *Clinica Chimica Acta*, 2007, vol. 383: 57-64.
- Akagi H, Grandjean P, Takizawa Y, Weihe P; Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease; *Environmental Research*, 1998, vol. 77: 98-103.
- Akatsu H, Hori A, Yamamoto T, Yoshida M, Mimuro M, Hashizume Y; Transition metal abnormalities in progressive dementias; *Biometals*, 2011, vol. 25: 337-350.
- Alessio L, Bertazzi Pa, Cortona G; Monitoraggio biologico di lavatori esposti a piombo, Utilità e limiti degli indicatori di dose interna e di effetto biologico precoce; *La Medicina del Lavoro*, 1978, vol.69: 4-25.
- Alkondon M, Costa AC, Radhakrishnan V, Aronstam RS, Albuquerque EX; Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead; *FEBS Lett*, 1990, vol. 261: 124-130.
- Álvarez-Garza A, Pérez-Velázquez IR; Heavy metal pollution in drinking water - a global risk for human health: A review; *African Journal of Environmental Science and Technology*, 2013, Vol. 7: 567-584.
- Arnal N, Morel GR, de Alaniz MJT, Castillo O, Marra CA; Role of copper and cholesterol association in the neurodegenerative process; *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2013, vol. 10: 1-15.
- Ames RG, Steenland K, Jenkins B, Chrislip D, Russo J; Chronic neurologic sequelae to cholinesterase inhibition among agricultural pesticide applicators; *Archives of Environmental Health*, 1995, vol. 50: 440-444.
- An WL, Cowburn RF, Li L, Braak H, Alafuzoff I, Iqbal K, Iqbal IG, Winblad B, Pei JJ; Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease; *American Journal of Pathology*, 2003, vol. 163: 591-607.
- An WL, Bjorkdahl C, Liu R, Cowburn RF, Winblad B, Pei JJ; Mechanism of zinc-induced phosphorylation of p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase 3 β in SH-SY5Y neuroblastoma cells; *Journal of Neurochemistry*, 2005, vol. 92: 1104-1115.
- Ankiri J, Prévalence, incidence et facteurs de risque de la Maladie d'Alzheimer, *Gérontologie et société* n°128-129 ; 2009.
- Aschner, Connor MJ, Dorman D, Malecki E, Vrana K; Manganese in Health and Disease; *Handbook of Neurotoxicology*, 2002, Vol. 1.
- Atri A, Frölich L, Ballard C, et al.; Effect of Idalopirdine as Adjunct to Cholinesterase Inhibitors on Change in Cognition in Patients With Alzheimer Disease Three Randomized Clinical Trials; *JAMA*, 2018, vol. 319 (2):130-142.
- Audesirk G, Electrophysiology of lead intoxication: effects on voltage-sensitive ion channels; *Neurotoxicology*, 1993, vol. 14: 137-147.
- Aupetit H, La Maladie d'Alzheimer, Paris : Editions Odile Jacob, 2004.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS; The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer; *Journal of Neurochemistry*, 2006, vol. 98(3): 641-653.
- Bakulski KM, Rozek LS, Dolinoy DC, Paulson HL, Hu H; Alzheimer's Disease and Environmental Exposure to Lead : The Epidemiologic Evidence and Potential role of Epigenetics; *Current Alzheimer Research*, 2012; 9(5) : 563-573.
- Baldi L, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues JF et al.; Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly; *American Journal of Epidemiology*, 2003, vol. 157: 409-414.
- Baldi L, Bouvier G, Cordier S, Coumoul X, Elbaz A, Gamet-Payrastre L, Le Bailly P,

- Multigner L, Rahmani R, Spinosi J, Van Maele-Fabry G, Expertise collective de l'INSERM; Pesticides, Effets sur la santé ; Les éditions Inserm, 2013, Paris.
- Basha MR, Wei W, Bakheet SA, et al. The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain. *Journal of Neuroscience*. 2005, vol. 25: 823-9.
- Baum L, Chan IH, Cheung SK, Goggins WB, Mok V, Lam L et al., Serum zinc is decreased in Alzheimer's disease and serum arsenic correlates positively with cognitive ability, *Biometals*, 2010, vol.23, 173-9.
- Becerril-Ortega J, Bordji K, Freret T, Rush T, Buisson A; Iron overload accelerates neuronal amyloid-beta production and cognitive impairment in transgenic mice model of Alzheimer's disease; *Neurobiology of Aging*, 2014, vol. 35: 2288-2301.
- Behl M, Zhang Y, Monnot AD, Jiang W, Zheng W; Increased β -amyloid Levels in the Choroid Plexus Following Lead Exposure and the Involvement of Low Density Lipoprotein Receptor Protein-1; *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, vol. 240: 245-254.
- Bellinger FP, He QP, Bellinger MT, Lin Y, Raman AV, White LR, Berry MJ; Association of Selenoprotein P with Alzheimer's pathology in human cortex; *Journal of Alzheimer's Disease*, 2008, vol. 15, 465-472.
- Belon JP, Faure S, Pilon F; Pathologies et thérapeutiques commentées; Issy-Les-Moulineaux: Editions Elsevier Masson, 2013.
- Benadda B., Etat de l'art concernant la mesure des émissions et le traitement des métaux dans les fumées : Cas du cadmium, du mercure et du plomb, Rapport Final, 2002.
- Bernhoft RA, Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature, *Journal of Environmental and Public Health*, Volume 2012, Article ID 460508, 10 pages.
- Bhatia KP, Schneider SA; Metal Related Neurodegenerative Disease; *International Review of Neurobiology*, 2013, Vol 110.
- Bherer L, Belleville S, Hudon C; Le déclin des fonctions exécutives au cours du vieillissement normal, dans la maladie d'Alzheimer et dans la démence frontotemporale; *Psychologie et NeuroPsychiatrie du Vieillissement* 2004; vol. 2 (3): 181-189.
- Bisen-Hersh EB, Farina M, Barbosa F Jr, Rocha JBT, Aschner M; Behavioral Effects of Developmental Methylmercury Drinking Water Exposure in Rodents; *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2014, vol. 28(2): 117-124.
- Bjertness E, Candy JM, Torvik A, Ince P, McArthur F, Taylor GA, et al.; Content of brain aluminum is not elevated in Alzheimer's disease; *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 1996, vol. 10: 171-174.
- Bloomquist JR, Soderlund DM; Neurotoxic insecticides inhibit GABA-dependent chloride uptake by mouse brain vesicles *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1985, vol. 133: 37-43.
- Blum K, Manzo L; *Neurotoxicology*, Editions Marcel Dekker, Inc: New York, 1985.
- Bodereau B; Récepteurs nicotiques neuronaux d'insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes. Thèse en Neurosciences de l'Université d'Angers, 2011.
- Bonacker D, Stoiber T, Wang M, Böhm K, Prots I, Unger E, Their R, Bolt HM, Degen GH; Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function; *Archives of Toxicology*, 2004, vol. 78: 575-583.
- Bonithon-Kopp C, Huel G, Grasmick C; Effects of pregnancy on the inter-individual variations in blood levels of lead, cadmium and mercury; *Biological Research in Pregnancy and Perinatology*, 1986, vol. 7 (1): 37-42.
- Borisova T, Krisanova N, Sivko R et al.; Presynaptic malfunction: the neurotoxic effects of cadmium and lead on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport; *Neurochemistry International*, 2011, vol. 59 (2): 272-279.
- Botta A, Poyen D, Sigouret M, Mathias A ; Les différents tests de dépistage d'une imprégnation saturnine applicables en médecine du travail ; *Archives des*

