UNIVERSITE DE MONASTIR
Ecole Doctorale Sciences Biologiques, Biotechnologie et Santé
Université de BOURGOGNE
Ecole Doctorale Science Vie

THESE

Présentée en vue de l'obtention du titre de

Docteur en Sciences Biologiques & Biotechnologiques

par

Amira ZARROUK

Implication de l'Acide Docosanoïque (C22:0) et des Acides Gras à Très Longue Chaîne (Acide Tétracosanoïque (C24:0), Acide Hexacosanoïque (C26:0)) dans la Maladie d'Alzheimer : Aspects Biologiques et Cliniques

Soutenue publiquement le 19 décembre 2013 à Monastir devant le Jury :

Mr Abed Raouf KENANI	Professeur, Université de Monastir	**Président**
Mme Olfa MASMOUDI KOUKI	Maître de Conférences, Université de Tunis El Manar	**Rapporteur**
Mme Nathalie CARTIER-LACAVE	Professeur, Université Paris V	**Rapporteur**
Mr Stéphane SAVARY	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	**Examinateur**
Mr Mohamed HAMMAMI	Professeur, Université de Monastir	**Directeur de Thèse**
Mr Gérard LIZARD	Chargé de Recherche INSERM, Dijon	**Directeur de Thèse**

Travail réalisé au Laboratoire de Biochimie, LR12ES05 'Nutrition –Aliments Fonctionnels et Santé Vasculaire' Faculté de Médecine, Monastir, Tunisie et au laboratoire Bio-PeroxIL, 'Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique' EA7270 / INSERM, Faculté des Sciences Gabriel, Dijon, France

AVANT PROPOS

Ce travail de Thèse de Doctorat s'inscrit dans le cadre des programmes de recherche sur « la Biochimie des Lipides ». Il a été conçu et réalisé :

- Au Laboratoire Bio-peroxIL (Biochimie des Lipides, Inflammation et Métabolisme Lipidique » EA7270 (Université de Bourgogne / INSERM) à Dijon (France) pour l'aspect *in vitro* et modèle animal, sous la direction du Dr Gérard LIZARD.

- Au Laboratoire de Biochimie, LR12ES05 'Nutrition-Aliments Fonctionnels et Santé Vasculaire', Monastir (Tunisie) pour l'aspect biochimie analytique et étude clinique, sous la direction du Professeur Mohamed HAMMAMI.

Ce travail a été rendu possible financièrement par le soutien du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Tunisie), de l'Université de Monastir (LR12ES05) et de l'Université de Bourgogne, de la Région Bourgogne, du CHU de Dijon (Service Neurologie), de l'ABASIM (Dijon) et de l'EPS F. Bourguiba (Monastir).

Dédicace

À ma mère ***Rafika*** *et mon père* ***Habib,***

À ma sœur ***Faten*** *et son mari* ***Zouhaier****,*

À ma sœur ***Amal*** *et son mari* ***Mahmoud,***

À ma sœur ***Oumayma*** *et mon frère* ***Haithem****,*

Pour m'avoir entourée, conseillée et encouragée depuis toujours.

À mon adorable neveu ***Mohammed Aslem****.*

Cette Thèse est la vôtre.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes vifs remerciements au Pr ***Olfa MASMOUDI KOUKI*** *et au Pr* ***Nathalie CARTIER-LACAVE*** *pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier le Pr* ***Abed el Raouf KENANI*** *et le Pr* ***Stéphane SAVARY*** *de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de Thèse.*

La réalisation de cette Thèse n'aurait jamais été possible sans l'aide de nombreuses personnes envers lesquelles je suis infiniment redevable. Aussi, je tiens tout particulièrement à les remercier.

Je tiens à adresser mes remerciements au Pr ***Mohamed HAMMAMI****, Professeur à la Faculté de Médecine de Monastir, chef du Laboratoire de Biochimie et de Spectrométrie de Masse et chef du Laboratoire « Nutrition –Aliments fonctionnels et santé LR» pour m'avoir accueillie dans son Laboratoire et qui m'a fait l'honneur de diriger ma Thèse.*

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au Dr ***Gérard LIZARD*** *qui a été mon Directeur de Thèse pendant ces trois années. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au Laboratoire de « Biochimie du peroxysome, inflammation et métabolisme lipidique ». Je rends hommage à son honnêteté scientifique et morale. Ses enseignements ont toujours été d'une grande qualité, m'ont énormément apporté et resteront un exemple pour moi.*

Je remercie les membres du laboratoire NAFS pour leurs conseils, leur confiance et leur aide technique. Un remerciement particulier à Dr ***Imed CHREIF*****.**

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr ***Mahbouba FRIH*** *et au Dr* ***Wafa CHAABANE*** *et à tout le personnel du service de neurologie de l'Hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir.*

J'exprime également mes remerciements au Pr ***Abdelhédi MILED*** *et aux personnels du Laboratoire de Biochimie, Hôpital Farhat Hached de Sousse pour leur aide technique, pour la réalisation des dosages biochimiques de routine.*

Mes plus vifs remerciements sont aussi adressés au Dr ***Jean Marc RIEDINGER*** *(pharmacien-biologiste, Laboratoire de Biologie, Centre Georges-François Leclerc, Dijon) pour sa gentillesse, son écoute et la pertinence de ses analyses statistiques qui ont conduit au dépôt de Brevet. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.*

Mes plus vifs remerciements vont également au Dr ***Patrick ROIGNOT*** *(médecin pathologiste, co-Directeur du Centre de Pathologie, Dijon) pour m'avoir permis de faire un stage dans son Laboratoire. Stage au cours duquel j'ai pu découvrir le fonctionnement d'un Laboratoire de Pathologie et m'initier aux techniques d'immunohistochimie. Merci à toutes les techniciennes du laboratoire pour leur gentillesse et leur disponibilité.*

J'exprime également mes remerciements au Pr ***Maurice GIROUD*** *et au Dr* ***Olivier ROUAUD*** *(Service de Neurologie, Dijon) pour avoir contribué au soutien financier de mon travail de 3ème et 4ème année de Thèse dans le cadre d'interaction avec l'Unité Fonctionnelle Centre Mémoire Ressources et Recherche (CMRR) du CHU de Dijon.*

Mes remerciements sont aussi adressés au Dr ***Marie-Stéphane AIGROT*** *(INSERM / Centre de la Moelle Epinière et du Cerveau, CHU Pitiè-Salpêtrière, Paris) pour m'avoir accueillie dans son Laboratoire, m'avoir initiée à la culture primaire de neurones murins et m'avoir fournie des cerveaux et du sang de souris transgéniques APP PS1 ΔE9.*

Merci à tous les membres du laboratoire Bio-PeroxIL (EA7270, Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique) de l'université de Bourgogne, Dijon, pour leur gentillesse. Merci en particulier à ***Thomas NURY*** *et* ***Anne VEJUX*** *pour leurs disponibilités, leurs aides et conseils.*

*Je voudrais remercier aussi mes ami(e)s pour leur soutien et leur amitié, leurs conseils, et pour tous les bons moments passés ensemble et nos discussions interminables dont je ne me lasserai jamais (****Wafa****,* ***Mounira****,* ***Manel****,* ***Samia****,* ***Meriem****,* ***Latifa****,* ***Fadwa****,* ***Imen****,* ***Zahra****,* ***Hala****,* ***Maha, Sami****,* ***Atiullah****,* ***Raafet, Sofiène et Hafsia****).*

Que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail trouvent dans ces lignes mes remerciements les plus chaleureux

LISTE DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Publications de Recherche

1. **ZARROUK A**, VEJUX A, NURY T, EL HAJJ H, HADDAD M, CHERKAOUI-MALKI M, RIEDINGER JM, HAMMAMI M, LIZARD G. **INDUCTION OF MITOCHONDRIAL CHANGES ASSOCIATED WITH OXIDATIVE STRESS ON VERY LONG CHAIN FATTY ACIDS (C22:0, C24:0, OR C26:0)-TREATED HUMAN NEURONAL CELLS (SK-NB-E).** ***Oxid Med Cell Longev***, 2012; 2012:623257.

2. NURY T, **ZARROUK A**, VEJUX A, DORIA M, RIEDINGER JM, DELAGE-MOURROUX R, LIZARD G. **INDUCTION OF OXIAPOPTOPHAGY, A MIXED MODE OF CELL DEATH ASSOCIATED WITH OXIDATIVE STRESS, APOPTOSIS AND AUTOPHAGY, ON 7-KETOCHOLESTEROL-TREATED 158N MURINE OLIGODENDROCYTES: IMPAIRMENT BY ALPHA-TOCOPHEROL.** ***Biochem Biophys Res Commun*****.** 2013 (accepté pour publication).

3. RAGOT K, MACKRILL JJ, **ZARROUK A**, NURY T, AIRES V, JACQUIN A, ATHIAS A, PAIS DE BARROS JP, VÉJUX A, RIEDINGER JM, DELMAS D, LIZARD G. **ABSENCE OF CORRELATION BETWEEN OXYSTEROL ACCUMULATION IN LIPID RAFT MICRODOMAINS, CALCIUM INCREASE, AND APOPTOSIS INDUCTION ON 158N MURINE OLIGODENDROCYTES**. ***Biochem Pharmacol.*** 2013; 86(1): 67-79.

4. NURY T, SAMADI M, **ZARROUK A**, RIEDINGER JM, LIZARD G. **IMPROVED SYNTHESIS AND IN VITRO EVALUATION OF THE CYTOTOXIC PROFILE OF OXYSTEROLS OXIDIZED AT C4 (4*α*- AND 4β-HYDROXYCHOLESTEROL) AND C7 (7-KETOCHOLESTEROL, 7*α*- AND 7β-HYDROXYCHOLESTEROL) ON CELLS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM.** ***Eur J Med Chem*****.** 2013 ; 70 : 558-567

5. TROMPIER D, VEJUX A, **ZARROUK A**, GONDCAILLE C, GEILLON F, NURY T, LIZARD G. **BRAIN PEROXISOMES.** ***Biochimie*** 2013.

6. VEJUX A, MONTANGE T, MARTINE L, **ZARROUK A**, RIEDINGER JM, LIZARD G. **ABSENCE OF OXYSTEROL-LIKE SIDE EFFECTS IN HUMAN MONOCYTIC CELLS TREATED WITH PHYTOSTEROLS AND OXYPHYTOSTEROLS.** ***J Agric Food Chem*** 2012; 60(16): 4060-4066.

7. BAARINE M, ANDREOLETTI P, ATHIAS A, NURY T, **ZARROUK A**, RAGOT K, VEJUX A, RIEDINGER JM, KATTAN Z, BESSÈDE G, TROMPIER D, SAVARY S, CHERKAOUI-MALKI M, LIZARD G. **EVIDENCE OF OXIDATIVE STRESS IN VERY LONG CHAIN FATTY ACID - TREATED OLIGODENDROCYTES AND POTENTIALIZATION OF ROS PRODUCTION USING RNA INTERFERENCE DIRECTED KNOCKDOWN OF ABCD1 AND ACOX1 PEROXISOMAL PROTEINS.** ***Neuroscience*** 2012; 213: 1-18.

8. NURY T , SAMADI M, VARIN A , LOPEZ T, **ZARROUK A**, BOUMHRAS M, RIEDINGER JM, MASSON D, VEJUX A, LIZARD G. **BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE LXRα AND β AGONIST, 4β-HYDROXYCHOLESTEROL, AND OF ITS ISOMER, 4α-HYDROXYCHOLESTEROL, ON OLIGODENDROCYTES: EFFECTS ON CELL GROWTH AND VIABILITY, OXIDATIVE AND INFLAMMATORY STATUS.** ***Biochimie***, 2013; 95(3): 518-530.

Brevet

Brevet France (dépôt); Au(x) Nom(s) de : UNIVERSITE DE BOURGOGNE / FACULTE DE MEDECINE DE MONASTIR (LR12ES05).

Inventeurs) : Gérard Lizard / Mohamed Hammami / Amira Zarrouk

Dénomination Conventionnelle : BIOMARQUEUR DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Numéro : 13.58513 ; Date : 05.09.2013

Communications présentées à des Congrès Nationaux & Internationaux

- ✓ Congrès Internationaux

1. **Amira ZARROUK**, Thomas NURY, Anne VEJUX, Gérard LIZARD. **INDUCTION OF MITOCHONDRIAL, PEROXISOMAL AND LYSOSOMAL CHANGES ON VERY LONG CHAIN FATTY ACID–TREATED HUMAN NEURONAL CELLS.** *3rd Open European Peroxisome Meeting – Dijon, 5-6 juillet 2012.*

2. **Amira ZARROUK**, Thomas NURY, Mohamed HAMMAMI, Gérard LIZARD. **FLOW CYTOMETRIC AND MICROSCOPICAL EVIDENCES OF MITOCHONDRIAL DAMAGES IN HUMAN NEURONAL CELLS (SK-NB-E) TREATED WITH VERY LONG CHAIN FATTY ACIDS (C22:0; C24:0; AND C26:0).** *CYTO 2012: ISAC's XXVII Congress, Leipzig, Germany, 23-27 June, 2012.*

3. **Amira ZARROUK ,** Thomas NURY , Anne VEJUX, Gérard LIZARD**. SATURATED VERY LONG CHAIN FATTY ACID-INDUCED NEURONAL DYSFUNCTIONS PLAYING ESSENTIAL ROLES IN ALZHEIMER'S DISEASE: IMPAIRMENT OF MITOCHONDRIAL ACTIVITY, INDUCTION OF OXIDATIVE STRESS AND CYTOSKELETON DISORGANIZATION.** 16th Congress of the European Federation of Neurological Societies - EFNS 2012, Stockholm, Sweden, September 8-11, 2012; Eur J Neurol Vol 19, Supplement 1, septembre 2012.

4. **Amira ZARROUK,** Gérard LIZARD. **DEFICIT FONCTIONNEL PEROXYSOMAL, STRESS OXYDANT ET INFLAMMATION,** *IFCC/ESCCA Beckman Coulter Flow Cytometry Course, April 11-13, 2013, St Etienne, France.*

5. Thomas NURY, Margaux DORIA**, Amira ZARROUK,** Hervé BEGUE, Anne VEJUX, Mohammad SAMADI, Régis DELAGE-MOURROUX, Gérard LIZARD. **INDUCTION OF A DUAL MODE OF CELL DEATH (AUTOPHAGY AND APOPTOSIS) ON 7-KETOCHOLESTEROL - TREATED 158N MURINE OLIGODENDROCYTES**. *3rd ENOR symposium Oxysterols: Markers and Pathways, September 19-20, 2013 - Swansea, UK.*

✓ ***Congrès Nationaux***

1. Mohamed BOUMHRAS, **Amira ZARROUK**, Thomas NURY, Gérard LIZARD **CYTOMETRIE EN FLUX, BIOLOGIE CELLULAIRE ET TOXICOLOGIE.** *IVth National journey of flux cytometry (JNCF-2012) and IInd Mediterranean congress of cytometry, Monastir, february 23-25 (2012), Tunisia.*

2. **Amira ZARROUK**, Gérard LIZARD**. ACTIVATION DU STRESS OXYDANT ET DE LA DESORGANISATION DU CYTOSQUELETTE DE NEURONES HUMAINS PAR DES ACIDES GRAS A TRES LONGUE CHAINE (C22:0, C24:0 ET C26:0).** *Congrès des CMRR du Grand-Est & VIème rencontre des Consultations Mémoire de Bourgogne, Dijon, Palais des Congrès, 16-17 mars 2012*

3. **Amira ZARROUK** , Thomas NURY , Anne ATHIAS , Anne VEJUX , Hammam EL HAJJ , Madouda HADDAD , Mustapha CHERKAOUI-MALKI, Gérard LIZARD. **MITOCHONDRIAL DYSFUNCTIONS AND ENHANCEMENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION IN HUMAN NEURONAL CELLS (SK-NB-E) TREATED WITH VERY LONG CHAIN FATTY ACIDS (C22:0; C24:0, AND C26:0).** *11ème Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés, Toulouse, 22-24 mai, 2012.*

4. **Amira ZARROUK**, Samia HJ AHMED, Wafa CHAABANE, Gérard LIZARD, Mohamed HAMMAMI. **FATTY ACID ANALYSIS OF BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH DEMENTIA AND COGNITIVE IMPAIRMENT.** *1st journey of Vascular Neurology of Monastir, Tunisie, juin 9, 2012.*

5. **Amira ZARROUK**, Mohamed HAMMAMI, Gérard LIZARD. **INDUCTION D'ALTERATIONS CELLULAIRES OBSERVEES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER SUR DES CELLULES NEURONALES HUMAINES (SK-NB-E) TRAITEES PAR DES ACIDES GRAS A TRES LONGUE CHAINE: ALTERATION DE L'ACTIVITE MITOCHONDRIALE, INDUCTION DE STRESS OXYDANT ET DESORGANISATION DU CYTOSQUELETTE.** *XVIIIe Forum des Jeunes Chercheurs, 6 et 7 septembre 2012 – Besançon, France.*

6. **Amira ZARROUK**, Thomas NURY, Mounira KHELIFI, Mohamed BOUMHRAS, Gérard LIZARD. **ANALYSES MUTIPARAMETRIQUES PAR CYTOMETRIE ET INTRODUCTION A LA CYTOMIQUE : APPLICATION EN TOXICOLOGIE, BIOSURVEILLANCE ET PHARMACOLOGIE.** *Vth National journey of flow cytometry (JNCF-2013) and IIIr^{d} Mediterranean congress of cytometry, Monastir, march 7-9 (2013), Tunisia*

7. **Amira ZARROUK**, Gérard LIZARD. **METABOLISME PEROXYSOMAL : MICROSCOPIE ET CYTOMETRIE EN FLUX.** *14ème Journées stéphanoises de cytométrie et imagerie cellulaire et tissulaire (CYTIMA 2013), Mars 20-21, St Etienne, France.*

8. **Amira ZARROUK**, Thomas NURY, Anne ATHIAS, Mohamed HAMMAMI, Gérard LIZARD**. ATTENUATION OF C22:0-, AND VERY LONG CHAIN FATTY ACIDS (C24:0, AND C26:0) - INDUCED SIDE EFFECTS (MITOCHONDRIAL DYSFUNCTIONS, OXIDATIVE STRESS) BY DOCOSAHEXAHENOIC ACID (DHA; C22:6 N-3) ON HUMAN NEURONAL CELLS SK-N-BE.** *Journée Inter-Régionale Scientifique NEUROSCIENCES, 29 octobre 2013, Dijon.*

Liste des Figures

Figure 1 : Croquis original réalisé par Aloïs Alzheimer.

Figure 2 : Région de l'hippocampe chez un malade atteint de maladie d'Alzheimer.

Figure 3: Comparaison de sections de cerveau de sujet sain et de sujet atteint par la MA.

Figure 4 : Structure de l'APP.

Figure 5: Clivage enzymatique de l'APP.

Figure 6 : Classification de Braak & Braak.

Figure 7: Voies de biosynthèse des AGPI n-3 et des AGPI n-6.

Figure 8 : Mort cellulaire menant à la nécrose ou à l'apoptose.

Figure 9: Différents types d'autophagie.

Figure 10: Les phases de la voie d'autophagie.

Figure 11 : Interface entre apoptose et nécroptose.

Figure 12 : Relation entre les différents types de mort cellulaire lors de l'activation de la mort cellulaire par les récepteurs de mort.

Figure 13 : Rôles du peroxysome.

Figure 14 : Réaction de réduction du MTT en bleu de formazan, catalysée par la succinate-déshydrogénase en présence du coenzyme (FAD).

Figure 15: Principe du dosage de l'activité LDH.

Figure 16 : Représentation du cycle cellulaire (A) et analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle selon le modèle de Dean & Jett (B).

Figure 17: Schéma représentant la phase Sub-G1 par rapport aux autres phases du cycle cellulaire).

Figure 18 : Schéma d'oxydation de H_2DCFDA en DCF

Figure 19 : Schéma d'oxydation de DHE en HE

Figure 20: Oxydation du MitoSOX ^{TM} Red par les anions superoxydes.

Figure 21: Principe de dosage de l'activité SOD.

Figure 22 *:* Principe de dosage de cytokines par analyse multiplexe CBA.

Figure 23: Numération des cellules SK-N-BE en présence de C22:0, C24:0 et C26:0.

Figure 24: Analyse de la confluence cellulaire par coloration au Crystal violet.

Figure 25 : Observation des cellules par microscopie en contraste de phase.

Figure 26: Quantification des changements morphologiques par le calcul de l'indice de forme.

Figure 27 : Evaluation par microscopie électronique à transmission des caractéristiques ultrastructurales des mitochondries dans les cellules humaines neuronales (SK-N-BE) traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0.

Figure 28: Evaluation par microscopie électronique à transmission de microtubules, de peroxysomes et de vacuoles.

Figure 29: Évaluation des effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial avec le Test MTT.

Figure 30: Évaluation des effets des AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) sur le potentiel transmembranaire mitochondrial.

Figure 31: Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la topographie mitochondriale.

Figure 32: Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la masse mitochondriale.

Figure 33: Evaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux d'ATP mitochondrial.

Figure 34: Analyse des effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'expression de sous-unités des complexes de la mitochondrie.

Figure 35: Evaluation de l'intégrité lysosomale des cellules SK-N-BE par coloration à l'acridine orange.

Figure 36 : Analyse par microscopie à fluorescence de l'expression et de la topographie de la protéine ABCD3 sur les cellules SK-N-BE.

Figure 37: Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la protéine peroxysomale ABCD3 dans les cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0.

Figure 38 : Analyse par microscopie à fluorescence de l'expression et de la topographie de la protéine ACOX-1 dans les cellules SK-N-BE.

Figure 39 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la protéine peroxysomale ACOX-1 dans les cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0.

Figure 40: Analyse par microscopie confocale à fluorescence de l'expression et de la topographie de la catalase dans les cellules SK-N-BE.

Figure 41: Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la catalase sur les cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0.

Figure 42 *:* Analyse de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'activité catalase.

Figure 43: Evaluation de l'effet de C22 :0, C24 :0 et C26 :0 sur la composition des cellules en plasmalogènes.

Figure 44: Evaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la composition des cellules en plasmalogènes.

Figure 45: Evaluation du profil en acides gras (C22:6, C24:6, C20:5) et (C22:0, C24:0 et C26:0) dans les cellules SK-N-BE.

Figure 46*:* Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'organisation des filaments d'actine.

Figure 47 : Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la quantité d'actine F par cellule.

Figure 48: Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'organisation des microtubules.

Figure 49 : Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la quantité de microtubules par cellule.

Figure 50 : Analyse par microscopie à fluorescence de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'organisation des neurofilaments dans les cellules SK-N-BE.

Figure 51: Analyse des effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'expression de l'α-tubuline et de la β-actine.

Figure 52 : Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique.

Figure 53 : Effet des AGTLCs sur l'activité LDH dans le milieu de culture.

Figure 54: Caractérisation de la mort cellulaire induite par les AGTLCs par coloration nucléaire au Hoechst 33342.

Figure 55: Mesure de la production des ERO par H_2DCFDA.

Figure 56 : Mesure de la production de NO.

Figure 57 : Mesure de la production du peroxyde d'hydrogène.

Figure 58 : Mesure de la production d'anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux.

Figure 59: Mesure du taux de 4-HNE dans des cellules SK-N-BE traitées par les AGTLCs .

Figure 60: Mesure des taux de LTB-4 et de 15(s)-HETE dans des cellules SK-N-BE traitées par les AGTLCs.

Figure 61 : Quantification de la protéine Tau totale et phosphorylée dans des cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0.
Figure 62 : Mesure du taux d'$A\beta_{1-42}$ dans des cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 et C26:0.
Figure 63 : Mesure du taux du 24OHC dans les cellules SK-N-BE.
Figure 64 : Évaluation des effets d'$A\beta_{1-40}$ sur la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial (test MTT, dosage de l'ATP) et sur la mortalité cellulaire (activité LDH).
Figure 65 : Evaluation de l'effet du DHA l'activité mitochondriale et/ou la prolifération des cellules traitées par les AGTLCs.
Figure 66: Evaluation de l'effet du DHA sur la production des ERO dans des cellules traitées par les AGTLCs.
Figure 67: Coloration hématoxyline-éosine-safran (HES).
Figure 68 : Détection De l'amyloïde β (Aβ) par révélation à l'immunoperoxydase
Figure 69 : Détection de la protéine tau hyperphosphorylée par révélation à l'immunoperoxydase.
Figure 70-1 : Détection des plaques séniles par coloration à la Thioflavine T.
Figure 70-2 : Détection des plaques séniles par coloration au Rouge Congo.
Figure 71 : Expression de la protéine peroxysomale : ABCD1.
Figure 72: Expression de la protéine peroxysomale : ABCD2.
Figure 73 : Expression de la protéine peroxysomale : ABCD3, ACOX1 et catalase.
Figure 74 : Expression de la protéine mitochondriale : cytochrome c.
Figure 75 : Expression de la protéine lysosomale : LAMP-1.
Figure 76 : Expression de la protéine du cytosquelette : neurofilaments, α-tubuline et Actine-F.
Figure 77 : Détection des lipides neutres et phospholipides par coloration respective au Bodipy et Lipid Tox Red.
Figure 78: Répartition des démences selon l'âge (exprimé en années) de début de la symptomatologie.
Figure 79: Répartition des démences selon le niveau d'instruction.
Figure 80 : Répartition de la population des déments selon la sévérité de la démence et le niveau d'éducation.

Figure 81: Evaluation de l'activité catalase érythrocytaires en fonction de la sévérité et du type de démence **A)** : répartition selon le score MMSE **B)** : répartition selon le type de démence et le score MMSE.

Figure 82: Répartition de l'activité GPx en fonction de la sévérité (score MMSE) et du type de démence : **A)** Activité GPx érythrocytaire **B)** Activité GPx plasmatique.

Figure 83: Répartition du taux de MDA en fonction de la sévérité (score MMSE) et du type de démence et du type de la démence. **A)** Taux du MDA érythrocytaire; **B)** Taux du MDA plasmatique.

Figure 84: Répartition du taux de GSH en fonction de la sévérité (score MMSE) et du type de démence et du type de la démence. **A)** Taux de GSH érythrocytaire; **B)** Taux de GSH plasmatique.

Figure 85: Répartition du taux des diènes conjuguées erythrocytaire en fonction de la sévérité (score MMSE) et du type de démence et du type de la démence.

Figure 86: Corrélation entre les concentrations de C26:0 érythrocytaire et celles de C26:0 plasmatique.

Figure 87: Effets des AGs sur l'amyloïdogenèse et de l'amyloïdogenèse sur le métabolisme des AGs

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents anticorps et leurs conditions d'utilisations.

Tableau 2 : Dosage de l'activité enzymatique de la GPx

Tableau 3 : Evaluation de l'effet des AGTLCs sur l'induction de l'apoptose.

Tableau 4 : Mesure du GSH intracellulaire par coloration au MCB.

Tableau 5 : Effet des AGTLCs sur les taux d'oxystérols pour appréhender la peroxydation lipidique.

Tableau 6 : Évaluation des effets de l'$A\beta_{1-40}$ sur le profil d'acides gras et sur la production d'oxystérols.

Tableau 7 : Profil d'acides gras et de plasmalogène-C16 :0 dans le cerveau, le plasma et les érythrocytes de souris sauvages et transgéniques (APP PS1 ΔE9)

Tableau 8 : Répartition des démences selon l'âge et le sexe

Tableau 9 : Répartition des patients déments selon le sexe et les antécédents médicaux

Tableau 10 : Répartition de la population des déments étudiés selon le score MMSE

Tableau 11 : Habitudes de vie chez les patients déments et les contrôles

Tableau 12 : Taux moyens de lipides sanguins chez les malades déments des deux sexes et en fonctions

Tableau 13 : Valeurs moyennes des taux des apolipoprotéines plasmatiques

Tableau 14 : Indices d'athérogénicité dans les différents sous groupes de déments comparativement au groupe contrôle

Tableau 15 : Paramètres biochimiques chez les différents groupes de déments et les contrôles

Tableau 16 : Activité catalytique des enzymes antioxydantes érythrocytaires SOD, GPx, et CAT chez les patients déments et chez les contrôles

Tableau 17 : Activité catalytique des enzymes antioxydantes érythrocytaires SOD, GPx, et CAT chez les patients déments et les contrôles

Tableau 18 : Taux du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire et plasmatique chez les patients déments et les contrôles

Tableau 19 : Taux des marqueurs de peroxydation lipidique et de protéines carbonylées érythrocytaires dans les différents sous-groupes de déments et dans les contrôles

Tableau 20 : Taux des marqueurs de peroxydation lipidique et des protéines carbonylées plasmatiques chez les différents sous-groupes

Tableau 21 : Valeurs moyennes des taux érythrocytaires des AGTLCs chez les patients déments et les contrôles

Tableau 22 : Valeurs moyennes des taux érythrocytaires des AGTLCs et du DHA dans les différents sous-groupes de patients déments et chez les contrôles

Tableau 23 : Valeurs moyennes des taux plasmatiques des AGTLCs et du DHA dans les patients déments et les contrôles

Tableau 24 : Valeurs moyennes des taux plasmatiques des AGTLCs et du DHA dans les différents sous-groupes de patients déments et les contrôles

Tableau 25 : Valeurs moyennes des taux plasmatiques des AGTLCs et du DHA dans les différents sous-groupes de patients déments et chez les contrôles.

Tableau 26 : Valeurs moyennes des taux plasmatiques et érythrocytaires de l'acide phytanique et du plasmalogène-C16:0 dans les différents sous-groupes de patients déments et chez les contrôles.

Tableau 27 *:* Profil érythrocytaire des acides gras trans dans les différents sous-groupes de patients déments et chez les contrôles.

Tableau 28 : Profil érythrocytaire des acides gras dans les différents sous-groupes de patients déments et chez les contrôles.

Tableau 29 *:* Profil plasmatique des acides gras dans les différents sous-groupes de patients déments et chez les contrôles.

Tableau 30 : Profil plasmatique des acides gras trans dans les différents sous-groupes de patients déments et chez les contrôles.

Tableau 31 : Valeurs moyennes de la concentration plasmatique du TNF-α , de l'IL1-β, de la Crp_{us} et du C20 :4 érythrocytaire chez les patients Alzheimer et chez les contrôles.

Liste des abréviations

- 24OHC : 24S-hydroxycholesterol
- 4-HNE : 4-hydroxy-2-nonénal
- AA : Acide Arachidonique
- ADRDA : Alzheimer's Disease and Related disorders Association
- AG : Acide Gras
- AGI : Acide Gras Insaturés
- AGM : Acides Gras Mono-insaturés
- AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés
- AGS : Acide Gras Saturés
- AGT : Acide Gras Trans
- AGTLC : Acides gras à très longue chaîne
- AICD : Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain
- AIF : Apoptosis Inducing Factor
- ALA : Acide Alpha Linoléique
- AO : Acridine Orange
- Apo : Apoliprotéine
- APP : Amyloïd Precurcor Protein
- ATg : Autophagy related genes
- ATP : Adénosine tri-phosphate :
- BCA : Acide Bicinchoninique
- BHE : Barrière Hémato Encéphalique
- BSTFA : Bis(triméthylsily)trifluoroacetamide
- CaMKII : Ca2+/calmodulin dependent protein kinase II
- CAT : Carnitine Acétyl Transférase
- CBA : Cytometric bead array
- CLA : Conjugated Linoleic Acid
- COT : Carnitine Octanoyl Transférase
- COX : Cyclooxygénases
- CRP : Protéine C Réactive
- CTF : Cytoplasmic Tail Fragment
- CTF83 : Cytoplasmic Terminal Fragment 83
- CTF99 : Cytoplasmic Terminal Fragment 99
- CYP46 : 24S-hydroxylase
- DAF-FM : 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein
- DCF : 2',7'-dichlorofluorescein
- DCFH : 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine
- DCL : Démence à corps de Lewy
- DFT : Démence frontotemporale
- DHA : Acide Docosahexaénoïque
- DHAP : Dihydroxyacétone Phosphate
- DHR : Dihydrorhodamine

- DISC : Death Inducing Signaling Complex
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DNF : Dégénérescences neurofibrillaires
- DO : Densité Optique
- DV : Démences vasculaires
- EPA : Acide eicosapentaénoïque
- ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
- F2-IsoPs : F2-iso- prostanes
- F4- NPs : F4-neuroprostanes
- FADD : Fas Associated Death Domain
- FITC : Isothiocyanate de fluoresceine
- GDS : geriatric depression scale
- GFP : Green fluorescent protein
- GLDH : Uréase/glutamate déshydrogénase
- GPx : Glutathion peroxydase
- GSH : Glutathion réduit
- H_2DCFDA : 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate
- H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
- $HO^{\cdot}$: Radical hydroxyl
- HRP : Peroxydase de Raifort
- HTA : Hypertension artérielle
- IL : Interleukine
- iNOS : inducible Nitrous Oxide Synthase
- IP : Iodure de Propidium
- IRM : Résonnance Magnétique nucléaire cérébrale
- LA : Acide Linoléique
- LCR : Liquide céphalo-rachidien
- LDH : Lactate Déshydrogénase
- LOX :Lipooxygénase
- MA : Maladie d'Alzheimer
- MAP : Mitogen activated protein
- MARK : Microtubule Affinity Regulating Kinase
- MCB : Monochlorobimane
- MCI : Mild cognitive impairment
- MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
- MDA : Malondialdéhyde
- MET : Microscopie électronique en transmission
- MHCII : Complexe Majeur Histocompatibilité type II
- MIP-1α : Macrophage Inflammatory Protein-1α
- MMS : Minimal mental score
- N_2O_3 : Trioxyde d'azote
- NBT : Nitrobleu de tétrazolium
- NCCD : Nomenclature Commitee on Cell Death
- Nec : Nécrostatine

- NINCDS : National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
- NLR : NOD-like receptors
- NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique
- $NO^{\cdot}$: Monoxyde d'azote
- $O_2^{-\cdot}$: Superoxydes
- ONOOH : Nitroperoxyde
- PBS : Phosphate Buffered Saline
- PEX : Peroxin
- PHFs : Paired helical filaments
- PKA : Cyclic-AMP-dependent kinase
- PRR : Pathogen recognition receptor
- PS : Phosphatidylsérine
- PTS : Peroxisomal targeting signal
- PVDF : Polyvinylidéne difluoride
- RE : Réticulum Endoplasmique
- RIP : Receptor Interaction Protein
- RLR : Retinoic acid-inducible gene I- like receptors
- $ROO^{\cdot}$: Radicaux peroxyls
- SAPK/JNK : Stress Activated Protein Kinases
- SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium
- SNC : Système nerveux central
- SOD : Superoxydes dismutases
- SVF : Sérum de Veau Fœtal
- TBA : Acide thiobarbiturique
- tBid : Bid tronqué
- TCA : Acide tricholoacétique
- TEMP : Tomographie par émission monophotonique
- TEP : Tomographie par émission de positons
- TG : Triglycérides
- TLR : Toll-like receptors
- TM : Melting Température
- TMCS : Triméthylchlorsilane
- TNF-α : Tumor Necrosis Factor- α
- WT : Wild Type
- X-ALD : X-linked adrenoleukodystrophy
- XO : Xanthine oxydase
- $\Delta\psi m$: Potentiel Mitochondrial Transmembranaire
- IMF : Intensité Moyenne de Fluorescence
- DHR123 : Dihydrorhodamine 123
- LTB-4 : Leucotriène B4
- HES : Hématoxyline/éosine/safran
- CPG : Chromatographie phase Gazeuse
- SM : Spectrométrie de Masse

- AVC : Accident Vasculaire Cérébral
- LTs : Leucotriènes
- Tetrazolium WST-1 : 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-*2H*-tetrazolium, monosodium salt
- 3,5 DCHBS : 3,5-dichloro-2-hydroxybenzènesulphonique.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La maladie d'Alzheimer 5
1. Historique 7
2. Fréquence de la maladie d'Alzheimer et incidence en santé publique 8
3. Manifestations cliniques de la maladie d'Alzheimer 8
4. Histopathologie de la maladie d'Alzheimer 9
4.1. Les plaques séniles 10
4.1.1 APP (Amyloïd Precurcor Protein) 11
4.1.2 Clivage de l'APP 11
4.2. La Dégénérescence neurofibrillaire 13
4.2.1 Protéine Tau 13
4.2.2 Modifications post-traductionnelle de la protéine Tau 13
5. Evolution de la MA et localisation des lésions cérébrales 14
6. Méthodes biologiques et cliniques de caractérisation de la maladie d'Alzheimer 18
6.1 Diagnostic clinique 18
6.1.1 Examen clinique 18
6.1.2 L'imagerie 19
6.2 Les bio-marqueurs utilisés pour le diagnostic 19
6.3 Facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer 20
6.3.1. Les facteurs génétiques 20
6.3.2. Les facteurs environnementaux 20
7. Inflammation et Alzheimer 21
8. Modèles d'études de la maladie d'Alzheimer 23
8.1 Modèles in vitro 23
8.2 Modèles in vivo 23
9. Prévention et Traitement de la Maladie d'Alzheimer 29
9.1 Nutrition et maladie d'Alzheimer 29
9.2 Lieu de vie, mode de vie, stimulation cognitive et Maladie d'Alzheimer 30
9.3 Traitements pharmacologiques 31
II. Dysfonctionnement métabolique cellulaire, neurodégènerescence et maladie d'Alzheimer 33
1. Métabolisme lipidique, neurodégènerescence et maladie d'Alzheimer 33

1.1 Cholestérol et neurodégènerescence 33
1.2. Acides gras et neurodégénéréscence 36
1.2.1 Acides gras, structure et métabolisme 36
1.2.2. Les AGPI, molécules essentielles du système nerveux central 40
1.2.3 Acides gras polyinsaturés et modulation de la fluidité membranaire 42
2. Stress oxydatif et Alzheimer 43
2.1 Stress oxydatif : rappel 43
2.1.1 Génération du stress oxydatif et systèmes de défense 43
2.1.2 Dommages cellulaires induits par le stress oxydatif 46
2.2 Implication du stress oxydatif dans la physiopathologie de maladie d'Alzheimer 46
3. Implication des mitochondries 48
3.1 Structure et fonctionnement des mitochondries 48
3.2 Les altérations mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer 49
4. Rôle potentiel du Peroxysome dans le vieillissement et la MA 50
4.1 Peroxysome: 50
4.2 Fonctions péroxysomales en relation avec le métabolisme des AGTLCs 51
4.3 Rôles du peroxysome dans le contrôle de l'équilibre RedOx et l'inflammation 54
4.4 Incidence du cytosquelette sur l'activité peroxysomale 55
4.4.1 Le cytosquelette : rappels 55
4.4.2 Relations cytosquelette et peroxysome 57
4.5 Rôles du peroxysome dans la sénescence et la mort cellulaire 58
4.6 Peroxysome et vieillissement 60
4.7 Peroxysome et maladie d'Alzheimer 61
III. Mort cellulaire et maladie d'Alzheimer 62
1. Les différents types de mort cellulaires : généralités 62
1.1. Apoptose (ou mort cellulaire de type I) 63
1.2. L'autophagie (ou mort cellulaire de type II) 66
1.3 La nécrose (ou mort cellulaire de type III) 68
1.4 La nécroptose 69
1.5 Autres types de mort cellulaire 71
1.6 Relation entre les différents types de mort 71
2. Types de mort cellulaires associés à la maladie d'Alzheimer 72

OBJECTIFS ET MODELES D'ETUDES

MATERIEL ET METHODES

I Etude in Vitro 81

1 Matériel biologique (lignée cellulaire) et anticorps utilisés 81

2. Culture et traitement des cellules 82

3. Mesure de la viabilité et de la prolifération des cellules SK-N-BE 84

3.1 Numération cellulaire en présence de bleu trypan 84

3.2 Evaluation de la confluence par coloration au Crystal Violet 84

3.3 Méthode d'évaluation de l'activité mitochondriale et de la densité cellulaire par le test MTT 85

3.4 Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par coloration au 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3)) 86

3.5. Evaluation de la mortalité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium 87

3.6. Dosage de l'activité lactate déshydrogénase 87

3.7. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux 88

3.8. Détection des cellules en phase Sub-G1 89

4. Caractérisation morphologique de la mort cellulaire induite par les AGTLCs 90

4.1 Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie en contraste de phase 90

4.2 Analyse de la morphologie des noyaux par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342 90

4.3 Etude l'ultrastructure cellulaire par microscopie à transmission électronique 91

5. Analyse de l'effet des AGTLCs sur les organites cellulaires : mitochondrie, lysosome et peroxysome 92

5.1 Analyse des effets des AGTLCs sur la mitochondrie 92

5.1.1 Détermination de la masse et de la distribution des mitochondries par coloration au MitoTraker Red 92

5.1.2 Dosage de l'ATP 92

5.2 Analyse des effets des AGTLCs sur le lysosome : Evaluation du pourcentage de cellules avec des lysosomes déstabilisés par coloration à l'acridine orange 93

5.3 Analyse des effets des AGTLCs sur le peroxysome 94

5.3.1 Étude de la topographie et de l'expression du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3/PMP70 par immunofluorescence indirecte 94

5.3.2 Étude de la topographie et de l'expression de la catalase par immunofluorescence indirecte 95

6. Dosage des marqueurs du stress oxydatif 96

6.1 Evaluation de la surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène et de l'azote par coloration avec H_2DCFDA 96

6.2 Evaluation de la production des anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux et par cytométrie en flux 97