- Maladies Professionnelles et de l'Environnement, 1976, vol. 37 : 437-443.
- Bouvier G, Seta N, Vigourous-Villard A, Blanchard O, Momas I; Insecticide urinary metabolites in non-occupationally exposed populations; *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2005, vol. 8: 485-512.
- Bowman AB, Kwakye GF, Herrero Hernández E, Aschner M; Role of manganese in neurodegenerative diseases; *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2012, vol. 25 (4): 191-203.
- Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA; Poisoning due to pyrethroids; *Toxicological Reviews*, 2005, vol. 24: 93-106.
- Brenneman KA, Wong BA, Buccellato MA, Costa ER, Gross EA, Dorman DC ; Direct olfactory transport of inhaled manganese ((54)MnCl(2)) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model; *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, vol. 169 (3): 238-248.
- Brewer GJ; Alzheimer's disease causation by copper toxicity and treatment with zinc; *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2014, vol. 6 (92).
- Bush AI, Multhaup G, Moir RD, et al.; A novel zinc (II) binding site modulates the function of the β A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease; *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268 (22): 16109-16112.
- Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G et al.; Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc; *Science*, 1994, vol. 265: 1464-1467.
- Caughlan A, Newhouse K, Namgung U, Xia Z; Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases; *Toxicological Sciences*, 2004, vol. 78 (1): 125-134.
- Chandra V, Pandav R, Dodge HH, Johnston JM, Belle SH, DeKosky ST, Ganguli M.; Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study; *Neurology*, 2001, vol. 57 (6): 985-989.
- Chanel O, Dollfus C, Haouenoer JM, Hartemann P, Huel G, Larroque B, Lison D, Marret S, Pinon-Lataillade G, Prémont J, de Verneuil H, Zmirou D, INSERM ; Plomb dans l'Environnement, quels risques pour la santé?; 1999.
- Châtel A; Voies de signalisation des MAP kinases et apoptose chez l'éponge *Suberites domuncula* et la moule *Mytilus galloprovincialis* ; *Ecotoxicologie*, Université de Bretagne occidentale, 2009.
- Chen MT, Sheu JY, Lin TH ; Protective effects of manganese against lipid peroxidation; *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2000, vol.61 (7): 569-577.
- Chen L, Liu L, Luo Y, Huang S; MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis; *Journal of Neurochemistry*, 2008, vol. 105: 251-261.
- Chen NN, Luo DJ, Yao XQ, Yu C, Wang Y, Wang Q, Wang JZ, Liu GP; Pesticides Induce Spatial Memory Deficits with Synaptic Impairments and an Imbalanced Tau Phosphorylation in Rats; *Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, vol. 30: 585–594.
- Chimie et Ecologie, Impact des métaux lourds sur l'homme et l'environnement – influence de la spéciation - Le cas du plomb. Pais : *Chimie Ecologie*, 1998, 73p.
- Chin G, Chong J, Kluczevska A, Lau A, Gorjy S, Tennant M; The environmental effects of dental amalgam; *Australian Dental Journal*, 2000, vol. 45 (4): 246-249.
- Chow ESH, Hui MNY, Lin CC, Cheng SH; Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development; *Aquatic Toxicology*, 2008, vol. 87 (3): 157-169.
- Christofferson JO, Ahlgren L, Schutz A, Skerfving S, Mattsson S; Decrease of skeletal lead levels in man after end of occupational exposure; *Archives of Environmental & Occupational Health*, 1986, vol. 41: 312-318.
- Clarkson TW, Magos L; The toxicology of mercury and its chemical compounds; *Critical Reviews in Toxicology*, 2006, vol. 36 (8): 609–662.
- Coats JR; Mechanisms of Toxic Action and Structure-Activity Relationships for Organochlorine and Synthetic Pyrethroid Insecticides; *Environmental Health Perspectives*, 1990, vol. 87: 255-262.
- Cole TB, Beyer RP, Bammler TK, Park SS, Farin FM, et al.; Repeated Developmental Exposure of Mice to Chlorpyrifos Oxon Is Associated with Paraoxonase 1 (PON1)-Modulated Effects on Cerebellar Gene Expression; *Toxicological Sciences*, 2011, vol. 123: 155-169.

- Commissariat général au développement durable, Bruno Villalba ; L'environnement en France ; Edition 2010, Paris. Service de l'observation et des statistiques, Ministère de l'écologie de l'énergie du développement durable et de la mer, 140p.
- Commission De la Transparence, Avis de 2012.
- Commission De La Transparence, Avis du 19 octobre 2016.
- Communiqué de presse de la HAS, 2013
- Cotzias GC, Horiuchi K, Fuenzalida S, Mena I; Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture; *Neurology*, 1968, vol. 18 (4): 376-382.
- Crapper McL, Dalton AJ, Kruck TP, Bell MY, Smith WL, Kalow W, Andrews DF; Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer disease; *Lancet*, 1991, vol. 337: 1304-1308.
- Crichton RR, Dexter DT, Ward RJ; Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases; *Journal of Neural Transmission*, 2011, vol. 118: 301-314.
- Crossgrove JS, Yokel RA; Manganese distribution across the blood-brain barrier III. The divalent metal transporter-1 is not the major mechanism mediating brain manganese uptake; *Neurotoxicology*, 2004, vol. 25 (3): 451-460.
- Crouch PJ, Savva MS, Hung LW, Donnelly PS, Mot AI, Parker SJ *et al.*; The Alzheimer's therapeutic PBT2 promotes amyloid-beta degradation and GSK3 phosphorylation via a metal chaperone activity; *Journal of Neurochemistry*, 2011, vol. 119: 220-230.
- Culbreth ME, Harrill JA, Freudenrich TM, Mundy WR, Shafer TJ; Comparison of chemical-induced changes in proliferation and apoptosis in human and mouse neuroprogenitor cells; *Neurotoxicology*, 2012, vol. 33 (6): 1499-1510.
- Danscher G, Jensen KB, Frederickson CJ, *et al.*; Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's diseased brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material; *Journal of Neuroscience Methods*, 1997, vol. 76 (1): 53-59.
- Dartigues JF, Helmer C, Letenneur L, Péres K, Amieva H, Auriacombe S, Orgogozo JM, Commenges D, Jacqmin-Gadda H, Richard-Harston S, Delva F, Foubert-Samier A, Barberger-Gateau P; Paquid 2012 : illustration et bilan ; *Gériatrie et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement*, 2012, vol. 10 (3): 325-331.
- Davis CD, Zech L, Greger JL; Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses; *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1993, vol. 202 (1): 103-108.
- Décision de la Commission du 3 mai 2000 remplaçant la décision 94/3/CE établissant une liste de déchets en application de l'article 1er, point a), de la directive 75/442/CEE du Conseil relative aux déchets et la décision 94/904/CE du Conseil établissant une liste de déchets dangereux en application de l'article 1er, paragraphe 4, de la directive 91/689/CEE du Conseil relative aux déchets dangereux, 2000/532/CE, JO L 226 du 6.9.2000, p. 3.
- Décret n° 2012-665 du 4 mai 2012 révisant et complétant les tableaux des maladies professionnelles en agriculture annexés au livre VII du code rural et de la pêche maritime.
- Demichele S.G.; Nutrition of lead; *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1984, vol.78: 401-408.
- Desi I, Nagymajtenyi L, Schulz H; Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development; *Journal of Applied Toxicology*, 1998, vol. 18 (1): 63-70.
- Dhenain M, Lehericy S, Duyckaerts C; Le diagnostic : de la neuropathologie à l'imagerie cérébrale; *Medecine/Sciences*, 2002, vol. 18: 697-708.
- Ding B, Chen KM, Ling HW, Sun F, Li X, Wan T, Chai WM, Zhang H, Zhan Y, Guan YJ; Correlation of iron in the hippocampus with MMSE in patients with Alzheimer's disease; *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2009, vol. 29: 793-798.
- Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, La contamination des denrées alimentaires par les métaux lourds et l'arsenic, 2014.
- Directive 98/83/E relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