6.3 Evaluation de la production de monoxyde d'azote par le 4,5-Diaminofluorescein diacétate 98

6.4 Evaluation de la production de peroxyde d'hydrogène par coloration à la Dihydrorhodamine 123 99

6.5 Quantification du GSH par coloration au monochlorobimane 99

6.6 Mesure de l'activité superoxyde dismutase et catalase 100

6.6.1 Extraction et dosage des protéines 100

6.6.2 Mesure de l'activité catalase 100

6.6.3 Mesure de l'activité de la SOD 101

6.7 Détection et quantification du 4-hydroxy-2-nonénal par immunofluorescence indirecte et analyse par cytométrie en flux 102

6.8 Détection et quantification des dérivés oxydés du cholestérol par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) 102

6.8.1 Hydrolyse des esters 102

6.8.2 Extraction des oxystérols 103

6.8.3 Dérivation 103

6.8.4 Analyse par CPG/ SM 103

7. Analyse des effets des AGTLCs sur le cytosquelette 104

7.1 Coloration des filaments d'actine par la Rhodamine-phalloïdine 104

7.2 Immunomarquage des neurofilaments 104

7.3 Coloration de la tubuline par coloration au Tubulin Tracker Green. 104

8. Analyse des effets des AGTLCs sur les protéines utilisées comme biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer 105

8.1 Dosage par ELISA de la protéine amyloïde Aβ (1-42) 105

9. Quantification de l'expression protéique par Western blot 105

9.1 Préparation des extraits cellulaires : 105

9.2 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) 106

9.3 Transfert des protéines 107

10. Analyse par RT-qPCR 108

10.1 Extraction d'ARN 108

10.2 Dosage d'ARN 108

10.3 RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction 109

10.4 qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction 109

10.5 Analyse des résultats de qPCR 111

11. Evaluation et quantification des acides gras et des plasmalogènes par CPG/MS. 111

11.1 Extraction des lipides totaux 111

11.2 Purification des phospholipides 111

11.3 Dérivation des acides gras des phospholipides pour l'analyse en CPG /SM 112

11.4 Analyse par CPG/ SM 112
II Etude clinique 112
1 Population d'étude 112
1.1 Recrutement 114
1.1.1 Malades 114
1.1.2 Contrôle 114
2 Prélèvements et préparation des échantillons 114
3 Diagnostic Biologique 115
3.1 Bilan glycémique 115
3.2 Bilan rénal 115
3.2.1 Dosage de l'urée 115
3.2.2 Dosage de la créatinine 116
3.2.3 Dosage de l'acide urique 116
3.3 Bilan lipidique 116
3.3.1 Dosage du Cholestérol total (CT) 116
3.3.2 Dosage des triglycérides (TG) 117
3.3.3 Dosage du HDL-cholestérol 117
3.3.4 Dosage des LDL-cholestérol 118
3.3.5 Dosage de l'Apolipoprotéine A_1 ($ApoA_1$) 118
3.3.6 Dosage de l'Apolipoprotéine B (Apo B) 118
4 Dosages de l'activité des enzymes antioxydantes plasmatique et érythrocytaire 119
4.1 Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) 119
4.2 Dosage de la Superoxyde Dismutase l'activité érythrocytaire 120
4.3 Mesure de l'activité catalase 121
5 Dosages des marqueurs de la peroxydation lipidique plasmatique et érythrocytaire 121
5.1 Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA) 121
5.2 Dosages des diènes conjugués 122
6 Dosage des protéines carbonylées plasmatique et érythrocytaire 122
7 Détermination du profil d'acides gras plasmatique et érythrocytaire par CPG 123
8 Dosage du plasmalogène et de l'acide phytanique plasmatique et érythrocytaire par CPG/SM. 124
9 Dosage de cytokines par analyse multiplex par cytométrie en flux 124
10 Dosage des protéines par la méthode de Bradford 126
III Modèle animal 126
1 Isolement des cerveaux et inclusion en paraffine 126
2 Immunomarquages sur coupes de cerveaux déparaffinées. 126
3. Colorations sur coupes de cerveaux déparaffinées. 127

4. Dosage des acides gras et de plasmalogène-C16 :0 dans le cerveau, le plasma et les érythrocytes de souris sauvage et transgénique APP PS1Δ9 128

RESULTATS

A. Etude In Vitro 129

I Effets du C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur la prolifération cellulaire, le dysfonctionnement des organites et la mort cellulaire 131

1 Effets du C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur la prolifération 131

1.1 Numération cellulaire en présence de bleu trypan 131

1.2 Evaluation de la confluence par coloration au Crystal Violet 132

1.3 Evaluation des modifications de la morphologie cellulaire 134

1.4. Evaluation des modifications de l'ultrastructure cellulaire 138

2. Effet de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur les mitochondries 141

2.1 Evaluation de l'activité mitochondriale et de la densité cellulaire 141

2.2. Effet sur le potentiel transmembranaire mitochondrial 141

2.3. Effet sur la masse et la distribution des mitochondries 144

2.4. Effet sur le taux d'ATP 147

2.5. Effet sur l'expression de sous-unités des complexes mitochondriaux 148

3 Evaluation des effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur le lysosome 150

3.1. Effets sur l'intégrité des lysosomes 150

3.2. Effet de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur l'autophagie 151

4. Evaluation des effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur le peroxysome 152

4.1 Incidence sur l'expression du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3/PMP70 152

4.2 Incidence sur l'expression d'ACOX-1 154

4.3 Incidence sur l'expression de la catalase 155

4.4 Evaluation sur l'activité catalase 158

4.5 Évaluation des effets de C22 :0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur le métabolisme lipidique peroxysomale 159

4.5.1 Effet sur la synthèse de plasmalogènes 159

4.5.2. Effet sur le profil d'acide gras, la synthèse du DHA et de ses précurseurs 162

5. Evaluation des effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur l'organisation du cytosquelette 164

5.1. Effets sur l'organisation des filaments d'actine 164

5.2. Éffets sur l'organisation des microtubules 166

5.3 Effet sur les neurofilaments 169

5.4. Analyse de l'expression protéique de l'actine et de l'α-tubuline 169

6. Caractérisation de la mort cellulaire induite par C22:0 et les AGTLCs (C24:0, C26:0) 172

6.1 Evaluation de l'intégrité de membrane cytoplasmique par coloration à l'iodure de propidium 172

6.2 Effet sur l'activité lactate déshydrogénase 173

6.3 Effet sur la fragmentation nucléaire 174

6.4. Effet sur l'induction de cellules en Sub-G1 174

II Evaluation des effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur le stress oxydatif et l'inflammation 176

1 Effet sur le stress oxydatif 176

1.1 Evaluation de la surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène 176

1.2. Evaluation de la production de monoxyde d'azote 178

1.3. Evaluation de la production du peroxyde d'hydrogène 179

1.4. Evaluation de la production d'anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux 179

1.5. Effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux de GSH intracellulaire 181

1.6. Effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la production de marqueurs de la peroxydation lipidique 182

1.6.1. Effet sur la production d'oxystérols 182

1.6.2. Effet sur la production de 4-hydroxynonénal (4-HNE) 183

2. Evaluation de l'effet de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur les marqueurs de l'inflammation 184

2.1. Effet sur la production de cytokines quantifiée par analyse multiplexe par cytométrie en flux 184

2.2. Effet sur la production de LTB-4 et de 15-(S)-HETE 184

III Incidence de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur les marqueurs de la maladie d'Alzheimer 186

1. Effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux de la protéine Tau totale et phosphorylée 186

2. Effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux d'Aβ1-42 187

3. Effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux de 24S-hydroxycholestérol et l'expression de CYP46 187

4. Evaluation par RT-qPCR des effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le niveau d'expression de gène associés à la maladie d'Alzheimer : APP, α-sécrétase et β-sécrétase 188

IV Evaluation de l'implication d'Aβ1-40 dans l'accumulation de C22:0 et d'AGTLCs (C24:0, C26:0) 188

1. Effet d'$A\beta_{1-40}$ sur la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial 188

2. Effet de l'Aβ1-40 sur l'accumulation de lipides : C22 :0, AGTLCs (C24:0, C26:0), cholestérol et oxystérols 190

V. Effets du DHA sur la toxicité de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) 192

1. Effets du DHA sur la prolifération cellulaire 192

2. Effet du DHA du DHA sur le stress oxydatif 194

B Modèles animaux 196

1. Etude de marqueurs conventionnels de la MA sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques 198

3. Etude de marqueurs des mitochondries sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques 203

4. Etude de marqueurs des lysosomes sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques 209

5. Etude de marqueurs du cytosquelette sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques 209

6. Etude de la composition en acides gras et en phospholipides sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques 212

7. Profil d'acides gras et de plasmalogène-C16:0 dans le cerveau, le plasma et les érythrocytes de souris sauvages et transgéniques (APP PS1 ΔE9) 214

C. Etude clinique 216

I Caractéristiques démographiques de la population 216

1. Age et sexe 216

2. Niveau d'instruction 218

3. Délai du diagnostic et dépendance cognitive 218

4. Antécédents familiaux de démence 219

5. Antécédents médicaux 219

6. Stades de sévérité de la démence 220

7. Habitudes de vie 220

8. Evaluation des symptômes dépressifs 221

II Etude des paramètres lipidiques et lipoprotéiques chez la population étudiée 221

1. les lipides sanguins 221

2. Les apolipoprotéines plasmatiques 224

3. Indices d'athérogénicité dans la population étudiée 224

III Etude d'autres paramètres biochimiques 225

IV Evaluation des marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique et érythrocytaire dans différents types de démences 226

1. Mesure du taux de défenses antioxydantes au niveau plasmatique et érythrocytaire 226

2. Evaluation des marqueurs de la peroxydation lipidique et des protéines carbonylées au niveau plasmatique et /ou érythrocytaire 229

3. Evaluation de l'ampleur du stress oxydant selon la sévérité de la démence 230

V Evaluation du métabolisme peroxysomal au niveau plasmatique et érythrocytaire dans différents types de démences 238

1. Evaluation du taux des substrats de la β-oxydation peroxysomale au niveau érythrocytaire et plasmatique 239

2. Détermination du profil des acides gras au niveau plasmatique et erythrocytaire..... 235

VI Evaluation des marqueurs inflammatoires au niveau plasmatique chez les malades Alzheimer ... 252

DISCUSSION

I. Caractéristiques de la lipotoxicité associée aux acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 : effets sur les organites cellulaires (mitochondries, peroxysomes et lysosomes), l'activation de mort cellulaire, l'oxydation et l'inflammation 257

1. Effets des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur la mitochondrie et l'activation de la mort cellulaire 258

2. Effets des acides gras C22:0, C24:0 ou C26:0 sur le lysosome et l'activation de la mort cellulaire 262

3. Effets des acides gras C22:0, C24:0 ou C26:0 sur le peroxysome 262

4. Effet des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur la morphologie cellulaire et l'organisation du cytosquelette 266

5. Effets des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur le stress oxydant 268

6. Effet des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'inflammation 272

7. Evaluation des effets du DHA sur la lipotoxicité induite par les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 273

8. Incidence des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'amyloïdogenèse et la tauopathie 274

9. Evaluation de l'implication d'Aβ1-40 dans l'accumulation de C22:0, C24:0 et C26:0 275

10. Hypothèse intégrant l'effet des Acides gras sur l'amyloidogenèse et de l'amyloidogenèse sur le métabolisme des Acides gras 276

II Validation d'un modèle Alzheimer de souris transgénique APP PS1 ΔE9 pour l'étude du métabolisme des lipides en relation avec le métabolisme peroxysomal 279

III Etude clinique 281

1. Profil lipidique de la population de malades déments étudiés 286

1.1. Etude des relations cholestérol - démences 286

1.2. Etude des relations acides gras – démences 288

1.3. Etudes des relations stress oxydant – démences 292

1.4. Etude des relations cytokines (IL-1β, TNF-α) – démences 294

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

En raison de l'augmentation de la durée de vie et du vieillissement des populations, le nombre de personnes atteintes de maladie neurodégénératives et en particulier de démences comme la maladie d'Alzheimer (MA ; OMIM # 104300) augmente considérablement (**Ferri *et al.*, 2005 ; Qiu *et al.*, 2009**). Comme ces malades fortement dépendants représentent un coût financier important pour la société, en termes de soins et d'accompagnement, il devient urgent de mieux connaitre la physiopathologie de ces maladies afin de pouvoir identifier des cibles moléculaires et mettre au point des traitements efficaces actuellement inexistants.

Parmi les démences sévères, la MA (décrite en 1906 par le neurologue allemand Aloïs Alzheimer) est la plus connue. Les premiers symptômes se manifestent cliniquement par des pertes de souvenirs (amnésie) qui s'accentuent avec la progression de la maladie. Les souvenirs plus anciens sont cependant relativement préservés. L'atteinte neurologique s'étend par la suite aux cortex associatifs frontaux et temporo-pariétaux, se traduisant par des troubles cognitifs plus sévères (confusions, irritabilité, agressivité, troubles de l'humeur et des émotions, des fonctions exécutives et du langage) et la perte de la mémoire à long terme. Elle est caractérisée au niveau cortical par des dépôts extracellulaires d'amyloïdes β et par une neurodégénéréscence fibrillaire (enchevêtrement intracellulaire de microtubules et de protéine tau hyperphosphorylée) qui sont considérés comme des marqueurs spécifiques de la MA (**Jack *et al.*, 2010; Jack *et al.*, 2013**). Des rôles prépondérants sont attribués à l'amyloïdogénèse dans l'initiation et le développement de la MA en raison des multiples activités neurotoxiques décrites avec l'amyloïde-β (stimulation du stress oxydant, dysfonctions mitochondriales, mort cellulaire….) (**Silva *et al.*, 2012; von Bernhardi & Eugenín, 2012**).

Parmi les facteurs de risque associés à la MA, des anomalies lipidiques sont fortement suspectées.

- Le polymorphisme de l'apolipoprotéine E tel que la présence de l'allèle E4 est associé à un risque accru de développer une MA (**Seripa *et al*, 2011**).
- L'altération du métabolisme du cholestérol conduisant à une diminution de synthèse de 24S-hydroxycholestérol (considéré comme un marqueur de neurones métaboliquement actifs) via CYP46A1 semble aussi intervenir (**Leoni & Caccia, 2011**). Il a été rapporté que la diminution de 24S-hydroxycholestérol au niveau plasmatique est associée à la sévérité des démences et à l'atrophie cérébrale (**Solomon *et al*, 2009**). Cependant, des taux augmentés de 24S-hydroxycholestérol ont également été rapportés et cet

oxystérol, à fortes concentrations, peut exercer des activités neurotoxiques (**Kölsch *et al.*, 1999**) .

- Des taux augmentés de 7-cétocholestérol et de 7β-hydroxycholestérol résultant d'une auto-oxydation du cholestérol, pouvant être une conséquence du stress oxydant observé au niveau des lésions cérébrales, sont aussi suspectés (**Vaya & Shipper, 2007**).
- L'accumulation d'acide gras C22:0 et d'acide gras à très longue chaîne C24:0 et C26:0 a aussi été rapportée au niveau des lésions chez des malades au stade V et VI de la classification de Braak alors que les stades I et II sont faiblement affectés (**Kou *et al.*, 2011**). Il a été supposé que cette accumulation d'acide gras, en particulier de C24:0 et de C26:0, pourrait être la conséquence de dysfonctions peroxysomales (diminution de β-oxydation peroxysomale) (**Lizard *et al.*, 2012**).
- En relation avec les anomalies possibles du métabolisme peroxysomale suspectés dans la MA, des modifications des taux de plasmalogènes (dont les deux premières enzymes sont localisées dans le peroxysome (**Wanders & Waterham, 2006**) ont été décrites, ainsi que des diminutions de DHA dont les dernières étapes de synthèse intracellulaire font intervenir la β-oxydation peroxysomale (**Lizard *et al.*, 2012**).
- L'utilisation de souris transgéniques a aussi permis de révéler une intervention potentiel du peroxysome dans le développement de la MA (**Cimini *et al.*, 2009 ; Fanelli *et al.*, 2013**) et l'inhibition pharmacologique du peroxysome chez le rat favorise l'amyloïdogénèse (**Shi *et al.*, 2012**).

En fonction de ces différentes constatations, des dysrégulations du métabolisme lipidique, dont certaines feraient intervenir le peroxysome, pourraient contribuer au développement de la MA.

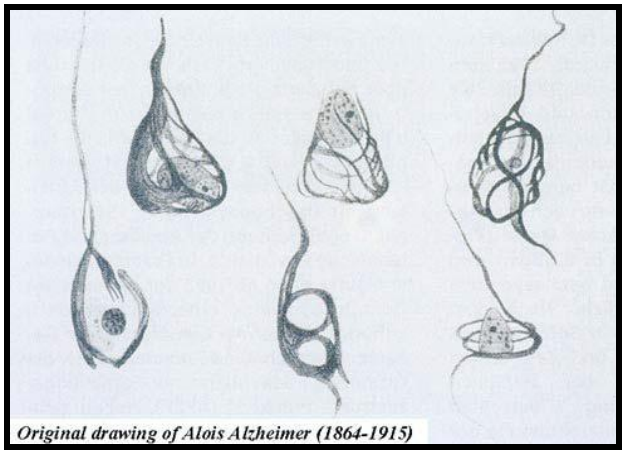
Afin de préciser la part prise par le C22:0 et les acides gras à très longue chaîne (C24:0 et C26:0) dans la neurodégénéréscence et la MA, des études ont été réalisées *in vitro* sur des cellules neuronales humaines SK-N-BE, sur un modèle de souris transgénique APP PS1 ΔE9 ainsi que sur des plasmas de sujets atteints de MA, de démences vasculaires et autres démences.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La maladie d'Alzheimer

1. Historique

Le progrès réalisés pour le traitement des maladies infantiles et pour de nombreuses pathologies souvent fatales de l'enfant et de l'adulte (maladies infectieuses, maladies cardiovasculaires, cancers) ont largement contribué à allonger la durée de vie au-delà de soixante ans. A partir de cet âge, les maladies neurodégénératives et en particulier les démences deviennent prévalentes. Pendant longtemps, l'état de démence des personnes âgées était considéré par la plupart des psychiatres à la fin du XIXe siècle comme habituel et lié à un processus de vieillissement normal. Ce sont les travaux réalisés par l'école de Munich, sous l'égide du psychiatre allemand Emil Kraepelin (1856-1926) et de ses collaborateurs, parmi lesquels figure Aloïs Alzheimer (1864-1915), qui ont permis de mieux comprendre les démences en les abordant par l'étude histologique du cerveau dans différentes maladies mentales. En 1906, lors d'une réunion de psychiatres allemands à Tübingen, Alzheimer rapporte l'observation d'une femme de 51 ans, Auguste D qui a présenté un délire de jalousie suivie d'une désintégration des fonctions intellectuelles. L'examen microscopique des coupes du cerveau de cette patiente, observées après imprégnation argentique, a révélé dans le cortex cérébral, des lésions jusque-là inconnues, caractérisées par des amas anormaux de fibrilles dans les neurones, les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (**Figure 1**).



<u>Figure 1 :</u> ***Croquis original réalisé par Aloïs Alzheimer.*** *Différents aspects microscopiques de la neurodégénérescence fibrillaire observée sur coupe histologique du cerveau de la patiente Auguste D.*

À la suite de cette observation, Kraepelin, dans son Traité de Psychiatrie qui connait 8 éditions de 1883 à 1915, évoque pour la première fois la « maladie d'Alzheimer » définie alors comme une démence dégénérative du cerveau associée à des troubles prédominants de la

mémoire, à des troubles cognitifs et / où du comportement ayant un retentissement sur la vie quotidienne des patients **(Haustgen & Sinzelle, 2010 ; Emil Kraepelin (1856-1926)).** Histologiquement, il est rapporté que cette démence est associée à deux types de lésions corticales, les plaques séniles et les DNF. Les plaques séniles peuvent se développer assez tôt au cours de la vie mais les manifestations pathologiques ne s'expriment habituellement que tardivement.

2. Fréquence de la maladie d'Alzheimer et incidence en santé publique

Parmi les maladies neurodégénératives incluant les démences fronto-temporales, la démence à corps de Lewy, les démences vasculaires et la maladie de Creutzfeldt-Jacob, la maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus répandue. Elle est responsable d'environ 70% des troubles démentiels actuellement diagnostiqués en France. Pour une population mondiale d'environ 7 milliards d'individus en 2013, on dénombre plus de 36 millions de personnes vivant avec des démences dont la grande majorité correspond à la MA. Ce nombre devrait passer à 66 millions d'ici 2030 et 115 millions jusqu'en 2050 **(Ferri *et al.*, 2005 ; Martin *et al.*, 2011)**. En Tunisie, la MA concerne environ 25 000 personnes et 3 000 nouveaux cas sont recensés chaque année **(Hajem, 2005)**, En France, le nombre de sujets atteints est estimé à environ 500 000 personnes. La fréquence de la MA augmente avec l'âge : elle est de 0,6 % entre 65 à 69 ans et atteint 40 % au delà de 90 ans **(Dartigues *et al.*, 2002).**

3. Manifestations cliniques de la maladie d'Alzheimer

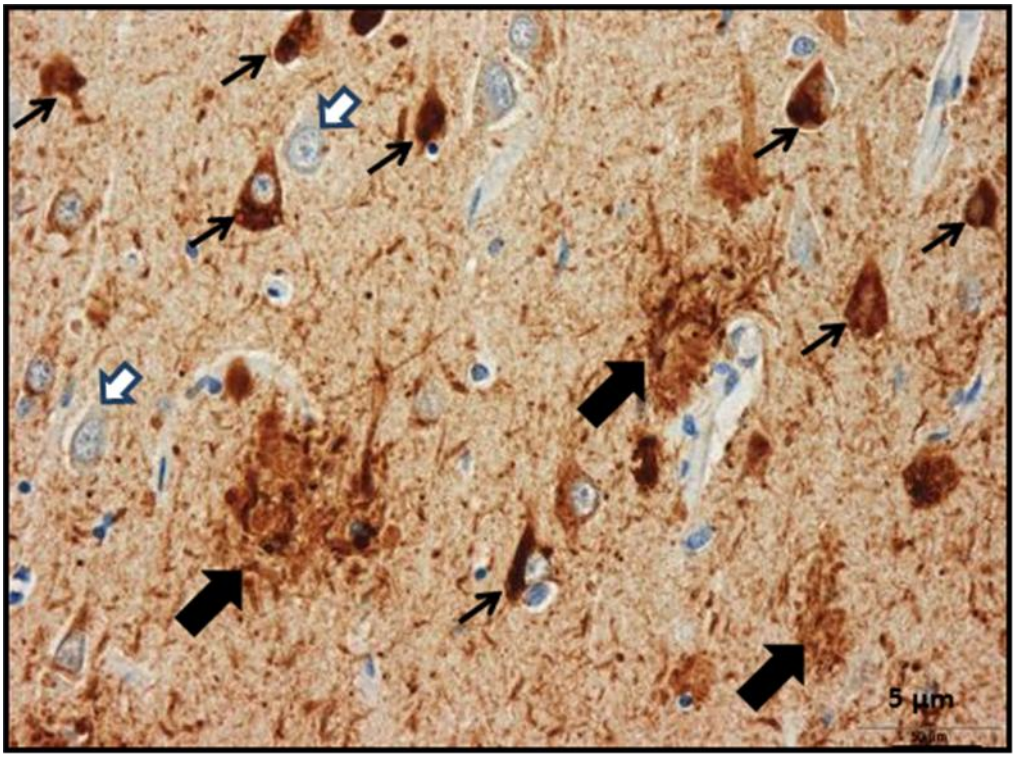
L'évolution de la maladie peut se décomposer schématiquement en trois phases principales successives;

- Une phase silencieuse asymptomatique qui peut s'étendre sur plusieurs années ;
- Une phase symptomatique légère à modérée durant en moyenne 3 à 4 ans, caractérisée par l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie. Celle-ci se caractérise par des troubles de la mémoire épisodique liés à une incapacité à retenir des informations récentes. Les faits anciens restent en mémoire jusqu'à un stade avancé de la maladie.
- Une phase terminale ou phase de l'installation proprement dite de la maladie, caractérisée par la présence des troubles cognitifs profonds : la mémoire ancienne commence d'être atteinte, la désorientation temporo-spatiale s'accentue, le malade présente des troubles du comportement, de l'agitation,

une inversion du rythme veille-sommeil, des troubles psychiques (délire, hallucinations, dépression, modification de l'humeur sans raison apparente). Par la suite, apparaissent une altération du langage (aphasie), des troubles des gestes (apraxie) et des difficultés à utiliser des objets plus ou moins complexes de la vie quotidienne (appareils électroménagers, téléphone…). Tous ces troubles conduisent à une perte d'autonomie et à une dépendance vis-à-vis de l'entourage familial. Le patient finit par ne plus reconnaître ses proches et ses facultés intellectuelles s'amenuisent **(Benoit *et al,* 2003 ; Jack *et al.*, 2010 ; Jack *et al*., 2013).**

4. Histopathologie de la maladie d'Alzheimer

La MA est associée à des lésions histopathologiques qui la définissent : les plaques séniles (aussi appelées plaques amyloïdes) et les DNF (**Figure 2**).



<u>Figure 2 :</u> ***Région de l'hippocampe chez un malade atteint de maladie d'Alzheimer.*** *(Washington University School of Medicine). Les formes triangulaires sont des enchevêtrements neurofibrillaires (neurofibrillary tangles) indiqués par des flèches noires. Les dépôts amyloïdes sont indiqués par des flèches noires épaisses. Les flèches blanches indiquent les très rares neurones normaux.*

Ces lésions sont principalement accumulées dans le cortex (partie superficielle du cerveau) et dans l'hippocampe (**Thompson & Vinters, 2012).** A ces lésions s'ajoute l'atrophie corticale **(Figure 3).**

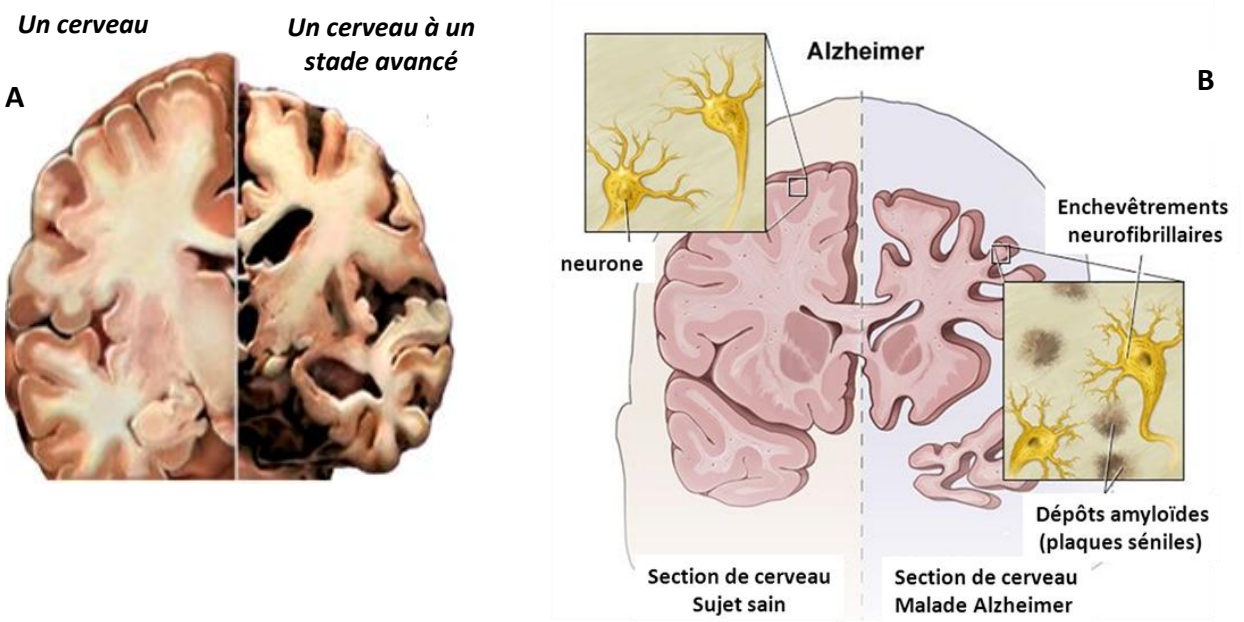


Figure 3: ***Comparaison de sections de cerveau de sujet sain et de sujet atteint par la MA***.
A *; coupe transversale de cerveau de sujet sain et de sujet présentant une atrophie corticale ;*
B *: Modifications histologiques associées à l'atrophie corticale.*

4.1. Les plaques séniles

Ce sont des dépôts sphériques de 50-200 µm de diamètre et de densité variable **(Selkoe, 2001)**. Le cœur des plaques séniles est constitué d'un dépôt de peptide Aβ. La majorité de ces peptides trouvés au cœur de la plaque sénile, sont constitués de 42 acides aminés ($A\beta_{1-42}$) et représente la forme la plus hydrophobe qui a tendance à l'agrégation (70 fois plus rapide que $A\beta_{1-40}$). Ces structures amyloïdes renferment aussi du peptide $A\beta_{1-40}$, mais ce dernier présente une moindre proportion à l'agrégation. Les peptides Aβ oligomérisés perturbent la plasticité synaptique même en absence de plaque sénile locale. La couronne de la plaque sénile renferme des terminaisons nerveuses dégénérées. Certains marqueurs associés au neurites sont présent au niveau des couronnes à savoir la butérylcholinéstérase, certains neurotransmetteurs et des protéines impliquées dans la croissance des axones **(Morgan *et al.*, 2004)**. L'analyse immunohistochimique des plaques séniles a révélé la présence de nombreuses molécules associées **(Morgan *et al*, 2004)**, parmi lesquelles figurent des

marqueurs présynaptiques, des phospholipides, des ARN , des protéases, des facteurs du complément, des apolipoprotéines E et J et des ions (Zn^{2+}, Cu^{2+} et Fe^{2+}), traduisant la survenue d'un processus inflammatoire et d'un stress oxydant ainsi qu'une mort des neurones environnants. Les plaques séniles sont généralement situées à proximité de vaisseaux sanguins et associées aux cellules gliales **(Figure 3)** participant à l'initiation d'un processus inflammatoire vasculaire **(Mandybur & Chuirazzi, 1990).**

4.1.1 APP (Amyloïd Precurcor Protein)

Le peptide amyloïde est issu du clivage protéolytique d'une protéine précurseur appelée APP (*Amyloïd Precurcor Protein*). Il s'agit d'une glycoprotéine majoritairement ancrée à la membrane cytoplasmique des neurones (**Figure 4**).

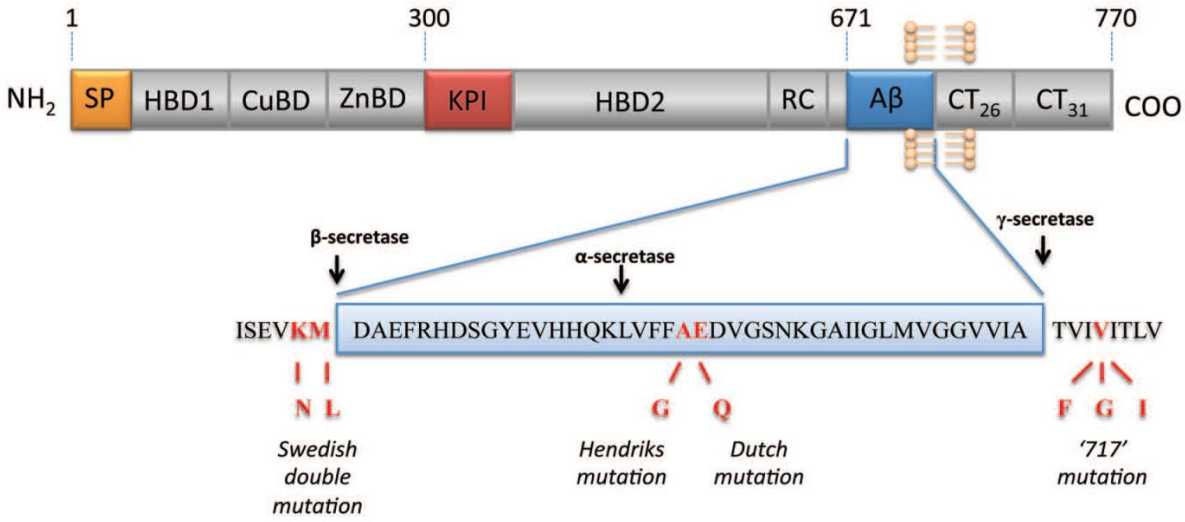


Figure 4 : ***Structure de l'APP****. L'APP est constituée d'un grand domaine extracellulaire, d'un domaine transmembrananaire hydrophobe et d'un court fragment carboxy-terminal cytoplasmique. La protéine est clivée par différentes sécrétases soit par la voie amyloidogénique, soit par la voie non-amyloidogénique qui conduisent ou non au relargage du peptide Aß (clivage par ß-et γ-sécrétase)* **(Zhou *et al.*, 2011).**

4.1.2 Clivage de l'APP

Il existe trois sites principaux de clivage de l'APP, qui impliquent chacun un système enzymatique particulier **(Mattson, 1997 ; Nunan, 2002)** associé au terme sécrétase puisque la plupart des fragments de l'APP issus de ce clivage sont sécrétés. Deux principales voies de clivage distinctes de l'APP en résultent (**Figure 5**) :

- *La voie non amyloïdogène*, pendant laquelle un clivage par l'α-sécrétase, entre les résidus 687 et 688 (résidus 16 et 17 d'Aβ) a lieu. Ce clivage conduit à la sécrétion d'un grand fragment N-terminal, sAPPα, et à la formation d'un fragment C-terminal, C83, constitué du fragment tronqué d'Aβ et de la queue cytoplasmique de l'APP. Le clivage par la γ-sécrétase sépare le fragment P3, de la queue cytoplasmique (CTF : *Cytoplasmic Tail Fragment*) ; le fragment P3 est alors relargué par la cellule.

- *La voie amyloïdogéne*, pendant laquelle la β-sécrétase clive l'APP entre les résidus 671 et 672. Ce clivage conduit à la sécrétion du fragment N-terminal sAPPβ et à la formation du fragment C-terminal C99, constitué de la séquence d'Aβ et de la queue cytoplasmique. Le clivage par la γ-sécrétase libère l'Aβ qui pourra s'oligomériser.

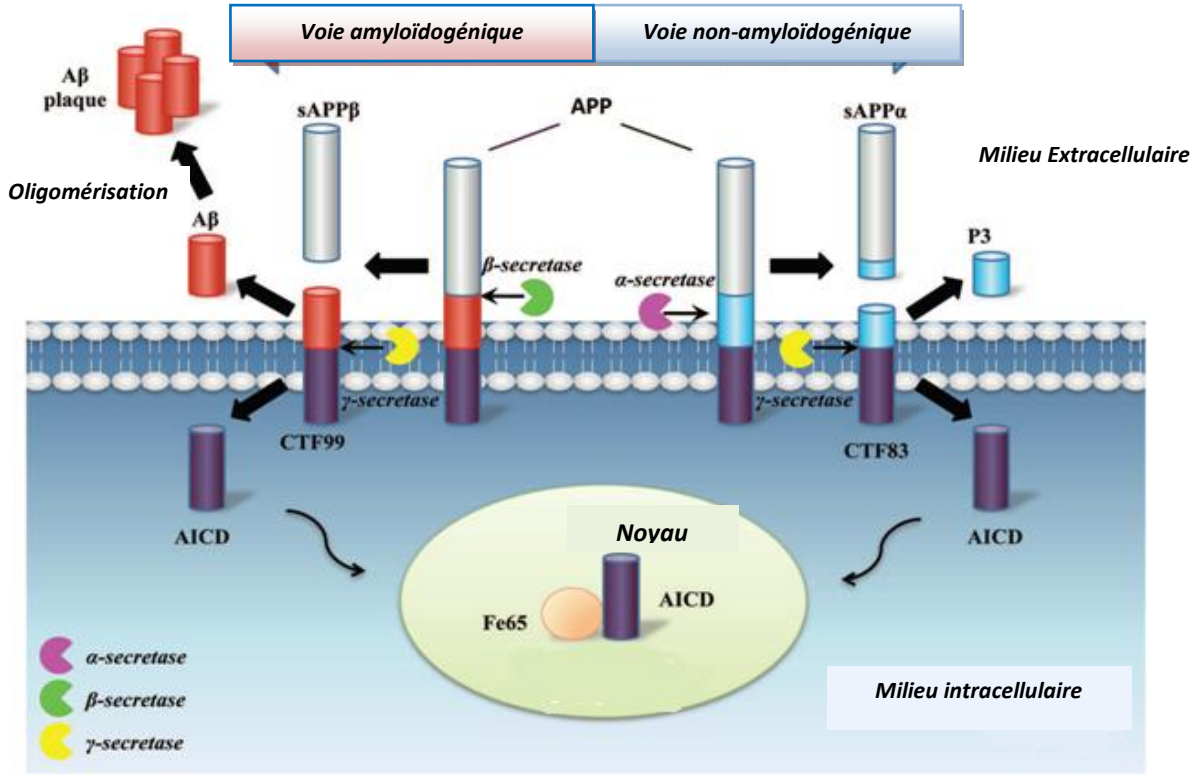


Figure 5: ***Clivage enzymatique de l'APP.*** *La voie non-amyloidogenique implique un clivage protéolytique par l'α et la γ-sécrétase aboutissant à la génération de sAPPα et des fragments carboxy-terminaux incluant P3, CTF83 (Cytoplasmic Terminal Fragment 83) et AICD (Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain). la voie amyloïdogénique implique des clivages protéolytique par la ß-et la γ-sécrétase aboutissant à la génération de sAPPß et des fragments carboxy-terminaux incluant l'Aß, CTF99 (Cytoplasmic Terminal Fragment 99) et l'AICD. Le peptide Aß pourrait s'oligomériser et former des fibrilles menant à la MA. sAPPα pourrait fonctionner pour promouvoir la neurogenèse et la survie cellulaire, tandis qu'AICD pourrait avoir des effets inhibiteurs de la neurogénèse probablement via la formation d'un complexe avec Fe65 jouant un rôle dans la régulation transcriptionelle* (**Zhou *et al*., 2011**).

Le clivage par la γ-sécrétase, s'effectue en différents sites et conduit ainsi à une hétérogénéité C-terminale des peptides P3 et Aβ. En fait, la γ-sécrétase est un complexe multi-protéique constitué de quatre partenaires : un hétérodimère des présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), la nicastrine, une glycoprotéine de type I et deux protéines membranaires, APH-1 et PEN-2 **(Kaether *et al.,* 2006)**. L'implication de PS1 et PS2 dans le clivage par la γ-sécrétase a été illustrée par la mise en évidence de mutations des gènes correspondants qui sont associées à une maladie d'Alzheimer familiale précoce induite par une surproduction du peptide amyloïde $A\beta_{1-42}$ **(Sherrington, 1995 ; Levy-Lahad, 1995)**

4.2. La Dégénérescence neurofibrillaire

4.2.1 Protéine Tau

Les enchevêtrements de neurofibrilles sont constitués d'agrégats de protéines Tau (tubulin associated unit) sous forme hyperphosphorylée. La protéine Tau est une protéine cytosolique thermostable de la famille des protéines associées aux microtubules, composants essentiels du cytosquelette des neurones. Elle assure ainsi le rôle de promouvoir et de stabiliser l'assemblage des microtubules **(Weingarten *et al.,* 1975 ; Martin *et al.,* 2011)**. Elle pourrait aussi moduler le transport des vésicules le long de l'axone en interagissant avec des protéines telles que la kinésine et participer au transport d'organites le long des microtubules **(Tatebayashi *et al.,* 2004).** La protéine Tau est formée de 352 à 441 acides aminés (de masse 55 à 62 kDa) et existe sous six isoformes produites à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 17. Des mutations génétiques sur ce chromosome conduisent à la démence frontale temporale avec Parkinsonisme, mais aucune mutation conduisant à la maladie d'Alzheimer n'a été répertoriée à ce jour **(LaFerla *et al.,* 2005).** Ces protéines ont la particularité de posséder dans leur séquence trois à quatre répétitions d'un même domaine dit de liaison aux microtubules qui lui permet la liaison aux microtubules. Cette liaison est par ailleurs fortement régulée par la phosphorylation de la protéine au niveau de résidus sérine et thréonine.