- Dobson AW, Weber S, Dorman DC, Lash LK, Erikson KM, Aschner M; Oxidative stress is induced in the rat brain following repeated inhalation exposure to manganese sulfate; *Biological Trace Element Research*, 2003, vol. 93 (1-3): 113-126.
- Doi T, Puri P, McCann A, Bannigan J, Thompson J; Epigenetic effect of cadmium on global de novo DNA hypomethylation in the cadmium-induced ventral body wall defect (VBWD) in the chick model; *Toxicological Sciences*, 2011, vol. 120 (2): 475-480.
- Dorman DC, Struve MF, Wong BA; Brain manganese concentrations in rats following manganese tetroxide inhalation are unaffected by dietary manganese intake; *Neurotoxicology*, 2002, vol. 23 (2): 185-195.
- Dorman DC, Breneman KA, McElveen AM, Lynch SE, Roberts KC, Wong BA; Olfactory transport: a direct route of delivery of inhaled manganese phosphate to the rat brain; *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2002, vol. 65 (20): 1493-1511.
- Dufaure C; Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, 27 février 2012; Insecticides et santé humaine : Aspects toxicologiques, épidémiologiques et juridiques.
- Duyckaerts C, Colle MA, Delatour B, Hauw JJ; Maladie d'Alzheimer : les lésions et leur progression; *Revue Neurologique*, 1999, vol. 155 (4S) : 17-27.
- Eggleston DW, Nylander M; Correlation of dental amalgam with mercury in brain tissue; *Journal of Prosthetic Dentistry*, 1987, vol. 58: 704-707.
- Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W, Nauen R; Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection; *Pest Management Science*, 2008, vol. 64: 1099-1105.
- Eriksson H, Gillberg PG, Aquilonius SM, Hedstrom KG, Heilbronn E; Receptor alterations in manganese intoxicated monkeys; *Archives of Toxicology*, 1992, vol. 66 (5): 359-364.
- Erikson KM, Aschner M; Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction; *Neurochemistry International*, 2003, vol. 43 (4-5): 475-480.
- Erikson KM, Dorman DC, Lash LH, Aschner M; Persistent alterations in biomarkers of oxidative stress resulting from combined in utero and neonatal manganese inhalation; *Biological Trace Element Research*, 2005, vol. 104 (2): 151-163.
- European Environment Agency, Heavy Metals Emissions, rapport de 2015.
- Everitt AV; Ageing rat colonies at the University of Sydney; *Australian Association of Gerontology*, 1991, vol. 26: 79-82.
- Exley C, Price NC, Kelly SM, Birchall JD; An interaction of β -amyloid with aluminium in vitro; *FEBS Letters*, 1993, vol. 324 (3): 293-295.
- Exley C, House ER; Aluminum in the human brain; *Monatshefte für Chemie*, 2011, vol. 142: 357-363.
- Falangola MF, Lee SP, Nixon RA, Duff K, Helpner JA; Histological Co-Localization of Iron in A β Plaques of PS/APP Transgenic Mice; *Neurochemical Research*, 2005, vol. 30 (2): 201-205.
- Fan M, Chambers T; Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy; *Drug Resistance Updates*, 2001, vol. 4: 253-267.
- Farahat TM, Abdelrasoul GM, Amr MM, Shebl MM, Farahat FM, Anger WK; Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides; *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2003, vol. 60: 279-286.
- Farris W, Schütz SG, Cirrito JR et al.; Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy; *American Journal of Pathology*, 2007, vol. 171: 241-251.
- Farsetti A, Mitsushashi T, Desvergne B, Robbins J, Nikodem VM; Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain; *Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266 (34): 23226-23232.
- Fernández-Luqueño F, López-Valdez F, Gamero-Melo P, Luna-Suárez S, Aguilera-González EN, Martínez AI, del Socorro García-Guillermo M, Hernández-Martínez G, Herrera-Mendoza R, Álvarez-Garza MA, Pérez-Velázquez IR; Heavy metal pollution in drinking water - a global risk for human health : A review; *African Journal of*

- Environmental Science and Technology, 2013, Vol. 7 (7): 567-584.
- Finkelstein Y, Markowitz Me, Rosen Je; Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects; Brain Research Reviews, 1998, vol. 27: 168-176.
- Fisher C; Les idées délirantes dans la Maladie d'Alzheimer: une revue de la littérature; Revue Canadienne de la Maladie d'Alzheimer, 2004.
- Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggie T, Sanchez-Ramos JR; Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides; Annals of Neurology, 1994, vol. 36: 100-103.
- Fouquet M, Villain N, Chételat G, Eustache F, Desgranges B; Imagerie cérébrale et physiopathologie de la maladie d'Alzheimer; Psychologie Neuropsychiatre du Vieillessement 2007; 5 (4): 269-279.
- Friberg L, Nordberg Gf, Vouk Yb; Handbook on the toxicology of metals - 2nd edition; Elsevier Publication, Amsterdam, 1986.
- Frumkin H, Letz R, Williams PL, Gerr F, Pierce M, Sanders A, Elon L, Manning CC, Woods JS, Hertzberg VS, Mueller P, Taylor BB; Health effects of long term mercury exposure among chloralkali plant workers; American Journal of Industrial Medicine, 2001, vol. 39: 1-18.
- Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE; Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity; Biochemical Journal, 1990, vol. 266 (2): 329-334.
- Ghribi O, DeWitt DA, Forbes MS, Herman MM, Savory J.; Co-involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum in regulation of apoptosis: changes in cytochrome c, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of aluminum-treated rabbits; Brain Research, 2001, vol. 903: 66-73.
- Ghribi O, Herman MM, DeWitt DA, Forbes MS, Savory J.; Abeta (1-42) and aluminum induce stress in the endoplasmic reticulum in rabbit hippocampus, involving nuclear translocation of gadd153 and NF-kB; Molecular Brain Research, 2001, vol. 96: 30-38.
- Gonçalves JF, Nicoloso FT, da Costa P, Farias JG, Carvalho FB, da Rosa MM, Gutierrez JM, Abdalla FH, Pereira JSF, Dias GRM, Barbosa NBV, Dressler VL, Rubin MA, Morsch VM, Schetinger MRC; Behavior and brain enzymatic changes after long-term intoxication with cadmium salt or contaminated potatoes; Food and Chemical Toxicology, 2012, vol. 50: 3709-3718.
- Gong C-X, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I; Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease; Journal of Biological Chemistry, 2000, vol. 275: 5535-5544.
- Gongbo L, Chaeyoung K, Jaekwang K, Hyejin Y, Huadong Z, Jungsu K; Common Pesticide, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), Increases Amyloid- β Levels by Impairing the Function of ABCA1 and IDE: Implication for Alzheimer's Disease; Journal of Alzheimer's Disease, 2015, vol. 46: 109-122.
- Good DP, Perl DP, Bierer LM, Schmeidler J.; Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study; Annals of Neurology, 1992, vol. 31: 286-292.
- Gourier-Fréry C, Fréry N, Berr C, Cordier S, Garnier R, Isnard H, Ravault C, Renaudeau C ; Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire: Aluminium, Quels risques pour la santé?; Synthèse des études épidémiologiques, novembre 2003.
- Grandjean P, Weihe P, White RF et al; Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury; Neurotoxicology and Teratology, 1997, vol. 19 (6): 417-428.
- Griffin P, Mason H, Heywood K, Cocker J; Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study; Occupational and Environmental Medicine, 1999, vol. 56: 10-13.
- Grosman M, Picot A ; Le mercure des amalgames dentaires, l'un des principaux facteurs étiologiques de la Maladie d'Alzheimer?; 2007.
- Gruenwedel DW, Lu DS; Changes in the sedimentation characteristics of DNA due to methylmercuration; Biochemical and Biophysical Research Communications, 1970, vol. 40: 542-548.