4.2.2 Modifications post-traductionnelle de la protéine Tau

Lors d'un phénomène neurodégénératif, la protéine Tau subit de multiples altérations, qui lui font perdre ses capacités de maintien et d'assemblage des microtubules. En effet, la protéine Tau présente un nombre anormalement élevé de modifications biochimiques dont les mieux décrites sont la glycosylation, l'hyperphosphorylation, l'ubiquitinylation, la polyamination, la nitration et éventuellement, la glutathionylation **(Gong *et al.,* 2004).**

La protéine Tau est physiologiquement phosphorylée au niveau de certains sites tels (résidus S262, S293, S324 et S356). Suite à son hyperphosphorylation au niveau des résidus S212, S214, S231, S235 et S422 Tau se dissocie des microtubules compromettant ainsi leur stabilisation et leur fonctionnement **(Martin *et al.*, 2011)**. Cela conduit à une altération des transports axonaux et dendritiques ainsi qu'à une dégénérescence des neurones. De plus, la protéine hyperphosphorylée libérée montre une solubilité nettement plus faible. Elle est aussi plus sensible aux modifications chimiques induites par le stress oxydant et subit des changements conformationnels suite à ces oxydations. Elle s'agrège alors sous forme de paires hélicoïdales de filaments (PHFs: "*paired helical filaments*"). Ces dernières s'associent ensuite en structures plus grandes : les neurofibrilles. Par ailleurs, il est également suggéré que les ions Al^{3+} et Fe^{3+}, retrouvés liés à Tau dans des cerveaux de patients post mortem soient impliqués dans la polymérisation des protéines Tau hyperphosphorylées **(Shin *et al* ., 2003 ; Sayre *et al.*, 2000)**

Tau est phosphorylée par différentes kinases parmi lesquelles figurent : les MAP (*mitogen activated protein*) kinases, les Tau tubuline kinases, les kinases dépendantes des cyclines telles que Cdc2 et Cdk5, les MARK (*Microtubule Affinity Regulating Kinase*), la CaMKII (*Ca2+/calmodulin dependent protein kinase II*), la PKA (*cyclic-AMP-dependent kinase*), la GSK-3β, les caséines kinases I et II ainsi que les SAPK/JNK (*Stress Activated Protein Kinases*) (**Buée-Scherrer & Goedert, 2002 ; Johnson & Stoothoff, 2004; Balaraman *et al* ., 2006**).

L'accumulation de la protéine Tau sous forme de fibrilles est présente non seulement dans le corps cellulaire des neurones, mais aussi dans leur axone et leurs dendrites. La répartition des DNF varie selon le stade clinique de la maladie. Ainsi, **Delacourte *et al.*, (1999)** ont démontré que la DNF suivait une évolution précise qui est caractéristique et hiérarchique.

5. Evolution de la MA et localisation des lésions cérébrales

Les premières lésions de DNF apparaissent dans le cortex entorhinal, région de la face interne du lobe temporal impliquées dans le traitement des informations, et au niveau de celles de l'hippocampe impliqué dans le traitement de la mémoire. Puis les lésions affectent l'amygdale (concernant la mémoire affective), les cortex associatifs temporaux (concernant la mémoire et le langage), pariétaux (apraxie, abstraction) et frontaux.

Selon l'échelle de Braak & Braak **(Braak & Braak, 1991)**, six étapes neuropathologiques ont été distinguées pour déterminer la progression de la MA (**Figure 6**). Les stades I et II sont nommés stades trans-entorhinaux.

Durant ces stades, les cerveaux sont légèrement affectés et le sujet ne présente pas encore de déficiences cognitives. Initialement, les lésions et les DNF se développent dans la région trans-entorhinale et entorhinale. Les stades III-IV sont appelés stade limbique ; à ces stades, le cortex transentorhinal/entorhinal et le système limbique sont impliqués. Les DNF sont augmentés dans le cortex transentorhinal /entorhinal comparé aux stades I-II. Des déficiences au niveau des fonctions cognitives et des changements de la personnalité du patient sont observées. Du stade I à IV, la plupart des régions cérébrales restent exemptes de DNF sauf quelques zones corticales qui sont très légèrement affectées comme le cortex visuel/moteur et le cortex cérébelleux. Les stades V et VI impliquent les régions corticales associatives. Des destructions sévères des régions néocorticales ont lieu accompagnées d'un taux élevé des DNF et de plaques séniles. A ce stade le diagnostic clinique de la MA peut être confirmé.

Selon **Delacourte *et al* (1999)** dix stades d'évolution de la MA peuvent être décrites, elles correspondent à dix régions cérébrales touchées successivement avec un ordre invariable ; de la région hippocampique vers les régions très associatives, puis vers les régions corticales primaires. Selon la vulnérabilité de la personne, l'atteinte des régions associatives et primaires varie et provoque des variations cliniques entre les malades ce qui explique la spécificité de l'atteinte de chaque patient. Cette classification est la suivante :

Stade 0 : aucune région cérébrale n'est affectée par les DNF.

Stade 1: il est trouvé chez toutes les personnes âgées de plus de 75 ans. Des DNF sont observées dans la région transentorhinale. Cette région fait partie du cortex limbique (cortex associé à la mémoire et aux émotions).

Stade 2 : les DNF touchent le cortex entorhinal. A ce stade, aucun dépôt amyloïde n'est observé et cliniquement aucun symptôme n'est remarqué.

Stade 3 : à ce stade, la région hippocampique est touchée. Des DNF sont observées mais les dépôts amyloïdes ne sont pas décelés. Des troubles cognitifs discrets ; Mild cognitive impairment (MCI) sont probables à ce stade.

Stade 4 : à ce stade, le pôle temporal est atteint. On trouve généralement des dépôts discrets de substance amyloïde et le MCI est presque systématique.

Stade 5: le cortex temporal inférieur est touché par des dépôts d'amyloïde, dans le néocortex. Une agrégation du peptide AB 42 est observée et les troubles cognitifs sont généralement légers.

Stade 6 : il s'agit d'une évolution des DNF, des plaques amyloïdes vers le cortex temporal moyen. Les signes cliniques sont parallèlement plus importants.

Stade 7 : les DNF s'installent simultanément dans toutes les régions corticales associatives (polymodales): le cortex frontal antérieur, le cortex temporal supérieur, le cortex pariétal inférieur. A ce stade, les troubles cognitifs peuvent correspondre aux premiers stades de la maladie d'Alzheimer. Les dépôts d'amyloïdes sont significatifs.

Stade 8 : les régions moins associatives (unimodales) sont affectées par les DNF, Il s'agit d'une avancée dans la maladie d'Alzheimer correspondant aux formes modérées de la maladie d'Alzheimer. La progression des DNF est accompagnée en parallèle par une intensification des processus dégénératifs dans les premières régions touchées (région hippocampique).

Stade 9 : la DNF va envahir ensuite les régions corticales primaires, visuelles et/ou motrices. Les dépôts d'amyloïdes sont très importants. Il s'agit d'un stade sévère de la maladie d'Alzheimer.

Stade 10 : c'est le dernier stade d'invasion des DNF, puisque toutes les régions corticales sont affectées, ainsi que de nombreux noyaux sous corticaux. Les dépôts amyloïdes sont très importants.

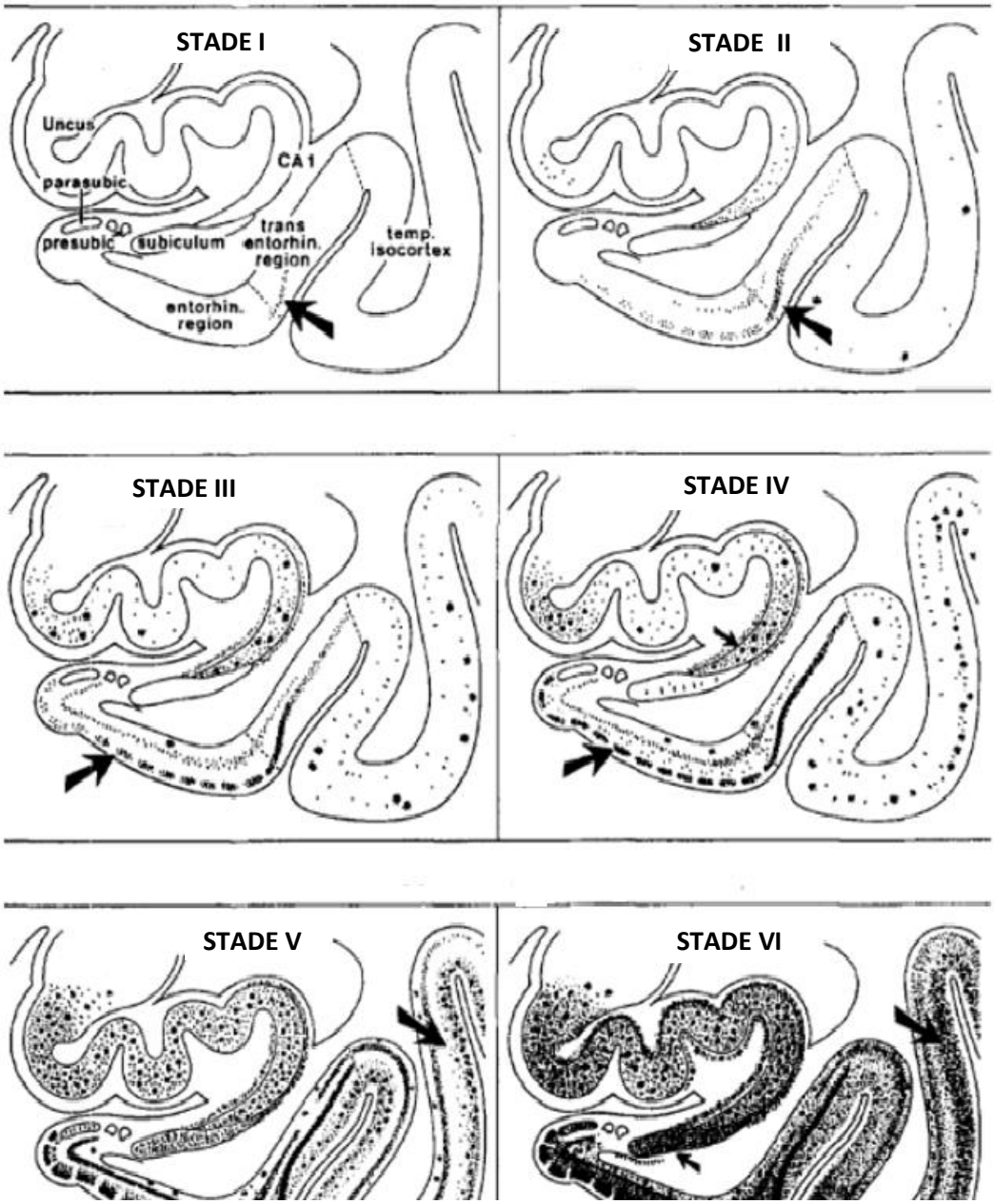


Figure 6 : ***Classification de Braak & Braak.*** *Evolution* des changements neurofibrillaires dans les régions hippocampique, entorhinal et transentorhinal et dans l'isocortex temporel contigu pendant la progression de MA. Les flèches indiquent les principales modifications ***(Braak & Braak, 1991)***.

6. Méthodes biologiques et cliniques de caractérisation de la maladie d'Alzheimer

6.1 Diagnostic clinique

La nécessité d'un diagnostic fiable dès les stades précoces de la pathologie a conduit à la mise en œuvre de certains outils de diagnostic. La démarche diagnostique comprend un entretien avec le patient et son entourage et un examen clinique qui a pour but d'établir un profil neurologique, cognitif et comportemental du patient. Généralement le diagnostic est fait après 3 ans d'évolution de la maladie ; ceci est expliqué par le fait que les premiers signes sont considérés non pathologiques.

En effet, le diagnostic clinique de démence de type Alzheimer est porté sur un ensemble de critères répondant à une standardisation internationale et identifiés à partir d'un examen clinique, neuropsychologique et par imagerie par résonnance magnétique nucléaire cérébrale (IRM). Ce diagnostic sera validé par des analyses biologiques du liquide céphalo-rachidien (LCR) et éventuellement par un examen anatomopathologique post-mortem **(Guriot Milandre *et al.*, 1997).**

6.1.1 Examen clinique

L'utilisation des critères définis par *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) et *Alzheimer's Disease and Related disorders Association* (ADRDA) permet de retenir le diagnostic de MA possible ou probable avec une probabilité comprise entre 90 et 95%. Ils permettent en outre d'éliminer un certain nombre de diagnostics différentiels.

Les troubles de la mémoire sont les premiers symptômes qui dominent le tableau clinique dans la plupart des cas. Ils portent d'abord sur les faits récents. C'est l'évolution de ces troubles qui fait penser au diagnostic de la MA et leur association progressive avec d'autres troubles du langage, praxiques et gnosiques **(Touchon & Portet, 2000)**. Une évaluation neuropsychologique est aussi faite et elle concerne une grande variété de fonctions mnésiques telles que l'attention, la flexibilité cognitive, le raisonnement abstrait, la mémoire, le traitement d'informations visuelles et les capacités perceptivo motrices. Cette évaluation a deux objectifs : authentifier le déclin cognitif et caractériser les troubles, ce qui contribue au diagnostic étiologique de la démence.

Les outils psychométriques permettent de détecter une perte globale des performances intellectuelles. Ils font appel à des tests standardisés et plus récemment à des épreuves permettant d'évaluer en un minimum de temps un ensemble de fonctions cognitives, comme

le test MMSE *(Mini Mental Status Examination)* qui est simple, rapide et universel **(Duarte et *al.*, 2004 ; Kuslansky et *al.*, 2004)**.

6.1.2 L'imagerie

Les études cherchant à visualiser directement les lésions de la maladie par neuro-imagerie étant encore infructueuses, ce sont les signes secondaires qui sont utilisés pour suggérer un diagnostic. L'atrophie temporale médiane, qui peut être détectée par imagerie par IRM, est très évocatrice surtout si elle évolue rapidement lors d'examens répétés **(Dhenain *et al.*., 2002).** De nombreux travaux visent à développer des méthodes non invasives utilisables chez l'homme pour visualiser les lésions caractéristiques. Ces nouvelles stratégies de visualisation reposent sur le développement de marqueurs qui, après injection par voie intraveineuse, passent la barrière hémato-encéphalique et se fixent sur les plaques séniles où ils sont détectés par différentes méthodes (IRM, tomographie par émission de positons (TEP) ou tomographie par émission monophotonique (TEMP)).

6.2 Les bio-marqueurs utilisés pour le diagnostic

Un des enjeux majeurs de la recherche sur la MA concerne la recherche de marqueurs biologiques permettant de faire le diagnostic le plus précoce possible, avant la perte d'autonomie qui définit le stade de démence **(Couderc, 2000).** De tels marqueurs constitueraient un indice important; ils permettraient de porter un diagnostic de certitude à un stade précoce, de suivre la réponse au traitement et seraient des outils précieux pour les études épidémiologiques et la recherche thérapeutique. La découverte de tels marqueurs biologiques de MA demeure un objectif majeur **(Sunderland *et al.*, 2005).**

Face à la complexité de MA, il est difficile d'imaginer qu'un seul marqueur puisse suffir à poser le diagnostic de certitude. Le taux du peptide $A\beta_{1-42}$ et de protéines Tau phosphorylées au niveau du LCR, reliés avec les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaires, constituent les principaux biomarqueurs **(Wagner *et al.*, 2003 ; Blennow, 2004 ; Parnetti *et al.*, 2006).** En effet, les patients atteints de MA présentent un niveau anormalement élevé en protéine Tau phosphorylée, par rapport aux sujets normaux et aux patients atteints d'autres pathologies neurologiques. Cependant cette détection n'est possible qu'à des stades avancés de la maladie. Par ailleurs, selon diverses études, le taux de l'$A\beta_{1-42}$ est significativement plus faible dans le LCR des patients atteints que chez les sujets normaux **(Motter *et al.*, 1995 ; Boss, 2000)**. La diminution de la teneur en $A\beta_{1-42}$ dans le LCR apparaît liée à une accumulation du peptide dans le fluide interstitiel cérébral. Ces deux marqueurs ne

sont pas corrélé avec l'âge du patient ou l'âge de début de la maladie ce qui suggère que ces taux anormaux ne sont pas dus au vieillissement normal mais bien à un processus pathologique.

6.3 Facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer

La MA est une maladie multifactorielle dont l'émergence résulte de l'interaction entre un terrain génétique et des facteurs environnementaux.

6.3.1. Les facteurs génétiques

Ces facteurs sont impliquées dans la MA sous ses deux formes : sa forme monogénique ou familiale caractérisée par un début précoce (inférieur à 60 ans) représentant environ 5 % des cas et sa forme sporadique qui est la plus courante.

Pour les formes familiales, 150 mutations sur trois gènes ont été observées et sont responsables de la transmission de la maladie. Les gènes susceptibles de porter ces mutations sont : le gène du chromosome 21 codant pour la protéine APP et deux gènes situés sur le chromosome 1 et 14 codant respectivement pour les protéines PS2 et PS1 **(Selkoe *et al.*, 2001)**.

Dans les formes dites sporadiques de la maladie, les variations du gène de l'apoliprotéine E (ApoE) localisé sur le chromosome 19, codant pour la production de trois protéines isoformes E2, E3, E4, qui sont des transporteurs des lipides sanguins, pourraient constituer un facteur de risque important. De nombreuses études ont mise en évidence une forte association entre l'allèle ε4 et la MA. Au contraire, les sujets qui sont porteurs d'ApoE2 ont un risque plus faible comparé à l'ensemble de la population **(Ertekin-Taner, 2007)**. Un gène du chromosome 12 codant pour l'α2-macroglobuline, impliqué dans la dégradation de l'Aβ, ainsi qu'un locus sur le chromosome 10 ont aussi été identifiés comme d'autres facteurs de risque **(Selkoe *et al.*, 2001).**

6.3.2. Les facteurs environnementaux

Dans 95 % des cas, la MA est de forme sporadique, sans antécédents familiaux et à l'étiologie inconnue. L'âge, l'environnement et d'autres facteurs s'y rattachant joueraient un rôle non négligeable. L'âge est le facteur de risque le plus évident. En fait, la prévalence de la pathologie double tous les 5 ans après l'âge de 65 ans. Selon l'étude **PAQUID (2003),** la fréquence est relativement stable avant 75 ans et estimée à environ 3,5 pour 1 000 personnes/année. Après 75 ans, l'incidence croît pour atteindre 60 pour 1 000 personnes/année chez les sujets dépassant les 90 ans.

Cette pathologie touche plus de femme que des hommes puisque au-delà de 80 ans, la fréquence d'atteinte devient plus importante chez les femmes **(PAQUID, 2003)**. Cette différence en fonction du sexe pourrait s'expliquer par les différences génétiques et hormonales (notamment liée à la baisse du niveau d'oestrogènes avec l'âge chez la femme). Cependant, la différence de longévité entre hommes et femmes, pourrait aussi expliquer ce phénomène **(Vina & Lloret, 2010).**

A ces deux facteurs s'ajoutent des variables liées à l'éducation, au niveau socio-professionnel et aux activités de loisirs, mais aussi d'autres traits biologiques et psychologiques joueraient un rôle non négligeable **(Schenk *et al.*, 2004).** Parmi ceux-ci on note les pathologies vasculaires (**Kudo *et al.*, 2000)** et les traumatismes crâniens **(Jellinger , 2004**). D'autres études incriminent certains métaux (aluminium, mercure, ...), l'alcool, le tabac et les facteurs alimentaires (carences en vitamines en particulier Vitamine D et Vitamine E, régime trop riche en graisses, ...) (**Dosunmu *et al.*, 2007**).

7. Inflammation et Alzheimer

Il est connu que le système nerveux central (SNC) a un système immunitaire endogène coordonné par des cellules immunocompétentes. Les principaux acteurs impliqués dans le processus inflammatoire au cours de MA sont les cellules microgliales, des cellules gliales (astrocytes) et peut-être les neurones **(Akiyama *et al.*, 2000a ; Akiyama *et al.*, 2000b).**

Les cellules microgliales et les astrocytes répondent rapidement à la pathologie avec des changements de leur morphologie, de leur antigénicité et de leurs fonctions (**Sofroniew & Vinters, 2010).**

Les cellules microgliales sont des cellules qui soutiennent les neurones et les protègent. Elles agissent comme des cellules de défense immunocompétentes qui orchestrent la réaction immunitaire endogène du SNC. Elles peuvent exprimer le complexe majeur histocompatibilité type II (CMHII), des cytokines pro-inflammatoires, des chemokines, des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des protéines du complément. Ces cellules jouent un rôle central dans la réponse cellulaire aux lésions pathologiques, tel que l'Aβ et les plaques séniles **(Kalaria, 1999).** En fait, l'Aβ peut attirer et activer les cellules microgliales conduisant à leur accumulation autour des dépôts amyloïdes. L'exposition des cellules microgliales à l'Aβ cause leur activation menant à une augmentation de l'expression cellulaire du MHC II et à la sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 (IL-1), interleukine-6 (IL-6) et TNF-α (*Tumor Necrosis Factor- α*)) ainsi que de chemokines

(interleukine-8 (IL-8), MIP-1α (*Macrophage Inflammatory Protein-1α*) et MCP1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*)) **(Rogers & Lue, 2001).**

L'Aβ peut induire le passage des macrophages de la circulation périphérique à travers la barrière hémato encéphalique suite à leur recrutement par les chemokines, ce qui pourrait accentuer l'ampleur de l'inflammation. **Kopek & Carroll (1998)** ont montré que l'Aβ peut inciter une réponse phagocytaire dans les cellules microgliales de façon dose et temps dépendante.