- Guilarte TR, Burton NC, Verina T, Prabhu VV, Becker KG, Syversen T, Schneider JS; Increased APLP1 expression and neurodegeneration in the frontal cortex of manganese-exposed non-human primates; *Journal of Neurochemistry*, 2008, vol. 105 (5): 1948-1959.
- Gun RT, Kortjen AE, Jorm AF, Henderson AS, Broe GA, et al.; Occupational risk factors for Alzheimer disease: a case-control study; *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 1997, vol. 11: 21-27.
- Gupta A, Shukla GS; Ontogenic profile of brain lipids following perinatal exposure to cadmium; *Journal of Applied Toxicology*, 1996, vol. 16 (3): 227-233.
- Gupta RC, Milatovic S, Dettbarn WD, Aschner M, Milatovic D; Neuronal oxidative injury and dendritic damage induced by carbofuran: protection by memantine; *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, vol. 219: 97-105.
- Gupta S, Gajbhiye VT; Persistence of acetamiprid in soil; *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, vol. 78: 349-352.
- Gurer H, Ozgunes H, Neal R, Spitz DR, Ercal N; Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats; *Toxicology*, 1998, vol. 128: 181-189.
- Harada M; Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution; *Critical Reviews in Toxicology*, 1995, vol. 25: 1-24.
- Harrington CR, Wischik CM, McArthur FK, Taylor GA, Edwardson JM, Candy JA; Alzheimer's disease-like changes in tau protein processing: Association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients; *Lancet*, 1994, vol. 343, 993-997.
- Harris WR, Chen Y; Electron paramagnetic resonance and difference ultraviolet studies of Mn²⁺ binding to serum transferrin; *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1994, vol. 54 (1): 1-19.
- Hayden KM, Norton MC, Darcey D, Ostbye T, Zandi PP et al.; Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study; *Neurology*, 2010, vol. 74: 1524-1530.
- Hellström-Lindahl E, Ravid R, Nordberg A; Age dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A β levels; *Neurobiology of Aging*, 2008, vol. 29: 210-221.
- Hirata Y; Manganese-induced apoptosis in PC12 cells; *Neurotoxicol Teratol*, 2002, vol. 24 (5): 639-653.
- Holan G; New halocyclopropane insecticides and the mode of action of DDT; *Nature*, 1969, vol. 221: 1025-1029.
- Honda K, Casadesus G, Petersen RB, Perry G, Smith MA; Oxidative stress and redox-active iron in Alzheimer's disease; *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, vol. 1012: 179-82.
- Honig LS, Vellas B, Woodward M, Boada M, Bullock R, Borrie M, Hager K, Andreasen N, Scarpini E, Liu-Seifert H, Case M, Dean RA, Hake A, Sundell K, Poole Hoffmann V, Carlson C, Khanna R, Mintun M, DeMattos R, Selzler KJ, Siemers E; Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease; *The New England Journal of Medicine*, 2018, vol. 378: 321-330.
- INRS (Institut de Recherche et de Sécurité), Plomb et composés minéraux, Tirés à part des Cahiers de notes documentaires – Hygiène et sécurité du travail, 1998, n° 170-FT n° 59, 8p.
- Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Rizwanul Haq QM; Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants; *International Journal of Molecular Sciences* 2015, vol. 16: 29592–29630.
- Jeschke P, Nauen R; Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry; *Pest Management Science*, 2008, vol. 64 (11): 1084-1098.
- Jimenez-Jimenez F, Molina JA, Aguilar MV, et al.; Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Parkinson's disease; *Journal of Neural Transmission*, 1998, vol. 105: 497-505.
- Jin T, Lu J, Nordberg M; Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein; *NeuroToxicology*, 1998, vol. 19 (4-5): 529-536.

- Kawahara M, Kato-Negishi M; Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: The integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses; *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 276–393.
- Kennedy ME, Stamford AW, Chen X, Cox K, Cumming JN, Dockendorf MF, Egan M, Ereshefsky L, Hodgson RA, Hyde LA, Jhee S, Kleijn HJ, Kuvelkar R, Li W, Mattson BA, Mei H, Palcza J, Scott JD, Tanen M, Troyer MD, Tseng JL, Stone JA, Parker EM, Forman MS; The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients; *Science Translational Medicine*, 2016, vol. 2, 8(363).
- Keogh M, Jones P, Coulthard A, Chinnery PF, Burn J; Neuroferritinopathy: a new finding in a novel disease; *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2012, vol. 83.
- Kessler H, Bayer TA, Bach D, Schneider-Axmann T, Supprian T, Herrmann W, et al; Intake of copper has no effect on cognition in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial; *Journal of Neural Transmission*, 2008, vol. 115: 1181-1187.
- Kim CY, Nakai K, Kameo S, Kurokawa N, Liu ZM, Satoh H; Protective effect of melatonin on methylmercury-induced mortality in mice; *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2000, vol. 191(4): 241-246.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM; The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease; *Neuron*, 2009, vol. 63 (3): 287-303.
- Kishi R, Doi R, Fukuchi Y, Satoh H, Satoh T, Moriwaka F, Tashiro K, Takahata N, Sasatani H; Residual neurobehavioural effects associated with chronic exposure to mercury vapour; *Occupational and Environmental Medicine*, 1994, vol. 51: 35-41.
- Kitamura M, Sumiro K, Kamatanni N; Cadmium concentrations in livers, kidneys and bones of human bodies; *Japanese Journal of Public Health*, 1970, vol. 17: S07.
- Klevay LM; Alzheimer's disease as copper deficiency; *Medical Hypotheses*, 2008, vol. 70, 802-807.
- Kobayashi, Haruo, Uchida M, Sato I, Suzuki T, Hossain MM, Suzuki K; Neurotoxicity and Brain Regional Distribution of Manganese in Mice; *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 2003, vol. 22 (4): 679-689.
- Koedam EL, Lauffer V, Van der Vlies AE, Van der Flier WM, Scheltens P, Pijnenburg YA; Early-versus late-onset Alzheimer's disease: More than age alone; *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, vol.19: 1401–1408.
- Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, et al., Human health risk assessment for aluminum, aluminum oxide and aluminum hydroxide, *J Toxicol Environ Health B*, 2007, vol. 10 (Suppl 1): 1–269.
- Ksiezak-Reding H, Pyo HK, Feinstein B, Pasinetti GM; Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro; *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, vol. 1639: 159-168.
- Kwik-Urbe CL, Reaney S, Zhu Z, Smith D; Alterations in cellular IRP-dependent iron regulation by in vitro manganese exposure in undifferentiated PC12 cells; *Brain Research*, 2003, vol. 973 (1): 1-15.
- Lafuente A et al.; Toxic Effects of Methoxychlor Administered Subcutaneously on the Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis in Adult Rats; *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46 (5): 1570-1575.
- Landsberg JP, McDonald B, Watt F. ; Absence of aluminum in the neuritic plaque cores in Alzheimer's disease; *Nature*, 1992, vol. 360: 65–68.
- Leygonie R; Les métaux Lourds dans l'Air : sources, mesures, effets, *Pollution Atmosphérique*; 1993.
- Liu Y, Connor JR; Iron and ER stress in neurodegenerative disease; *Biometals*, 2012, vol. 25: 837-845.
- Lotti M, Moretto A; Organophosphate-induced delayed polyneuropathy; *Toxicological Reviews*, 2005, vol. 24 (1): 37-49.
- Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR; Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques; *Journal of the Neurological Sciences*, 1998, vol. 158: 47-52.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J; Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice; *The EMBO Journal*, 2011, vol. 20: 27–39.