L'internalisation et la co-localisation du lysosome et de l'Aβ ont été observées par **bolmont *et al.* (2008)** associées à des dégâts au niveau des neurones voisins, qui coïncident avec l'arrivée des cellules microgliales alors que la résolution des plaques n'a pas été observée durant des semaines **(Meyerluehmann *et al.*, 2008)**

Les astrocytes réactives contribuent également à la neurodégènerescence en stimulant des processus apoptotiques **(Malchiodi-Albedi, 2001)**. En cas de MA, les astrocytes se trouvent associés aux dépôts amyloïdes où ils sécrètent plusieurs molécules pro-inflammatoires, comme les interleukines, les prostaglandines, les leucotriènes, les thromboxanes et des facteurs de complément. Ces molécules sont semblables et colocalisées avec celles secrétées par les cellules microgliales. Une étude a détecté des plaques diffuses associées aux astrocytes, constitué de granules d'Aβ, dans le cerveau de personnes âgées non démentes. Cette observation suggère que les astrocytes peuvent être impliqué dans la phagocytose de l'Aβ **(Yamaguchi *et al.*, 1998)** et que probablement un déficit de l'élimination de l'Aβ par les astrocytes ferait partie de la pathologie de la MA.

Dans les cerveaux de patients atteints de la MA **(Sofroniew & Vinters, 2010)** et de modèles transgéniques de souris MA **(Perez *et al.*, 2010),** les astrocytes réactives occupent des positions à proximité des plaques, en encerclant les dépôts d'Aβ, un mécanisme par lequel les cellules pourraient servir de barrière entre tissu sain et tissu présentant une inflammation, glie cicatricielle **(Sofroniew & Vinters, 2010).**

De plus, la forme fibrillaire du peptide amyloïde interagit avec des protéines du complément et active de ce fait le système de l'immunité innée **(Emmerling *et al.*, 2000).** En particulier, l'interaction Aβ/C1q, qui implique les 11 résidus N-terminaux d'Aβ, active la voie classique du complément **(Carroll, 1998)**. Ce processus induit une cascade d'activations qui conduit à la formation de complexes lytiques, responsable en partie de la mort neuronale, et à une activation inflammatoire (**Tenner, 2001).**

Les neurones eux-mêmes pourraient jouer un rôle dans le processus inflammatoire par la production de certaines cytokines comme IL-1 **(Friedman *et al.*, 2001)**, IL-6 **(Li *et al.*,**

2000), TNF-α **(Renauld *et al.,* 2002)** et certaines pétraxines à savoir la CRP, et l'Ap (amyloid P) **(Yasojima *et al.,* 2000)**. Les niveaux d'expression des ARNm des protéines de la voie classique du complément sont de même augmentés dans les cerveaux de patients Alzheimer en comparaison à ceux des contrôles **(Shen *et al.,* 1997).**

8. Modèles d'études de la maladie d'Alzheimer

8.1 Modèles in vitro

Le modèle cellulaire est une étape transitoire qui doit permettre la compréhension des mécanismes pathologiques avant de passer aux modèles animaux. L'utilisation d'un modèle cellulaire a de multiples intérêts. Il permet d'identifier des voies métaboliques, des cibles pharmacologiques et les effets de traitement ou de l'inactivation de gènes sur diverses fonctions cellulaires.

Différentes lignées cellulaires sélectionnées dans le cadre d'étude en cancérologie présentent de l'intérêt pour l'étude des mécanismes moléculaires impliquées dans la MA. Il s'agit essentiellement de neuroblastomes humains à savoir les cellules SH-SY-5Y, SK-N-BE, SKNSH-SY5Y qui dérivent de la lignée SKNSH, les cellules IMR-32 (**Neil *et al*., 1994**) et les cellules Neuro 2A. A un moindre degré, des cultures primaires de cellules neuronales du cortex et de l'hippocampe de souris et de rat peuvent aussi être utilisées **(Priller *et al.,* 2006).**

Récemment, une culture de cellules souches (*3-D stem cells*) a été développée à New-York par l'équipe 'New York Stem Cell Fundation for Alzheimer's disease research' (http://nyscf.org/research). Ces cellules ont été créées en reprogrammant les cellules de la peau et/ou des prélèvements de sang de patients Alzheimer pour donner des cellules souches pluripotentes capables de devenir des neurones ou d'autres cellules cérébrales (**Nestor *et al*., 2013)**.

8.2 Modèles in vivo

L'utilisation de modèles animaux d'une maladie a pour objectif de mieux comprendre dans le temps et au niveau tissulaire les mécanismes moléculaires de cette maladie afin de développer des traitements étiologiques.

Pour la MA, divers modèles animaux naturels et artificiels ont été crées.

✓ ***Modèles naturels*** *:* Différents modèles animaux développent une démence lors du vieillissement naturel. ils présentent une ou plusieurs caractéristiques de la maladie (dépôts amyloïdes, protéine tau anormalement phosphorylée, perte neuronale). Parmi ces modèles figurent :

- *Le modèle microcèbe : Microcebus murinus*, primate, prosimien, lémurien de la famille des Cheirogaleidae originaire de Madagascar, de taille : 12 cm, poids 70-120 g, durée de vie de 8 à 12 ans en captivité. Avec l'âge, le microcèbe présente des similitudes avec le vieillissement humain. Cet animal a l'avantage d'avoir un lobe frontal et temporal plus développé que celui des rongeurs et donc plus proche de celui de l'homme. De point de vue histologique, le microcèbe présente les lésions de type Alzheimer à savoir, les plaques amyloïdes, la protéine tau hyperphosphorylée et la perte des neurones cholinergiques. Le cerveau vieillissant des lémures est aussi intéressant car comme l'homme, beaucoup de lémurs vieillissants maintiennent leur capacité d'apprentissage et d'interaction sociale, mais montrent des signes de perte de l'attention avec augmentation accrue de périodes de repos (**Bons *et al*., 2006**).

- *Le modèle singe* : Il s'agit du modèle le plus proche de l'homme puisque la séquence d'acides aminés constituant le peptide amyloïde est identique à celle produite chez l'homme. Ce modèle développe des dépôts amyloïdes essentiellement sous forme de plaques neuritiques et de plaques diffuses.

- *Le modèle canin* : Les chiens peuvent être particulièrement utiles dans l'étude du vieillissement de cerveau humain puisqu'ils développent naturellement un déclin cognitif avec l'âge, en accumulant des dommages oxydatifs et le peptide Aß. Ce modèle est utilisé puisque en plus des pertes de la mémoire, il accumule naturellement différents types de neuropathologie en accord avec celles développées au cours du vieillissement et de la MA chez l'homme à savoir l'atrophie corticale, la perte neuronale, la perte de la neurogénèse, les plaques amyloïdes (plaques compactes associées à des neurites dystrophiques et des plaques diffuses associées à des astrocytes) ainsi que des angiopathies cérébrales amyloïdes et des dommages oxydatifs (**Dimakopoulos & Mayer, 2002; Cotman & Head, 2008; Dowling & Head, 2012**).

- *Le modèle chat :* Le chat vieillissant développe des changements comportementaux (des changements dans le cycle veille-sommeil, une désorientation...). Il s'agit des manifestations cliniques du vieillissement cérébral. Au niveau du cerveau des chats atteints, des changements semblables à ceux des personnes atteintes de la MA sont présents à

savoir, le dépôt de peptide Aβ, une atrophie du cerveau et un nombre de neurones diminués. Il y a aussi des modifications neurochimiques avec des altérations dans les taux de dopamine et de sérotonine. Les radicaux libres présents de manière chronique finissent par provoquer des dommages importants.

- D'autres modèles animaux naturels ont été utilisé à savoir les ours, les lapins et les moutons âgés (**Woodruff-pak, 2008**).

✓ ***Les modèles artificiels***

- *Rat – Mouton* : Plusieurs stratégies ont été utilisées sur les rongeurs et les primates cherchant à mimer la MA à savoir ; l'injection intracérébrales de protéines Tau anormalement phosphorylée, ou de l'amyloïde β induisant la formation de plaques séniles, l'injection d'acides okadaïque, inhibiteur des phosphatases 1 et 2 dans l'hippocampe de rat et dans le cortex de mouton induisant la formation des neurites dystrophiques et la destruction du noyau basal de Meynert entrainant des déficits mnésiques.

- *Souris* : Actuellement, une autre approche est utilisée pour définir des modèles animaux de la MA. Cette approche consiste à l'introduction d'un gène humain muté ou à son inactivation chez un animal de laboratoire afin de moduler l'expression des protéines responsables de la maladie. Il s'agit de modèles animaux transgéniques. La souris, facile à manipuler, de durée de vie assez courte (30 mois) et ayant un génome structuralement proche de celui humain, reste l'animal de choix.

Il est important de souligner qu'aucun modèle de souris existant ne présente toutes les caractéristiques de la MA. Le modèle idéal développerait les caractéristiques cliniques et pathologiques de la MA, observées chez l'homme, y compris les déficits comportementaux, les plaques amyloïdes et DNF, la perte des synapses et des neurones, l'axonopathie. Différents modèles de souris développent ces phénotypes à divers degrés et avec différents combinaisons.

Diverses mutations des gènes impliquées dans la physiopathologie de la MA ont été introduites chez ces souris. Ces mutations concernent les gènes suivants, APP, PS1, PS2, APOE et Tau. Le gène muté est introduit de façon simple ou en combinaison avec une mutation d'un autre gène. De ce fait, 16 lignées mutantes ont été développées dont 7 produisent des plaques amyloïdes dans un délai de 6 à 25 mois, mais pas de DNF. La présence

de ces plaques s'accompagne de déficits comportementaux tels que la perte de la mémoire de référence et de l'apprentissage.

Les modèles de souris les plus anciens et les plus largement utilisés sont basés sur l'expression de l'APP transgénique humaine. En général, ces modèles développent la pathologie amyloïde, des déficits de mémoire, la perte des synapses mais ne développent pas de perte de neurones.

Les premiers modèles de souris transgéniques utilisés avaient une mutation seulement au niveau du site de clivage de la γ-sécrétase. Cependant, les lignées actuelles expriment la double mutation suédoise K670N/M671L, au niveau du site de clivage de la β-sécrétase. Certaines lignées expriment seulement la mutation suédoise (Tg2576) tandis que d'autres combinent la mutation suédoise avec une mutation au niveau du site de clivage de la γ-sécrétase (TgCRND8 et J20). Ces souris transgéniques expriment non seulement l'Aβ mais aussi plusieurs autres fragments d'APP qui peuvent être biologiquement actifs. Pour faire ressortir les effets de l'Aβ, les modèles murins exprimant directement l'Aβ ont été produits. Ces souris expriment une protéine de fusion entre l'Aβ et la protéine codée par BRI impliquée dans la démence britannique familiale (FBD : familial british dementia). BRI est une protéine transmembranaire qui est clivée par la furine pour libérer un peptide appelée ABri donne lieu à des plaques amyloïdes dans la maladie FBD. Des souris transgéniques exprimant la protéine de fusion BRI-Aβ 42 développent la pathologie amyloïde. Cependant, aucun déficit cognitif n'a été observé (**McGowan *et al.*, 2005**).

Des mutations de la préséniline ont aussi été utilisées pour créer des modèles de souris de la MA. La plupart des modèles sont basés sur PS1. Des lignées transgéniques exprimant une ou plusieurs mutations de la préséniline sont disponibles (**Hall & Roberson, 2012**). Les souris transgéniques exprimant une seule mutation de la préséniline ont un niveau élevé d'$A\beta_{1-42}$ mais ne développent pas de déficits cognitifs. Un croisement entre des souris transgéniques exprimant la mutation M146L au niveau de la préséniline et la lignée de souris transgéniques hAPP (Tg2576) donne un nouveau modèle : le PSAPP. Ce modèle se caractérise par des taux d'$A\beta_{1-42}$ élevé et développe des dépôts amyloïdes plus précocement que les souris Tg2576. Ces souris présentent des déficits cognitifs avant l'installation des plaques amyloïdes ce qui s'oppose à l'hypothèse de l'implication des plaques dans l'installation des déficits cognitifs **(Holcomb *et al.*, 1998)**.

Actuellement, différentes lignées qui développent des plaques amyloïdes et des déficits comportementaux à un âge précoce sont disponibles tel que le modèle de souris APPswe/PS1ΔE9 qui combine la mutation suédoise de l'APP humain et la mutation ΔE9 de la PS1 ; ces souris développent des altérations neurologiques à 6-7 mois d'âge. Le modèle 5XFAD a été créé en combinant cinq mutations reliées à la MA dont 3 mutation de l'APP (Swedish, Floride (I716V) et London (V717I)) et 2 mutations de la PS1 (M146L et L286V). Les souris 5XFAD expriment des hauts niveaux d'$A\beta_{1-42}$ et développent la pathologie amyloïde et des déficits cognitifs des l'âge de 4 mois. De plus, cette lignée développe une perte de neurones contrairement à la plupart des autres modèles APP et hAPP/PS1 (**Oakley *et al*., 2006**).

Des souris transgéniques exprimant la mutation PS1-A246E ont été générées par le laboratoire Merck (Rahway, New Jersey, USA). Ces souris transgéniques ont été créées à partir d'un knock-out pour lesquels le gène PS1 murin a été supprimé. Le gène PS1 humain a été inséré, non muté (Thy-hPS1) ou muté (Thy-hPS1A246E). Ces souris ne présentaient ni dépôt amyloïde, ni perte neuronale. Toutefois la mutation humaine PS1-A246E exprimée avec la mutation suédoise de l'APP accélère et augmente les dépôts amyloïdes de manière considérable alors que la mutation APPswe seule montre des dépôts amyloïdes chez les souris transgéniques à partir de l'âge de 18 mois ; la double-mutation (APPswe/PS1-A246E) présente des plaques amyloïdes dans l'hippocampe, le subiculum et les cortex frontaux et occipitaux dès l'âge de 10-12 mois (**Borchelt *et al*., 1997**).

Des souris Knock-In (KI PS1-I213T) présentant la mutation découverte dans une famille japonaise et qui induit une apparition précoce de la MA dès l'âge de 45 ± 4 ans, ont été générées par une équipe Japonaise de l'Université d'Osaka.

Les modèles de souris déjà cités développent la pathologie amyloïde mais pas la tauopathie. Les efforts fournis pour modéliser la pathologie neurofibrillaire dans la MA se sont surtout basés sur l'expression de la protéine Tau humaine portant des mutations qui causent la démence frontotemporale (DFT). Cependant, il faut noter que les mutations de la protéine Tau ne causent pas la MA et que le mécanisme par lequel les mutations de la protéine Tau sont impliqués dans la pathophysiologie de la MA est encore mal connu.

Les souris transgéniques hAPP/Tau, appelées TAPP, ont été obtenues en croisant la lignée de souris transgénique Tg2576 et la lignée JNPL3, exprimant la mutation P301L de la protéine Tau humaine. La mutation P301L est la mutation de la protéine Tau la plus commune

chez les patients atteints de la DFT et favorise l'accumulation de Tau. Le modèle de souris JNPL3 exprime la protéine Tau humaine à un niveau semblable à la protéine Tau endogène et développe des déficits moteurs et comportementaux. Le dépôt d'Aβ chez les souris TAPP est semblable à celui observée chez la lignée Tg2576, mais la pathologie Tau est sévère indiquant qu'Aβ peut accélérer la tauopathie.

Un autre modèle utilisant les mutations de la protéine Tau est le modèle 3xTg obtenu en combinant les transgènes de l'APP, PS1 et Tau mutants. L'APP portant la mutation suédoise et la protéine Tau avec la mutation P301L ont été co-injectés dans des cellules embryonnaires homozygotes pour la mutation M146V du PS1 (**Oddo *et al*., 2003**).

Des modèles de souris transgéniques basés sur l'utilisation des mutations du gène de l'APOE ont été développés avec des transgènes qui portent des isoformes humains de l'APOE avec différents promoteurs. Actuellement, des souris Knock-in ApoE3 et APOE4 sont disponibles. Les souris Knock-in ApoE4 développent des déficiences de la plasticité synaptique et cognitive. Ces souris croisées avec des souris transgéniques APP développent des dépôts amyloïdes plus importants (**Bales *et al*., 2009**)

- *Poisson zèbre* : Bien que le modèle souris présente plusieurs avantages justifiant sa large utilisation, d'autres modèles animaux sont actuellement développés. Le modèle des poissons zèbres est considéré comme modèle vertébré approprié à l'étude des maladies humaines. Comparé à d'autres modèles vertébrés, l'utilisation des poissons zèbre mutants est moins coûteux et plus faciles à reproduire. Des mutants de poisson zèbre ont permis de mieux comprendre quelques conditions physiopathologiques de certaines maladies. Le génome de ces poissons contient différentes gènes impliqués dans la MA. Cet animal a deux gènes semblables à l'APP humaine, appa et appb, des orthologues de la ß-sécrétase et de la γ-sécrétase sont trouvés et sont exprimés dans le CNS. Les PS-1 et 2 sont exprimés dans tous les organes durant l'embryogenèse ; cependant, l'expression de la PS-2 se limite au CNS, à l'œil et à la moelle épinière. L'ApoE est exprimée dans les yeux des poissons zèbre et dans quelques cellules des régions cérébrales suivantes : mésencéphalique, télencéphalique et rhombencéphalique suggérant qu'il puisse jouer une fonction significative dans le CNS de cet animal.

Pour mieux comprendre la contribution de la protéine Tau dans la tauopathie et dans la formation des DNF, un modèle de poisson zèbre a été crée en utilisant le gène de la protéine Tau humaine. Ce gène, portant des mutations associées à la forme familiale de la MA, a été

fusionné à la GFP (Green fluorescent protein) et son expression était sous le contrôle du promoteur GATA-2 du poisson zèbre. Cette stratégie a permis de développer un modèle qui présente les caractéristiques de la tauopathie (accumulation de la protéine Tau fibrillaire au niveau des axones et du corps cellulaire) mais pas de façon stable (**Tomasiewicz *et al*., 2002**).

Bai *et al*. ont établi une lignée transgénique de poisson zèbre Tg (eno2:Tau) exprimant la protéine Tau humaine mutante de façon stable au niveau du CNS. Des accumulations sont présentes dans la rétine, les axones et les neurones somatiques. L'expression stable de la protéine Tau à l'âge adulte facilitera l'examen de la progression de la tauopathie dans la MA.

Un autre modèle exprimant Tau de façon stable a été créé par **Paquet *et al*.** en utilisant un transgène de la protéine Tau avec une mutation (TAU-P301L) trouvée chez des patients atteints par la DFT (**Paquet *et al.*, 2009**). L'expression du transgène induit le développement des caractéristiques pathologiques de la tauopathie. De plus, **Paquet *et al.*** ont testé l'effet de l'inhibition de la GSK3-β responsable de la phosphorylation de la protéine Tau.

- *Drosophile :* La drosophile est aussi un intéressant modèle qui a été utilisé abondement dans l'étude des maladies neurodégénératives et en particulier la MA. Cet animal possède tous les composants de la machinerie de l'APP aussi bien pour la voie amyloïdogénique ou non amyloïdogénique. De ce fait, Le modèle drosophile été appliqué pour la découverte de nouveaux régulateurs génétiques du clivage de l'APP et pour l'évaluation de l'effet de certains inhibiteurs de la γ-sécrétase. De même, l'utilisation de ce modèle a démontré que l'ubiquiline dans la régulation de l'activité de la préséniline.

9. Prévention et Traitement de la Maladie d'Alzheimer

9.1 Nutrition et maladie d'Alzheimer

De nombreuses études épidémiologiques traitant de l'importance de la nutrition dans le développement des maladies neurodégénératives sont disponibles (**Kalmijn *et al*., 2004; Cole & Frautschy, 2010**). Ces études ont permis de montrer que l'influence de l'alimentation est indépendante du sexe et de l'origine des individus. Ainsi, des Afro-Américains et des Japonais émigrés aux États-Unis y présentent un risque plus élevé de développer la MA que dans leur pays d'origine. Ces études sont confortées par le fait que les pathologies neurodégénératives ont une prévalence moindre chez certaines populations ayant des modes de vie et des régimes alimentaires moins favorables à leur développement. Ainsi, les personnes profitant du « régime méditerranéen » riche en huile d'olive et en poissons gras,

donc en AGMI et AGPI, présentent une plus faible risque à développer des troubles cognitifs liés au vieillissement (**Panza *et al*., 2004 ; Scarmeas *et al*., 2006a; Scarmeas *et al*., 2006b**).

Par ailleurs, il a été montré que des rats ou des souris dont l'alimentation est supplémentée en DHA ou en huile de poisson présentent une meilleure capacité d'apprentissage que les animaux dont l'alimentation est dépourvue d'AGPI de type ω3 (**Tanabe *et al* ., 2004**). L'intérêt nutritionnel des AGPI et notamment du DHA, proposé par **Burr & Burr** dès 1929 est confirmé par de multiples travaux, avec quelques limitations concernant le stade d'évolution de la démence (**Luchsinger *et al*., 2002**). Ces travaux basés sur un apport journalier de DHA et /ou d'AA ont montré que la vitesse de déclin du score MMSE (donc des fonctions cognitives) est plus faible chez les patients atteints d'une démence faible ou modérée traités par les AG n-3 comparativement aux patients placebo, alors que pour les patients souffrant d'une démence plus sévère la vitesse de déclin est plus importante (**Yvonne Freund-Levi *et al*., 2006 ; Susumu Kotani *et al*., 2006 ; Cunnane *et al*., 2009 ; Cole & Frautschy, 2010)**

L'ensemble de ces travaux suggère une influence déterminante de l'apport et du métabolisme lipidique dans le maintien des fonctions cognitives. D'autres classes d'aliments, parmi lesquelles les fruits et légumes riches en composés antioxydants et/ou anti-inflammatoires tels que les polyphénols (**Hartman *et al*., 2006)**, les vitamines ou les flavonoïdes, pourraient jouer un rôle clef lors du vieillissement en prévenant les maladies neurodégénératives (**Joseph *et al*., 2005**). En effet, ces dernières se traduisent souvent par une forte augmentation des marqueurs de stress oxydant et la survenue d'un processus inflammatoire dont l'ampleur peut être limitée par l'ingestion de tels composés. La présence dans l'alimentation de métaux comme l'aluminium a aussi été largement étudiée. Ce métal affecte le foie, induit une augmentation du taux de cuivre et une dérégulation de son homéostasie causant une toxicité au niveau du cerveau (**Brenner, 2013**).

9.2 Lieu de vie, mode de vie, stimulation cognitive et Maladie d'Alzheimer

Les troubles cognitifs liés au vieillissement sont moins représentés dans les classes socioéconomiques élevées. Ainsi, il a été montré que les personnes développant peu de relations sociales présentent un risque élevé de développer une démence. Une méta-analyse a montré l'existence d'un lien entre le déclin des facultés cognitives et de faibles performances intellectuelles (**Fratiglioni *et al*., 2004**) suggérant une influence directe des activités intellectuelles, sportives et sociales dans la protection contre les pathologies

neurodégénératives. Il était déjà proposé que le contexte intellectuel était lié à différents mécanismes reposant sur les aspects comportementaux et psychologiques. La conservation d'une activité sportive et/ou intellectuelle permettrait en particulier de limiter l'état dépressif qui constitue un facteur de risque important pour les pathologies neurodégénératives et de préserver les fonctions cognitives par une stimulation de ces dernières. Par ailleurs, des études *in vivo* sur la souris ont démontré que la stimulation par un environnement plus riche (mise à disposition de différents jouets) augmente le nombre de dendrites et de synapses par neurone (**Van Praag *et al*., 2000**), stimule l'apprentissage et les fonctions cognitives après l'apparition de différentes lésions cérébrales, limite la formation des dépôts amyloïdes caractéristiques de la MA et facilite la signalisation dans l'hippocampe dans les animaux transgéniques modèles (**Lazarov *et al*., 2005 ; Costa *et al*., 2007; Valero *et al*., 2011 ; Li *et al*., 2013**).

Le niveau d'éducation et les activités socioprofessionnelles confèrent une réserve cognitive permettant de tolérer des dommages cérébraux plus sévères (**Scarmeas *et al*., 2004**). Cette réserve pourrait aussi expliquer des profils de détérioration cognitive distincts, affectant surtout la mémoire et l'attention chez les patients de faible niveau d'éducation, tandis que les patients de niveau élevé subissent davantage une altération de la pensée abstraite (**Bergua *et al*., 2005**).

9.3 Traitements pharmacologiques

A l'heure actuelle, on ne dispose pas de traitement de fond de la MA. L'arsenal thérapeutique se limite à un traitement symptomatique de la maladie. Ces traitements sont des anticholinestérasiques, c'est à dire des inhibiteurs de cholinestérase, enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine, utilisés pour réduire le déficit cholinergique du système nerveux central associé à la maladie. Les plus utilisés sont la tacrine, le donepezil la galantamine et la rivastigmine. Ces traitements permettent une stabilisation puis une diminution de la vitesse du déclin cognitif, voire une amélioration des troubles chez certains patients. D'autres traitements ont été mis sur le marché et essentiellement, la mémantine indiquée dans les formes modérées et sévères de la MA. C'est un agoniste du récepteur du glutamate de type NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique). Il agit sur l'excitotoxicité du glutamate en réduisant l'influx calcique responsable de la mort neuronale et des atteintes de la plasticité synaptique. Une association de la mémantine avec les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase s'est montrée bénéfique. D'autres classes thérapeutiques sont proposées dans le traitement des troubles psycho-comportementaux comme les inhibiteurs de la

recapture de la sérotonine ayant une efficacité sur la tristesse, l'irritabilité et l'anxiété des patients ou les antiépileptiques thymorégulateurs.

D'autres pistes de recherche thérapeutique ont ciblé les deux molécules impliquées dans les lésions de la maladie, le peptide amyloïde Aβ et la protéine Tau.

Pour l'Aβ, les études ont essayé d'intervenir à différents niveaux de la genèse et l'accumulation du peptide amyloïde à savoir :

- L'inhibition ou la modulation de la production d'Aβ à l'aide des inhibiteurs de la β-sécrétase (inactivation du gène) et de la γ- sécrétase (cible la PS1 et la PS2). Une modulation du clivage de l'APP au détriment de la production d'Aβ est également envisagée par des médicaments modulant la teneur en cholestérol comme les statines. En effet, le clivage par les β- et γ-sécrétases ont lieu dans des zones membranaires riches en cholestérol, de type radeaux lipidiques, tandis que le clivage par l'α-sécrétase a lieu dans des zones membranaires à faible teneur en cholestérol. Ainsi, une haute teneur en cholestérol membranaire favoriserait la production d'Aβ tandis qu'une faible teneur favoriserait la production de sAPPα (**Simons *et al*., 1998**).

- L'inhibition de l'oligomérisation d'Aβ et de la formation des fibrilles amyloïdes. Cette stratégie vise à bloquer le mécanisme de formation des plaques formés d'Aβ et ceci par l'utilisation de diverses méthodes :

- Utilisation d'une molécule susceptible de s'associer au domaine 17-21 d'Aβ impliquée dans l'oligomérisation du peptide associée à la formation d'un feuillet β, et ceci de façon à inhiber la formation du feuillet β et les associations intermoléculaires Aβ-Aβ. Ces molécules ont la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique et résistent à la dégradation.

- Utilisation d'un chélateur du zinc et du cuivre, le clioquinol qui s'est avéré capable de réduire la déposition amyloïde chez des souris modèles de MA et de solubiliser des plaques amyloïdes issues de tissus cérébraux humains prélevés post mortem. Cette molécule qui crée une déficience en vitamine B12 a été retirée du marché et devait être utilisée en supplémentant avec cette vitamine.

- Une vaccination compte tenu que soit l'immunisation active de souris modèles par $A\beta_{1-42}$, soit l'immunisation passive par des anticorps anti-Aβ réduisent les dépôts amyloïdes et les déficits cognitifs. Une réduction du déficit cognitif a été observée chez des souris modèles immunisées sans réduction apparente de la

déposition amyloïde mais les essais cliniques sur l'homme ont été arrêtés brutalement en phase II, du fait d'importantes méningio-encéphalites (développées chez 5 % des patients) (**Check *et al*., 2002**). Une immunisation sans réponse inflammatoire critique avec des fragments N-terminaux du peptide amyloïde a été envisagée (**McLaurin *et al*., 2002**).

- L'inhibition de la toxicité du peptide amyloïde sous forme oligomérique et fibrillaire en utilisant des agents ayant une activité anti-oxydante (**Zatta *et al*., 2003**) comme la mélatonine ou inhibitrice de l'apoptose (**Celsi *et al*., 2004**). En particulier, les œstrogènes exerceraient un rôle protecteur ; ainsi un traitement de la ménopause par les œstrogènes a été associé à une diminution du risque de développer la MA (**Honjo *et al*., 2001**).

Pour la protéine Tau, certaines études se sont aussi intéressées à contre carrer le processus d'hyper-phosphorylation de cette dernière par l'utilisation d'un régulateur de la mitose Pin1 qui s'associe aux formes anormalement phosphorylées de la protéine Tau (vu sa capacité de reconnaitre les liaisons phosphosérine-proline et phosphothréonine-proline, principaux sites de l'hyper-phosphorylation de la protéine Tau) et qui est capable de restaurer sa conformation et sa fonction (**Liou *et al*., 2003**).

II. Dysfonctionnement métabolique cellulaire, neurodégènerescence et maladie d'Alzheimer

1. Métabolisme lipidique, neurodégènerescence et maladie d'Alzheimer

Le cerveau est, après le tissu adipeux, l'organe contenant la plus grande proportion de lipides, soit plus de la moitié du poids sec de l'organe. Ceci suggère une implication importante du statut et du métabolisme lipidique dans la structure tissulaire, le fonctionnement cérébral et le maintien des fonctions cognitives **(Björkhem & Meaney, 2004)**

1.1 Cholestérol et neurodégènerescence

Alors qu'il ne représente que 3% de la masse totale du corps, le SNC concentre 25% du cholestérol présent majoritairement sous forme libre puisque plus de 99,5% du cholestérol est non estérifié. Il se distribue principalement au sein de deux compartiments, d'une part au niveau des membranes des cellules neuronales et gliales, et d'autre part dans les cellules oligodendrocytaires, constituant la gaine de myéline des axones (**Dietschy *et al*., 2004**, **Wood *et al*., 2003**). Dans le cerveau, la barrière hémato encéphalique (BHE) limite le passage du

cholestérol circulant vers le cerveau. La quasi totalité du cholestérol requis est donc synthétisée *de novo* **(Dietschy *et al.*, 2001 ; Dietschy *et al.*, 2004).** Après la naissance, le taux du cholestérol est multiplié par 4 dans le cerveau **(Dietschy *et al.*, 2004)**. Cette incorporation massive étant principalement obtenue par synthèse *de novo* **(Dietschy *et al.*, 2001)**. Les neurones acquièrent le cholestérol dont ils ont besoin par les astrocytes et les oligodendrocytes **(Björkhem & Meaney, 2004). (Leoni & Caccia, 2013a)**. De plus, grâce à leur fonction phagocytaire, les cellules gliales peuvent recycler le cholestérol des cellules dégénérescentes **(Jurevics *et al.*, 1995).**

Des études controversées suggèrent que le traitement par certains agents hypocholestérolémiants de type statines permettrait de diminuer le risque de certaines pathologies neurodégénératives. Cette famille de composés réduit l'assemblage et le transport des lipoprotéines et augmente l'activité des récepteurs hépatocytaires afin de capturer le cholestérol dans le foie et diminuer la concentration de cholestérol et de triglycérides circulants **(Wolozin, 2004).**

Dives résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* ont montré l'importance de l'homéostasie membranaire du cholestérol et suggèrent un rôle clef de la composition et des caractéristiques membranaires dans la production, l'agrégation et la neurotoxicité du peptide Aß. **Sparks *et al.* (1994)** ont été les premiers à évoquer un lien entre une alimentation riche en cholestérol et la présence de dépôts amyloïdes. Ils ont montré une augmentation de l'intensité des dépôts intracellulaires de peptides amyloïdes dans les neurones d'hippocampe de lapins nourris avec une alimentation riche en cholestérol. D'autre analyses réalisées *in vivo* sur des souris transgéniques de MA ont montré une diminution de l'accumulation du peptide Aß après traitement par des statines **(Sparks *et al.*, 2000)**. Cette diminution pourrait être due à une modification du clivage de l'APP. En effet, une diminution du clivage par l'α-sécrétase a été observée en traitant des cellules avec des taux élevés de cholestérol **(Bodovitz *et al.*, 1996)** alors qu'une diminution du niveau de cholestérol membranaire favorise la voie non amyloïdogène et conduit à une diminution de l'activité ß-sécrétase **(Kojro *et al.*, 2001).**

L'hydroxylation du cholestérol permet d'accélérer son passage à travers la membrane plasmique et constitue la voie majeure pour le transport du cholestérol, son élimination et son homéostasie au niveau cérébral. En effet, l'excès de cholestérol est converti en 24S-hydroxycholesterol (24OHC) et cette réaction est effectuée par la 24*S*-hydroxylase (CYP46), une enzyme de la famille des cytochromes P-450, et constitue la voie majoritaire d'élimination du cholestérol (**Leoni & Caccia, 2013b).** Un autre métabolite détectable dans le

cerveau est le 27*S*-hydroxystérol (27OHC) capable de traverser la BHE et issu de la conversion du cholestérol par la 27*S*-hydroxylase **(Lund *et al.*, 2003).** Le 24*S*-hydroxycholestérol pourrait constituer un marqueur précoce des perturbations du métabolisme cérébral du cholestérol associées à la MA. En effet, lors des stades précoces de celle-ci, la concentration de 24*S*-hydroxycholestérol dans le LCR et dans la circulation sanguine est plus élevée, ce qui est en accord avec l'hypothèse que les dégâts neuronaux pourraient être associés à un plus haut renouvellement des membranes neuronales, fournissant ainsi des niveaux plus hauts de cholestérol qui seront converti en 24OHC **(Hughes *et al.*, 2012; Zuliani *et al.*, 2011, Kolsch *et al.*, 2004).** À des stades plus tardifs, la concentration de 24OHC circulant dans le sang et le LCR chute, ce qui suggère une diminution du métabolisme du cholestérol **(Kolsch *et al.*, 2004).** La réduction du taux du 24OHC a été corrélée à la sévérité de la démence et le dégré d'atrophie cérébrale **(Solomon *et al.*, 2009**).

Dans les cellules neuronales humaines SH-SY5Y, l'augmentation du taux de 27OHC a été associé à une augmentation du niveau d'expression de protéines APP, β-sécrétase et Aß42, tandis qu'avec le 24OHC le niveau d'Aß42 reste inchangé associé à une augmentation de sAPP suggérant que 24OHC facilitent le clivage de l'APP selon la voie non amyloidogénique **(Prasanthi *et al.*, 2009).** Par ailleurs, l'étude des souris CYP46A1$^{-/-}$ a montré des déficiences sévères dans leur comportement spatiaux, associatifs et moteur **(Kotti *et al.*, 2006).** L'étude de **Heverin *et al.* (2004)** a montré que le taux du 27OHC a augmenté de 40-80 % dans le cortex temporel, pariétal et occipital de malades atteints par la MA comparé avec le taux chez le groupe contrôle. Dans les mêmes échantillons, une diminution de 20% du taux de 24OHC a été observée**.** Cette augmentation était de 4 fois au niveau des cerveaux de patients portant la mutation Suédoise APP670/671 **(Shafaati *et al.*, 2011).**

En raison de sa structure, le cholestérol est sensible à l'auto-oxydation suite à une attaque par des radicaux peroxydes et en particulier au niveau de la position C7 **(Iuliano, 2011).** Les principaux produits de cette oxydation sont des dérivés du cholestérol oxydés en C-7 incluant des cholestérol-7-hydroxyperoxides ; ces derniers peuvent conduire à la production de 7-cétocholestérol et de 7ß- hydroxycholestérol **(Vejux *et al* ., 2011).** Un effet pro-apoptotique, pro-oxydant et/ou pro-inflammatoire a été rapporté suite à un traitement de cellules vasculaires, neuronales et oligodendrocytaires avec les dérivés oxygénés du cholestérol en C7 et en particulier avec le 7-cétocholestérol **(Vejux *et al.*, 2008; Vejux & Lizard, 2009)**. Ces dérivés du cholestérol oxydés en C7 pourraient contribuer à la physiopathologie de la MA **(Vaya & Schipper, 2007)**.

1.2. Acides gras et neurodégénéréscence

1.2.1 Acides gras, structure et métabolisme

La principale unité structurale des lipides est constituée par les acides gras (AG) qui sont formés d'une chaîne d'atomes de carbone, d'un groupement carboxyle (COOH) et d'un groupement méthyl (CH3) aux extrémités terminales. Les AG servent de substrat énergétique, stockés sous forme de triglycérides. Ils sont également des constituants majeurs de la bicouche lipidique des membranes cellulaires au sein d'un glycérophospholipide ou d'un sphingolipide **(Arterburn *et al.*, 2006)**. Les AG participent enfin à la formation des esters de cholestérol **(Johnson *et al.*, 2006)**. Ils se subdivisent, selon qu'ils contiennent ou non des doubles liaisons, en AG saturés (AGS), et en AG insaturés (AGI), eux-mêmes répartis, selon le nombre d'insaturations, en 2 sous groupes ; les acides gras mono-insaturés (AGM) et les acides gras poly-insaturés (AGPI) (**Savary *et al.*, 2012**).

1.2.1.1 Les acides gras saturés

Ces AG possèdent une liaison simple entre les atomes de carbones. Une graisse "saturée" est celle qui contient une quantité significative d'AGS. Les graisses les plus saturées sont solides ou semi-solides à température ambiante. Les exceptions sont les huiles tropicales : huile de palme, huile de noix de palme et huile de noix de coco. Ces AGS sont trouvés dans la viande, des produits laitiers et dans quelques huiles tropicales et sont impliqués dans l'augmentation du risque des maladies coronariennes, le diabète et l'obésité **(Simopoulos & Robinson, 1998).**

1.2.1.2 Les acides gras mono-insaturés

Ces AG possèdent une seule double liaison dans la chaîne carbonée. L'acide oléique, composant prédominant de l'huile d'olive, représente l'acide gras mono-insaturé (AGMI) majoritaire de notre régime alimentaire. L'huile d'olive et l'huile de canola contiennent respectivement 80% et 70% d'AGMI. Les huiles mono-insaturées sont liquides à température ambiante, mais peuvent être semi-solide à faible température. Ces AGMI protègent le système cardio-vasculaire, ils réduisent aussi le risque de certains troubles métaboliques tels que la résistance à l'insuline et le diabète ; leur consommation est associée avec une faible fréquence de cancers **(Simopoulos & Robinson, 1998). Roche *et al.* (1998)** ont montré les effets avantageux de l'huile d'olive et ont démontré que la substitution d'AGMI par des AGS réduit le cholestérol plasmatique.

1.2.1.3 Les acides gras polyinsaturés

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les acides gras qui ont deux ou plusieurs doubles liaisons. Toutes les huiles polyinsaturées sont liquides à température ambiante et restent liquides à faible température. L'huile de lin et l'huile de poisson sont les huiles les plus riches en AGPI **(Simopoulos & Robinson, 1998).** La plupart des vertébrés sont capables de synthétiser les AGS ou les AGMI, mais ils ne peuvent pas produire les AGPI.

Les AGPI se subdivisent en trois familles : oméga-3 (n-3), oméga-6 (n-6) et oméga-9 (n-9) définies, selon que la première de leur double liaison est située au $3^{ième}$ au $6^{ième}$ ou au $9^{ième}$ carbone à partir du groupement méthyl terminal. Les AGPI à longue chaîne peuvent être obtenus par la voie de biosynthèse, à partir de l'acide linoléique (LA, C18:2 n-6) et de l'acide alpha linolénique (ALA, C18:3 n-3). Les mammifères ne possèdent pas les enzymes nécessaires à la synthèse de l'ALA et du LA (Δ12 et Δ15 désaturase), de sorte que les deux AGPI initiateurs de la chaîne de biosynthèse sont essentiels et doivent obligatoirement être fournis par l'alimentation. Ces deux acides gras peuvent être synthétisés par les plantes qui représentent donc la meilleure source d'apport. Par une succession de désaturations et d'élongations, l'ALA et le LA sont métabolisés en AGPI à 20 et 22 carbones. Les métabolites les plus importants sont l'acide arachidonique (AA, C20:4 n-6) pour le LA, l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) pour l'ALA (**Figure 7**).