- Mackert JR, Berglund A; Mercury exposure from dental amalgam fillings: absorbed dose and the potential for adverse health effects; *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1997, vol. 8: 410-428.
- Mailloux RJ, Lemire J, Appanna VD; Hepatic response to aluminum toxicity: dyslipidemia and liver diseases; *Experimental Cell Research*, 2011, vol. 317: 2231-2238.
- Makjanic J, McDonald B, Li-Hsian Chen CP, Watt F; Absence of aluminum in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease; *Neuroscience Letters*, 1998, vol. 240: 123-126.
- Malthankar GV, White BK, Bhushan A, Daniels CK, Rodnick KJ, Lai JC; Differential lowering by manganese treatment of activities of glycolytic and tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes investigated in neuroblastoma and astrocytoma cells is associated with manganese-induced cell death; *Neurochemical Research*, 2004, vol. 29 (4): 709-717.
- Manto M; Abnormal Copper Homeostasis: Mechanisms and Roles in Neurodegeneration; *Toxics* 2014, vol. 2: 327-345.
- Mason LH, Harp JP, Han DY; Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity; *BioMed Research International*, Volume 2014, 8 pages.
- Mathiesen T, Ellingsen DG, Kjuus H; Neuropsychological effects associated with exposure to mercury vapor among former chloralkali workers; *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 1999, vol. 25: 342-350.
- Mayeux G, Xhaufaire-Uhoda E, Pierard GE; Patterns of aluminum hydroxychloride deposition onto the skin; *Skin Research and Technology*, 2012, vol. 18: 64-69.
- Mead MN; Cadmium confusion: do consumers need protection?; *Environmental Health Perspectives*, 2010, vol. 118: 528-534.
- Mendez-Armenta M, Villeda-Hernandez J, Barroso-Moguel R, Nava-Ruiz C, Jimenez-Capdeville ME, Rios C; Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone; *Toxicology Letters*, 2003, vol. 144: 151-157.
- Miller LM, Wang Q, Telivala TP, Smith RJ, Lanzirrotti A, Miklossy J; Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn colocalized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease; *Journal of Structural Biology*, 2006, vol. 155: 30-37.
- Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, 2014.
- Miyata M, Smith JD; Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides; *Nature Genetics*, 1996, vol. 14: 55-61.
- Moore PB, Day JP, Taylor GA, Ferrier IN, Fifield LK, Edwardson JA; Absorption of aluminium-26 in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry; *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2000, vol. 11: 66-69.
- Moulton PV, Yang W; Air Pollution, Oxidative Stress, and Alzheimer's Disease; *Journal of Environmental and Public Health*, Volume 2012, Article ID 472751, 9 pages.
- Mutter J, Curth A, Naumann J, Deth R, Walach H; Does Inorganic Mercury Play a Role in Alzheimer's Disease? A Systematic Review and an Integrated Molecular Mechanism; *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, vol. 22: 357-374.
- Myers E, Fourie M, Zogoe HB, Naik I, Theodorou P, Tassel H, Daya A, Thompson ML; Nervous system effects of occupational manganese exposure on South African manganese mineworkers; *Neurotoxicology*, 2003, vol. 24 (4-5): 649-656.
- Myhre O, Utkilen H, Duale N, Brunborg G, Hofer T; Metal Dyshomeostasis and Inflammation in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Possible Impact of Environmental Exposures; Hindawi Publishing Corporation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2013, Article ID 726954.
- Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen JA; Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study; *The Lancet Oncology*, 2006, vol. 7 (2): 119-126.
- Nilsson U, Attewell R, Christoffersson Jo, Schutz A, Ahlgren L et al.; Kinetics of lead in bone and blood after end of occupational exposure; *Pharmacology and Toxicology*, 1991, vol. 69: 477-481.

- Nishiwaki Y, Maekawa K, Ogawa Y, Asukai N, Minami M, et al.; Effects of sarin on the nervous system in rescue team staff members and police officers 3 years after the Tokyo subway sarin attack; *Environmental Health Perspectives*, 2001, vol. 109: 1169-1173.
- Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friberg LT; *Handbook of Toxicology of Metals*, 3rd edition; Elsevier Publishers, Amsterdam, chap. 23: 445-480.
- Nunez MT, Urrutia P, Mena N, Aguirre P, Tapia V, Salazar J; Iron toxicity in neurodegeneration; *Biometals*, 2012, vol. 25: 761-776.
- Oberto A, Marks N, Evans HI, Guidoiti A; Lead (Pb²⁺) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, vol. 279: 435-442.
- Okuda B, Iwamoto Y, Tachibana H, Sugita M et al.; Parkinsonism after acute cadmium poisoning; *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 1997, vol. 99 (4): 263-265.
- Olanow CW, Good PF, Shinotoh H, Hewitt KA, Vingerhoets F, Snow BJ, Beal BF, Calne DB, Perl DP; Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study; *Neurology*, 1996, vol. 46 (2): 492-498.
- Olanow CW; Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease; *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, vol. 1012: 209-223.
- Olivieri G, Brack CH, Müller-Spahn F, Stähelin HB, Herrmann M, Renard P, Brockhaus M, Hock C; Mercury Induces Cell Cytotoxicity and Oxidative Stress and Increases b-Amyloid Secretion and Tau Phosphorylation in SHSY5Y Neuroblastoma Cells; *Journal of Neurochemistry*, 2000, 74 (1): 231-236.
- Pancrazi MP, Métais P; Prise en charge non médicamenteuse dans les démences sévères; *Psychologie et NeuroPsychiatrie du Vieillissement*, 2005, vol. 3 (Suppl. 1): S42-S50.
- Park JD, Zheng W; Human Exposure and Health Effects of Inorganic and Elemental Mercury, *Journal of Preventive Medicine & Public Health*, 2012, vol. 45 : 344-352.
- Parkinson IS, Ward MK, Kerr DNS; Dialysis encephalopathy, bone disease and anaemia: The aluminium intoxication syndrome during regular haemodialysis; *Journal of Clinical Pathology*, 1981, vol. 34: 1285-1294.
- Parron T, Requena M, Hernandez AF, Alarcon R; Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases; *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, vol. 256: 379-385.
- Pei JJ, An WL, Zhou XW, Nishimura T, Norberg J, Benedikz E, Gotzd J, Winblad B; P70 S6 kinase mediates tau phosphorylation and synthesis; *FEBS Letters*, 2006, vol. 580: 107-114.
- Perl DP, Moalem S; Aluminum and Alzheimer's disease, a personal perspective after 25 years; *Journal of Alzheimer's Disease*, 2006, vol. 9: 291-300.
- Pocock SJ, Smith M, Baghurst P; Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence; *British Medical Journal*, 1994, vol. 309: 1189-1197.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I et al.; A disintegrin metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model; *Journal of Clinical Investigation*, 2004, vol. 113: 1456-1464.
- Powis DA, O'Brien KJ, Harrison SM, Jarvie PE, Dunkley PR; Mn²⁺ can substitute for Ca²⁺ in causing catecholamine secretion but not for increasing tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells; *Cell Calcium*, 1996, vol. 19 (5): 419-429.
- Radlowski EC, Johnson R; Perinatal iron deficiency and neurocognitive development; *Frontiers in Human Neuroscience*, 2013, vol. 7: 585.
- Ramwell CT, Johnson PD, Boxall AB, Rimmer DA; Pesticide residues on the external surfaces of field crop sprayers: occupational exposure; *Annals of Occupational Hygiene*, 2005, vol. 49: 345-350.
- Ranjbar A, Pasalar P, Sedighi A, Abdollahi M; Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers; *Toxicology Letters*, 2002, vol. 131: 191-194.

- Rappot ToxProbe Inc. for Toronto Public Health, 1994; Cadmium (Cd) and its compounds.
- Recommandations de la HAS, 2011.
- Règlement (ce) no 1881/2006 de la Commission du 19/12/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.
- Reidy TJ, Bowler RM, Rauch SS, Pedroza GI; Pesticide exposure and neuropsychological impairment in migrant farm workers; Archives of Clinical Neuropsychology, 1992, vol. 7: 85-95.
- Reitz C, Mayeux R; Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers; Biochemical Pharmacology, 2014, vol. 88 (4): 640-651.
- Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Anderton BH; 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-3 β ; Journal of Neurochemistry, 2000, vol. 74: 1587-1595.
- Richardson JR, Roy A, Shalat SL, von Stein RT, Hossain MM, Buckley B, Gearing M, Levey AI, German DC; Elevated Serum Pesticide Levels and Risk for Alzheimer Disease; JAMA Neurology, 2014, vol. 71 (3): 284-290.
- Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A et al.; Metalprotein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial; Archives of Neurology, 2003, vol. 60: 1685-1691.
- Rodier J; Manganese poisoning in Moroccan miners; British Journal of Industrial Medicine, 1955, vol. 12 (1): 21-35.
- Rohlman DS, Lasarev M, Anger WK, Scherer J, Stupfel J, et al.; Neurobehavioral performance of adult and adolescent agricultural workers; Neurotoxicology, 2007, vol. 28: 374-380.
- Roider G, Drasch G, Graw M; Death following accidental intravenous infusion of an aluminium irrigation solution; Toxichem Krimtech, 2011, vol. 78: 344-346.
- Roldan-Tapia L, Parron T, Sanchez-Santed F; Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphate pesticides; Neurotoxicology and Teratology, 2005, vol. 27: 259-266.
- Roldan-Tapia L, Nieto-Escamez FA, Aguila EM, Laynez F, Parron T, et al.; Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides; Neurotoxicology and Teratology, 2006, vol. 28: 694-703.
- Romanish MT, Cohen CJ, Mager DL; Potential mechanisms of endogenous retroviral-mediated genomic instability in human cancer; Seminars in Cancer Biology, 2010, vol. 20 (4): 246-253.
- Rondeau V, Commenges D, Jacqmin-Gadda H, Dartigues JF; Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: an 8-year follow-up study; American Journal of Epidemiology, 2000, vol. 152: 59-66.
- Rosenstock L, Keifer M, Daniell WE, Mcconnell R, Claypoole K; Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication; The Pesticide Health Effects Study Group; Lancet, 1991, vol. 338: 223-227.
- Roth JA., Feng L, Walowitz J, Browne RW; Manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death is independent of caspase activation; Journal of Neuroscience Research, 2000, vol. 61 (2): 162-171.
- Rottkamp CA, Raina AK, Zhu X, Gaier E, Bush AI, Atwood CS, Chevion M, Perry G, Smith MA; Redox-active iron mediates amyloid- β toxicity; Free Radical Biology & Medicine, 2001, vol. 30: 447-450.
- Rubinstein H, La vérité sur la maladie d'Alzheimer, Paris : Presses Universitaires de France, 2016.
- Rulon LL, Robertson JD, Lovell MA, Deibel MA, Ehmann WD, Markesbery WR; Serum zinc levels and Alzheimer's disease; Biological Trace Element Research, 2000, vol. 75: 79-85.
- Rusina R, Matej R, Kasparova L, Kukal J, Urban P; Higher aluminum concentration in Alzheimer's disease after Box-Cox data

- transformation; *Neurotoxicity Research*, 2011, vol. 20: 329-333.
- Sabbagh C, De Menthère N; Pesticides, agricultures, environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux; Expertise scientifique collective, éditions Inra-Cemagref, 2005.
- Sanders AP, Claus Henn B, Wright RO; Perinatal and Childhood Exposure to Cadmium, Manganese, and Metal Mixtures and Effects on Cognition and Behavior: A Review of Recent Literature; *Current Environmental Health Reports*, 2015, vol. 2 (3): 284-294.
- Santé Canada, Bureau de l'eau, de l'air et des changements climatiques, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs; Evaluation du risque pour la santé humaine du manganèse inhalé; Santé Canada publications, 2010 : 100123.
- Savage EP, Keefe TJ, Mounce LM, Heaton RK, Lewis JA, et al.; Chronic neurological sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning; *Archives of Environmental & Occupational Health*, 1988, vol. 43: 38-45.
- Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D; Heme-oxygenase 1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement; *Journal Of Neurochemistry*, 2009, vol. 110: 469-485.
- Schwartz J; Low-level lead exposure and children's IQ: a meta-analysis and search for a threshold; *Environmental Research*, 1994, vol. 65: 42-55.
- Sener G, Özer Sehirli A, Ayanoglu-Dülger G; Melatonin Protects Against Mercury(II)-Induced Oxidative Tissue Damage in Rats; *Pharmacology & Toxicology*, 2003, vol. 93: 290-296
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'agostino RB, et al.; Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease; *The New England Journal of Medicine*, 2002, vol. 346: 476-483.
- Seux R, Dab W; Evaluation de l'exposition au plomb et stratégie de prévention; *TSM*, 1994, vol. 2: 73-78.
- Sevalle J; Etude de la production et de la dégradation du peptide amyloïde dans la maladie d'Alzheimer; Thèse dirigée par le Dr. Frédéric Checler, 2008.
- Shadlen MF, Larson EB, Yukawa M; The epidemiology of Alzheimer's disease and vascular dementia in Japanese and African-American populations: the search for etiological clues; *Neurobiology of Aging*, 2000, vol. 21 (2): 171-181.
- Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ; Biomedical Implications of Heavy Metals Induced Imbalances in Redox Systems; *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 640754, 26 pages.
- Shinotoh H, Snow BJ, Hewitt KA, Pate BD, Doudet D, Nugent R, Perl DP, Olanow W, Calne DB; MRI and PET studies of manganese-intoxicated monkeys; *Neurology*, 1995, vol. 45 (6): 1199-1204.
- Shoskes DA, Radzinski CA, Struthers NW, Honey RJ; Aluminum toxicity and death following intravesical alum irrigation in a patient with renal impairment; *Journal of Urology*, 1992, vol. 147: 697-699.
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Aschner M; Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity; *BMC Pharmacology and Toxicology*, 2013, vol.14: 23.
- Simons TJ; Calcium and neuronal function; *Neurosurgical Review*, 1988, vol. II: 119-129.
- Singh I, Sagare AP, Coma M, Perlmutter D, Gelein R, Bell RD, et al.; Low levels of copper disrupt brain amyloid-beta homeostasis by altering its production and clearance; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, vol. 110: 14771-14776.
- Singh N, Chhillar N, Banerjee B, Bala K, Basu M, Mustafa M; Organochlorine pesticide levels and risk of Alzheimer's disease in north Indian population; *Human & Experimental Toxicology*, 2013, vol. 32 (1): 24-30.
- Smith MA, Zhu X, Tabaton M, Liu G, McKeel DW, Cohen ML, Wang X, Siedlak SL, Hayashi T, Nakamura M, Nunomura A, Perry G; Increased Iron and Free Radical Generation in Preclinical Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment; *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, vol. 19: 363-372.
- Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, et al.;

- Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment; *Toxicology*, 2002, vol. 171: 3-59.
- Solomon B, Koppel R, Jossiphov J; Immunostaining of calmodulin and aluminium in Alzheimer's disease affected brains; *Brain Research Bulletin*, 2001, vol. 55: 253-256.
- Son J, Lee SE, Park BS et al.; Biomarker discovery and proteomic evaluation of cadmium toxicity on a collembolan species, *Paronychiurus kimi* (Lee); *Proteomics*, 2011, vol. 11 (11): 2294-2307.
- Sparks DL, Schreurs BG; Trace amounts of copper in water induce β -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, vol. 100: 11065-11069.
- Spisni E, Valerii MC, Manerba M, Strillacci A, Polazzi E, Mattia T, Griffoni C, Tomasi V; Effect of copper on extracellular levels of key pro-inflammatory molecules in hypothalamic GN11 and primary neurons; *Neurotoxicology*, 2009, vol. 30: 605-612.
- Squitti R, Pasqualetti P, DalForno G, Moffa F, Cassetta E, Lupoi D, et al.; Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease; *Neurology*, 2005, vol. 64: 1040-1046.
- Squitti R, Barbati G, Rossi L, Ventriglia M, Dal Forno G, Cesaretti S, et al.; Excess of nonceruloplasmin serum copper in AD correlates with MMSE, CSF beta-amyloid and h-tau; *Neurology*, 2006, vol. 67: 76-82.
- Squitti R, Polimanti R; Copper phenotype in Alzheimer's disease: Dissecting the pathway; *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2013, vol. 2: 46-56.
- Stallings NR, O'Neal MA, Hu J, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Malter JS; Pin1 mediates A β 42-induced dendritic spine loss; *Science Signaling*, 2018, vol. 11: 522.
- Steenland K, Jenkins B, Ames RG, O'malley M, Chrislip D, et al.; Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning; *American Journal of Public Health*, 1994, vol. 84: 731-736.
- Steenland K, Dick RB, Howell RJ, Chrislip DW, Hines CJ, et al; Neurologic function among termiticide applicators exposed to chlorpyrifos; *Environmental Health Perspectives*, 2000, vol. 108: 293-300.
- Sugita M; The biological half-time of heavy metals, the existence of a third « slowest » component; *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1978, vol. 41: 25-40.
- Sziraki I, Mohanakumar KP, Rauhala P, Kim HG, Yeh KJ, Chiueh CC; Manganese: a transition metal protects nigrostriatal neurons from oxidative stress in the iron-induced animal model of parkinsonism; *Neuroscience*, 1998, vol.85 (4): 1101-1111.
- Takeda and Zinfandel Pharmaceuticals Discontinue TOMMORROW Trial Following Planned Futility Analysis, January 25, 2018.
- Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP; Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation; *Experimental Cell Research*, 2003, vol. 286 (2): 355-365.
- Tanner CM, Goldman SM, Webster Ross G, Grate SJ; The disease intersection of susceptibility and exposure: Chemical exposures and neurodegenerative disease risk; *Alzheimer's Disease and Dementia*, 2014, vol. 10: S213-S225.
- Testud F, Garnier R, Delemotte B; Insecticides organophosphorés, carbamates anticholinestérasiques et pyréthriinoïdes de synthèse; *Toxicologie humaine des produits phytosanitaires*, Paris: ESKA, 2001, p. 67-116.
- Testud F, Grillet JP; Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes de synthèse et divers ; *Toxicologie - Pathologie professionnelle*, 2007, EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), 16-059-C-10.
- Thatcher RW, Lester ML, McAlaster R, Horst R; Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive functioning in children; *Archives of Environmental Health*, 1982, vol. 37 (3): 159-166.
- Thies W, Bleiler L; Alzheimer's Association Report 2013, Alzheimer's disease facts and figures; *Alzheimer's and Dementia*, 2013, vol. 9: 208-245.
- Thompson JA; Balance between intake and output of lead in normal individuals; *British*

- Journal of Industrial Medicine, 1971, vol. 28: 189-194.
- Tian Y, Yang Z, Zhang T; Zinc ion as modulator effects on excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons in Wistar rats; *Neuroscience Research*, 2010, vol. 68: 167-175.
- Tyas SL, Manfreda J, Strain LA, Montgomery PR; Risk factors for Alzheimer's disease: a population-based, longitudinal study in Manitoba, Canada; *International Journal of Epidemiology*, 2001, vol. 30: 590-597.
- Ueda F, Raja KB, Simpson RJ, Trowbridge IS, Bradbury MW; Rate of ⁵⁹Fe uptake into brain and cerebrospinal fluid and the influence thereon of antibodies against the transferrin receptor; *Journal of Neurochemistry*, 1993, vol. 60 (1): 106-113.
- Ueda K, Kawano H, Hasuo Y, Fujishima M; Prevalence and etiology of Dementia in a Japanese community; *Stroke*, 1992, vol. 23: 798-803.
- Vachon PH; Survie cellulaire : différences et différenciation; *Medecine/Sciences*, 2006, vol. 22: 423-429.
- Vale JA; Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning; *Toxicology Letters*, 1998, 102-103: 649-652.
- Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC; Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2); *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32 (14): 4100-4108.
- Viglietta V, O'Gorman J, Williams L, Tian Y, Sandrock A, Doody R, Salloway S, Barkhof F, Vellas B, Sano B, Aisen P, Sevigny J; Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Studies to Evaluate Treatment with Aducanumab (BIIB037) in Patients with Early Alzheimer's Disease: Phase 3 Study Design (S1.003); *Neurology*, 2016, vol. 86 (16), Supplement S1.003.
- Vilahur N, Vahter M, Broberg K; The Epigenetic Effects of Prenatal Cadmium Exposure; *Current Environmental Health Report*, 2015, vol. 2: 195-203.
- Walton JR; An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration; *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007, vol. 101: 1275-1284.
- Walton JR; Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminum equivalents; *Neurotoxicology*, 2009, vol. 30: 182-293.
- Walton JR; Evidence for participation of aluminum in neurofibrillary tangle formation and growth in Alzheimer's disease; *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, vol. 22: 65-72.
- Walton JR; Aluminium's Involvement in the Progression of Alzheimer's Disease; *Journal of Alzheimer's Disease*, 2013, vol. 35: 7-43.
- Wang B, Du Y; Cadmium and Its Neurotoxic Effects; Hindawi Publishing Corporation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2013, Article ID 898034, 12 pages.
- Weiner JA, Nylander M; The relationship between mercury concentration in human organs and different predictor variables; *Science of the Total Environment*, 1993, vol. 138 (1-3): 101-115.
- Wesseling C, Keifer M, Ahlbom A, McConnell R, Moon JD, et al.; Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticides among banana workers; *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 2002, vol. 8: 27-34.
- Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yenugadhati N, Wisniewski TM, Arnold IMF, Momoli F, Krewski D; Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts; *Critical Reviews in Toxicology*, 2014, vol. 44 (S4): 1-80.
- Williams S, Gregory A, Hogarth P, Hayflick SJ, Gillingham MB; Metabolism and energy requirements in pantothenate kinase-associated neurodegeneration; *Molecular Genetics and Metabolism*, 2013, vol. 110: 336-341.
- Xu B, Chen S, Luo Y et al.; Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen

- species and activation of MAPK/mTOR network; PLoS One, 2011, vol. 6 (4): article ID e19052.
- Yegambaram M, Manivannan B, Beach TG, Halden RU; Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: A Review; Current Alzheimer Research, 2015, vol. 12: 116-146.
- Yokel RA, McNamara PJ; Aluminum toxicokinetics: an updated minireview; Pharmacology and Toxicology, 2001, vol. 88: 159-167.
- Yu AC, Drejer J, Hertz L, Schousboe A; Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons; Journal of Neurochemistry, 1983, vol. 41 (5): 1484-1487.
- Yumoto S, Kakimi S, Ohsaki A, Ishikawa A; Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease; Journal of Inorganic Biochemistry, 2009, vol. 103: 1579-1584.
- Zalups RK; Molecular interactions with mercury in the kidney; Pharmacological Reviews, 2000, vol. 52: 113-143.
- Zawia NH, Wu J, Basha MR; The environment, epigenetics and amyloidogenesis; Journal of Molecular Neuroscience, 2008, vol. 34: 1-7.
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR; Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders; Nature Reviews Neuroscience, 2004, vol. 5: 863-873.
- Zhang S, Fu J, Zhou Z; Changes in the brain mitochondrial proteome of male Sprague-Dawley rats treated with manganese chloride; Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, vol. 202 (1): 13-17.
- Zhang Y, Dong Z, Nomura M, Zhong S, Chen N, Bode AM; Signal transduction pathways involved in phosphorylation and activation of p70S6K following exposure to UVA irradiation; Journal of Biological Chemistry, 2001, vol. 276: 20913-20923.
- Zheng W, Zhao Q; Iron overload following manganese exposure in cultured neuronal, but not neuroglial cells; Brain Research, 2001, vol. 897 (1-2): 175-179.
- Zlotkin SH, Atkinson S, Lockitch G; Trace elements in nutrition for premature infants; Clinics in Perinatology, 1995, vol. 22 (1): 223-240.
- Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS; Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using; Neurotoxicology, 2004, vol. 25 (4): 573-587.

Title: Influence of heavy metals and pesticides on Alzheimer's Disease.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease is a neurodegenerative disease that occurs most often from 65 years. Its progression is slow and insidious. This disease associates cognitive disorders, brain lesions called senile plaques and neurofibrillary tangles, brain atrophy due to neuronal loss and neurotransmitters dysfunctions.

Several etiological factors have been determined. Among them is the apoE gene that has an important polymorphism, education or quality of life. However, many etiological factors remain to be highlighted and are under study. Environmental pollutants draw attention of researchers in recent decades regarding their potential impact on Alzheimer's disease, particularly heavy metals and pesticides whose neurotoxicity is well known and their presence is ubiquitous. Some metals are crucial for the proper neurological functions, such as iron, copper or zinc, and need a subtle homeostasis. Others, such as pesticides, are unwanted elements whose cumulative chronic toxicity may alter cognition, neurotransmitter functioning and promote oxidative stress. Heavy metals and pesticides may also influence the formation, aggregation and clearance of A β peptides or Tau phosphorylation, which is found in Alzheimer's Disease. All of these effects depend on the group of contaminants studied and also on each pollutant within a same group.

The results of the work published so far show a positive correlation between exposure to heavy metals and pesticides and Alzheimer's Disease development, especially during an early exposure in fetal life or childhood, or in workers chronically exposed. In the current context of an aging population and the lack of effective treatments, the cocktail of environmental contaminants to which the population is continually exposed is an important risk factor in the development of Alzheimer's Disease that is crucial to explore.

RESUME

La Maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative qui se manifeste le plus souvent à partir de 65 ans. De progression lente et insidieuse, elle associe des troubles cognitifs, des lésions cérébrales appelées plaques séniles et enchevêtrements neurofibrillaires, une atrophie cérébrale due à la perte neuronale, ainsi qu'une perturbation de divers neurotransmetteurs.

Plusieurs facteurs étiologiques ont été déterminés. Parmi eux le gène de l'apoE qui présente un polymorphisme important, l'éducation ou encore le niveau de vie. Cependant, nombre de facteurs étiologiques restent à mettre en évidence et sont à l'étude. Les contaminants environnementaux attirent l'attention des chercheurs ces dernières décennies en ce qui concerne leur impact possible dans la Maladie d'Alzheimer, et plus particulièrement les métaux lourds et les pesticides dont la neurotoxicité est bien connue et la présence ubiquitaire. Certains métaux sont indispensables au bon fonctionnement neurologique, comme par exemple le fer, le cuivre ou le zinc, et nécessitent une homéostasie fine. D'autres, comme les pesticides, sont des éléments indésirables dont la toxicité chronique cumulative peut entraîner des altérations cognitives et une perturbation des principaux neurotransmetteurs ou favoriser le stress oxydatif. Les métaux lourds et les pesticides sont également capables d'influer la formation, l'agrégation et l'élimination des peptides A β ou encore la phosphorylation de la protéine Tau, que l'on retrouve dans la Maladie d'Alzheimer. L'ensemble de ces effets est dépendant de la famille de contaminants étudiée, mais aussi de chaque contaminant au sein d'une même classe.

Par ailleurs, les résultats des travaux parus à ce jour montrent une corrélation positive entre l'exposition aux métaux lourds et aux pesticides et le développement de la Maladie d'Alzheimer, notamment lors d'une exposition précoce durant la vie foetale ou l'enfance, ou encore chez les travailleurs exposés de manière chronique. Dans le contexte actuel avec une population vieillissante et l'absence de traitements efficaces, le cocktail de contaminants environnementaux auquel est continuellement exposée la population constitue un facteur de risque important contribuant au développement de la Maladie d'Alzheimer qu'il est crucial d'explorer.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : Maladie d'Alzheimer, Contaminants Environnementaux, Métaux Lourds, Pesticides

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 Chemin des Maraîchers
31400 Toulouse

Directeurs de thèse : Dr Fernandez-Vidal Anne, Dr Boutet Elisa.