L'AA (C20:4 n-6) est synthétisé à partir du LA et il est principalement intégré dans les phospholipides membranaires. L'AA est libéré des phospholipides membranaires suite à l'activation de phospholipases et en particulier de phospholipase A2. Cet AG ainsi libéré peut être oxydé selon trois voies métaboliques principales ; la première voie est la voie des cyclooxygénases (COX). Cette voie conduit à la synthèse des prostaglandines, des thromboxanes et des prostacyclines qui sont des molécules pro-inflammatoires. Cette voie fait intervenir deux types d'enzymes : la cyclooxygénase 1 et la cyclooxygénase 2. La deuxième voie met en jeu diverses enzymes dont la 5- lipooxygénase (LOX) pour produire les leucotriènes **(DuBois *et al.*, 1998)** ayant notamment la capacité d'induire une augmentation de la production de TNF-α et d'interleukines pro-inflammatoires (IL-1 et IL-6). La troisième voie fait intervenir le cytochrome P450 et conduit à la production de l'acide epoxyeicosatriénoïque et de l'acide hydroxyeicosatetraénoïque **(Calder, 2005; Calder, 2006).** L'EPA (C20:5 n-3) est synthétisé à partir de l'ALA. Comme l'AA, il est intégré dans les phospholipides membranaires et il est libéré par des phospholipases. L'EPA libéré est alors

dirigé vers les mêmes voies d'oxydation que l'AA. Ces deux AGPI entrent en compétition. L'oxydation de l'EPA conduit à la formation des le thromboxane A3, de prostacycline PGI3, de prostaglandine E3 et de leucotriène B5. Ces eicosanoïdes possèdent une faible activité inflammatoire **(Calder, 2005; Calder, 2006).**

Le DHA est synthétisé à partir de l'ALA par β-oxydation peroxysomale **(Ferdinandusse *et al.*, 2001)**. Il est ensuite incorporé dans les membranes cellulaires sous forme de phospholipides. Il est incorporé dans les phopholipides membranaires à partir desquelles il peut être libéré par l'action des phospholipases. Le DHA libéré est alors transformé (comme l'AA et l'EPA) par les COX et les LOX. L'oxydation du DHA *via* ces deux voies conduit à la formation de docosanoïdes de la série D-résolvines (docosatriènes, neuroprotectines…) **(Lukiw & Bazan, 2006; Lukiw & Bazan, 2008; Bazan, 2009)**. Ces molécules ont une forte capacité anti-inflammatoire, neuroprotectrice et peuvent réguler la production de l'IL-1β par leur action sur le facteur NFkB **(Hong *et al.*, 2003; Calder, 2005).**

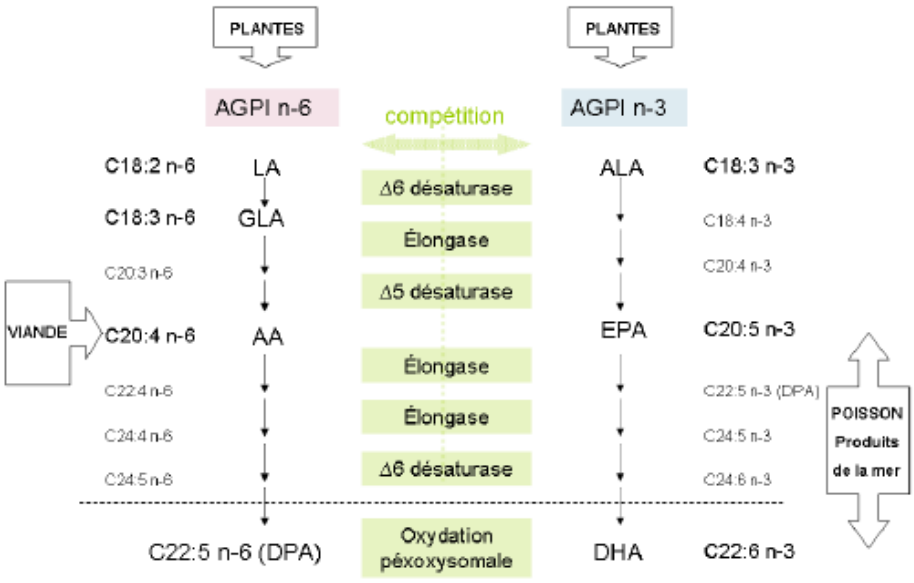


Figure 7: ***Voies de biosynthèse des AGPI n-3 et des AGPI n-6 (Innis, 2008)***

L'acide eicosapentaenoique (EPA) et l'acide docosahexaenoique (DHA) sont les principaux acide gras plyinsaturés (AGPI) de la famille des n-3. Ce sont des derivés de leur précurseur, l'acide α-linolénique (ALA). La conversion de l'ALA, acide gras indispensable en EPA et DHA s'effectue lentement avec un taux de conversion faible, ce qui rend indispensable leur consommation directe dans l'alimentation (poisson, produits de la mer). L'acide arachidonique (AA) est le principal AGPI de la famille des n-6. Il est dérivé de son

précurseur l'acide linoléique (LA). En cas de carence en n-3, un AGPI n-6, l'acide docosapentaenoique (DPA) est sytnétisé pour remplacer le DHA. Les AGPI sont synthétisés par une succession d'élongations et de déstaurations. La β*-oxydation peroxisomale est impliquée dans l'étape finale de synthèse des AGPI à 22 carbones. La* Δ*6-desaturase et la* Δ*5-desaturase sont les enzymes clefs du métabolisme des AGPI.*

1.2.1.4 Les acides gras trans

Les configurations cis et trans décrivent les organisations typiques d'atomes d'hydrogène ou de groupes attachés aux atomes de carbone impliqués dans les doubles liaisons. Dans la configuration cis, ils sont localisés du même côté du plan contenant la double liaison carbone-carbone. Pendant le processus d'hydrogénation, un atome d'hydrogène se déplace du côté opposé du plan contenant la liaison double. Cette nouvelle configuration est nommée trans.

Dans la nature, la majorité des AGI sont de configuration cis. Cependant, dans l'alimentation il y a des AG de configuration trans (AGT) ce qui change la structure dans l'espace, les propriétés physicochimiques, mais aussi le métabolisme et l'impact de ces AG sur différentes fonctions cellulaires et physiologiques. Par ailleurs, les AGPI sont le plus souvent de type « méthylène interrompu », ce qui signifie que les doubles liaisons sont séparées par un groupement CH_2.

Les AGT alimentaires ont principalement deux origines. La première est une origine naturelle. Dans ce cas, les AGT résultent de la biohydrogénation ruminale des acides gras polyinsaturés ingérés par les ruminants et se retrouvent principalement dans les aliments tels que le lait et les produits dérivés et dans la viande de ruminant **(Ledoux *et al.*, 2005).** Dans ce cas, les isomères trans proviennent de l'hydrogénation partielle des AGPI catalysée par les enzymes des bactéries du rumen des animaux. Il s'agit essentiellement d'acides gras trans monoinsaturés (C18:1t et C16:1t) qui diffèrent entre eux par la position de la double liaison trans (isomères de position). Les teneurs varient avec l'alimentation des animaux **(Roy *et al.*, 2006).**

La seconde origine est technologique. L'industrie des corps gras réalise des hydrogénations catalytiques partielles, dont les objectifs sont de transformer les propriétés physicochimiques d'huiles d'origine notamment végétale **(Gerber *et al.*, 2007).** Ce procédé vise à augmenter les points de fusion ou à accroître la stabilité à l'oxydation des huiles de départ. Les isomères C18:1 9t et C18:1 10t sont caractéristiques des matières grasses végétales partiellement hydrogénées alors que le C18:1 11t est représentatif des matières

grasses d'animaux ruminants. Les AGT peuvent provenir aussi des huiles ayant été portées à des températures élevées.

Par ailleurs, il existe des AG dits conjugués, sans groupement CH_2 entre les insaturations c'est à dire leurs doubles liaisons sont séparées par une seule simple liaison (au lieu de deux) dans les AGPI natifs. Un intérêt particulier a été porté à ces AG conjugués, en particulier les isomères conjugués de l'acide linoléique (ou CLA pour « conjugated linoleic acid »).

1.2.2. Les AGPI, molécules essentielles du système nerveux central

Au cours du dernier trimestre de la vie embryonnaire et des 2 premières années de l'enfance, le cerveau subit une croissance rapide nécessitant l'apport ou la synthèse de nombreux nutriments parmi lesquels les AGPI et en particulier le DHA. Les AGPI représentent environ 35% du contenu lipidique du cerveau et sont concentrés dans les membranes des neurones et des cellules de la rétine où ils assurent le maintien de l'intégrité et de la structure membranaire. Une diminution de l'acuité visuelle a été observée *in vivo* chez des rats et des primates dont l'alimentation est appauvrie en DHA **(Benolken *et al.*, 1973)**. Il en est de même chez les nourrissons, en particulier chez les enfants prématurés carencés en AGPI n-3. Les symptômes observés étant réversibles par supplémentation nutritionnelle **(Carrie *et al.*, 2000 ; Gamoh *et al.*, 2001** ; **Ikemoto *et al.*, 2001** , **Uauy *et al.*, 2003)**. Les travaux de **Birch *et al*. (1992)** et ceux d'**Uauy *et al.* (2003)** suggèrent qu'une supplémentation en AGPI durant l'enfance permettrait l'acquisition d'une acuité visuelle et de capacités cognitives supérieures **(Mccann *et al.*, 2005).** Toutefois, les premiers essais de supplémentation des nourrissons présentent des résultats contradictoires. La structure cérébrale analysée par imagerie RMN n'a montré aucune différence entre les nourrissons supplémentés en DHA et en AA et ceux nourris avec une alimentation classique **(Van Wezel-Meijler *et al.*, 2002).**

Le déficit en AGPI et plus particulièrement en DHA, est impliqué dans des troubles tels que la schizophrénie, l'hyperactivité ou la dépression, ainsi que dans la MA **(Kalmijn *et al.*, 2004).** En fait, des travaux épidémiologiques ont confirmé ces observations. Au sein d'une cohorte de personnes âgées, la teneur membranaire en AGPI n-3 dans les érythrocytes ainsi que la consommation d'AGPI n-3 sont inversement corrélées au déclin cognitif associé à l'âge **(Heude *et al.*, 2003; Solfrizzi *et al.*, 2006 ; Beydoun *et al.*, 2007)** tandis que la consommation de compléments alimentaires d'huile de poisson associée à un taux élevé

d'AGPI n-3 dans les érythrocytes sont liés à de meilleures performances cognitives chez les sujets âgés (**Whalley *et al*., 2004**).

Le maintien d'un niveau optimal d'AGPI dans les membranes pourrait donc présenter un intérêt préventif. De ce fait, une supplémentation en AGPI a été proposée pour prévenir les troubles de comportement et les pertes cognitives associées à certaines maladies neurodégénératives.

L'implication potentielle des AG dans la MA est confortée par l'utilisation de modèles animaux. Un certain nombre d'études a été réalisé par l'équipe de Cole **(Calon *et al*., 2005 ; Calon *et al*., 2004 ; Lim *et al*., 2005 ; Calon & Cole, 2007)**. Le modèle utilisé était celui de la souris transgénique Tg2576 qui surexprime le gène humain APPswe, donc l'Aβ humaine. Des régimes alimentaires déficients en AGPI n-3, ou déficients en AGPI n-3 et supplémentés en DHA, *vs* un régime standard ont été administrés. Les zones cérébrales d'intérêt étaient le cortex et l'hippocampe connues pour être impliquées dans la MA. Les principaux résultats ont montré, dans le cortex frontal des animaux soumis au régime déficient, un déficit en DHA et une augmentation des AGPI n-6 amplifiés chez les souris transgéniques par rapport aux animaux non transgéniques. Le régime déficient a induit également une perte massive de marqueurs post-synaptiques sans modification de marqueurs pré-synaptiques, plus importante chez les animaux transgéniques que chez les sauvages et a potentialisé l'activation des caspases chez les animaux transgéniques; cet effet a été partiellement corrigé par la supplémentation en DHA. Au total, l'ensemble de ces résultats est en faveur d'une augmentation de la vulnérabilité à la MA en cas de déficience en AGPI n-3. D'autres travaux **(Oksman *et al.*, 2006 ; Hooijmans *et al.*, 2007)** ont été effectués sur la souris transgénique APPswe/PS1ΔE9 qui exprime la préséniline humaine. La première étude epérimentale visait à étudier les effets du rapport n-6/n-3 dans le régime alimentaire sur l'accumulation cérébrale d'Aβ. Le régime était soit standard, soit enrichi en AGPI n-6, soit enrichi en AGPI n-3. Ces études ont montré que le régime enrichi en AGPI n-3 induisait une diminution de l'Aβ hippocampique, en accord avec les travaux de **Lim *et al.* (2005)**. En ce qui concerne la charge en plaques, une diminution a été observée (**Lim *et al*., 2005)**. Le régime enrichi en DHA était aussi capable de diminuer l'activation microgliale, marqueur de la neuroinflammation, sans effet sur la mémoire spatiale. Une étude a aussi été réalisée sur des souris transgéniques 3xTg-AD, qui surexpriment les protéines Aβ et Tau humaines **(Green *et al.*, 2007)**, où quatre régimes alimentaires ont été utilisés : un régime enrichi en AGPI (acide gras n-6), un régime enrichi en DHA (acide gras n-3), un régime enrichi en DHA+DPA (à la fois en acide gras n-3

et n-6), et un régime enrichi en DHA+AA (à la fois en acide gras n-3 et n-6). La suplémentation en DHA réduisait l'accumulation de l'Aβ soluble et intraneuronal ainsi que la quantité de la protéine Tau dans l'hippocampe. Les effets sur la réduction d'Aβ étaient atténués pour les régimes enrichis en DHA + (AA ou DPA) par rapport au régime DHA seul. Il semblait aussi que la présence de DPA dans le régime ait un effet réducteur important sur la phosphorylation de la protéine Tau. Les auteurs concluaient qu'une supplémentation combinée de DHA + DPA pourrait avoir un intérêt thérapeutique.

Multiples hypothèses ont été élaborées pour expliquer les effets protecteurs des AGPI n-3. Ces effets sont potentiellement liés à la capacité des AGPI n-3 à agir en tant que molécules neuroprotectrices qui peuvent assurer la survie des cellules. Différentes voies de neuroprotection ont été proposées. Tout d'abord, **Lukiw *et al.* (2005)** ont montré que la NPD1 issue du DHA par la 15-lipoxygénase (15-LOX) réduit l'apoptose des cellules en présence de l'Aβ42. Ils ont également montré que les cellules traitées par NPD1 et DHA ont des niveaux d'expression plus élevés des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques de la superfamille Bcl-2. En outre, **Akbar *et al.* (2005)** et **Florent *et al.* (2006)** ont montré que le DHA augmente la concentration de la phosphatidylsérine, qui contribue à l'inhibition de l'activité caspase-3 conduisant à une augmentation de la survie cellulaire. Enfin, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) a été associé à l'augmentation de la survie des cellules. **Rao *et al.* (2007)** ont constaté que les niveaux de BDNF baissent dans le cerveau suite à la privation les rats d'un apport en AGPI n-3. Un autre mécanisme potentiel a été proposé : les AGPI auraient la capacité de modifier la composition, le contenu en cholestérol et la structure des micro-domaines (ou radeaux lipidiques) et peuvent par cela influencer la fluidité membranaire et affecter le processus de clivage de l'APP.

1.2.3 Acides gras polyinsaturés et modulation de la fluidité membranaire

La fluidité membranaire caractérise l'état physicochimique de la bicouche lipidique qui constitue les membranes cellulaires. Les échanges entre les milieux intra- et extracellulaires exigent une membrane cellulaire ni trop rigide, ni trop fluide **(Janmey & Kinnunen, 2006).** Le degré de fluidité membranaire est modulé par les AGPI provenant de l'alimentation et qui s'incorporent dans les phospholipides membranaires ainsi que par le cholestérol. La fluidité membranaire dépend du taux d'insaturation des AGPI incorporés dans les phospholipides membranaires. L'AA, l'EPA et le DHA sont de puissants modulateurs de la fluidité membranaire **(Yehuda *et al.*, 2002).**

Des modifications de l'alimentation conduisent à des changements visibles à plus ou moins long terme. L'apport en DHA (10 mg/jour) pendant 8 semaines chez des rats adultes (20-22 mois) induisait une augmentation de la concentration en DHA dans les tissus cérébraux **(Little *et al.*, 2007)**. Une étude menée chez des rats carencés en AGPI n-3 a étudié la cinétique d'incorporation du DHA dans différents tissus : plasmatique, cérébral, rétinien et hépatique **(Moriguchi *et al.*, 2001).** Au niveau cérébral, après deux semaines d'apport en AGPI n-3, les rats présentaient une augmentation de 35% de la teneur en DHA. Une modification complète était retrouvée après 8 semaines de traitement pour le cerveau et la rétine. En ce qui concernait le plasma, une augmentation de 100 % de la teneur en DHA était obtenue après deux semaines d'apport en AGPI n-3. Il était également décrit qu'au niveau cérébral, les variations de la composition en AGPI contenus dans les phospholipides dépendaient essentiellement de l'apport en acides gras libres et de réactions d'estérification et de désestérifications. Seul 4% des phospholipides cérébraux proviennaient des phospholipides plasmatiques **(Rapoport, 2003).** Selon **Xiao & Li, (1999)** et **Young *et al.* (2000),** l'application d'AGPI (EPA, DHA) sur des coupes d'hippocampe conduisait à moduler l'excitabilité neuronale.

La modification de la fluidité membranaire par la fraction d'acides gras libres ou encore par un changement de la composition en phospholipides peut conduire à des changements fonctionnels de protéines telles que les enzymes, les récepteurs ou les canaux ioniques. Ceci pourrait s'expliquer par une modification des interactions protéiques, une modification de la conformation des protéines transmembranaires ou une modification de l'accessibilité des sites de liaisons des substrats **(Fernstrom, 1999; Yehuda *et al.*, 2002).**

2. Stress oxydatif et Alzheimer

2.1 Stress oxydatif : rappel

2.1.1 Génération du stress oxydatif et systèmes de défense

L'exécution des certaines réactions enzymatiques, au sein de la cellule et notamment au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraine une génération de radicaux libres. Des radicaux libres sont également produits au cours de la synthèse de molécules suite à diverses réactions biochimiques pouvant ou non faire intervenir différentes enzymes (xanthine oxidase, NADPH-oxidases, '*nitrous oxide synthases*' inductibles (iNOS), …).

Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atome ou molécule) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié). Cette propriété les rend

aptes à réagir avec différentes molécules. La production de ces espèces pro-oxydantes est normale et s'accompagne d'un rôle physiologique important. Du fait de leur haute réactivité, ils peuvent réguler le phénomène d'apoptose, en entraînant la mort de cellules évoluant par exemple vers un état cancéreux. Ils activent des facteurs de transcription, eux-mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (phagocytose). Ils modulent encore l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes anti-oxydantes.

Notons que parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) sont peu réactifs comparativement aux radicaux péroxyls ($ROO^{\cdot}$) et surtout au radical hydroxyl ($HO^{\cdot}$) qui le sont extrêmement avec la plupart des molécules des tissus vivants. D'autres espèces dérivées dites espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des espèces radicalaires, mais sont aussi très réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

Pour assurer leur équilibre RedOx, les cellules doivent maintenir l'équilibre entre la production des ERO et les défenses anti-radicalaires pour éviter l'altération des macromolécules cellulaires. Plusieurs études ont montré que les défenses anti-oxydantes de l'organisme semblent contrôler le niveau des ERO plutôt que de les éliminer complètement (**D'Autréaux & Toledano, 2007**). Le déséquilibre entre la production des ERO et leur élimination, que ce soit par un déficit en antioxydants ou par une surproduction importante de radicaux libres entraine l'apparition du stress oxydant. Ce stress pourrait entraîner des dommages aux macromolécules cellulaires. Ces dommages constituent un élément majeur dans le processus de vieillissement (**Harman, 1956**)

Pour se protéger contre le développement et la propagation du stress oxydant dans tous les compartiments, la cellule met en œuvre divers mécanismes de défense. Le premier moyen consiste à utiliser des molécules anti-oxydantes de faibles poids moléculaires ou des enzymes anti-oxydantes pour capter ou neutraliser rapidement les radicaux. Les principales molécules anti-oxydantes utilisées par les cellules sont la vitamine C (ascorbate), la vitamine E (ou α-tocophérol) et le glutathion réduit (GSH) (**Halliwe11 & Gutteridge, 1999).** La vitamine C permet de neutraliser l'anion superoxyde. La vitamine E neutralise les radicaux peroxydes et c'est probablement le plus important inhibiteur de la formation de peroxydes lipidiques. Le GSH permet de métaboliser le peroxyde d'hydrogène. Certains transporteurs d'électrons

peuvent intervenir pour diminuer l'ampleur des ERO tel que le cytochrome c qui peut être réduit par les anions superoxydes en régénérant l'oxygène. Le cytochrome c réduit peut ensuite transférer des électrons au Complexe IV de la chaine de transport d'électrons et servir à la production de l'ATP **(Turrens, 2003**). Ces outils de défense sont renforcés par l'activité d'une variété d'enzymes antioxydantes. Ces enzymes sont localisées dans différents compartiments cellulaires, incluant les mitochondries (superoxydes dismutases (SOD1 et SOD2) contenant respectivement du manganèse et du cuivre, glutathion peroxydase (GPx), thioredoxine réductase), les peroxysomes (catalase), les microsomes (cytochrome P450) et le cytosol (SOD1, thioredoxine réductase).

Les SOD, des métalloprotéines dont le site actif contient du cuivre, du zinc, du manganèse, du fer ou du nickel, favorisent la dismutation spontanée de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^{+} \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène formé peut être à son tour éliminé par la catalase et la GPx :

La CAT, une enzyme héminique composée de quatre chaînes polypeptidiques, présente exclusivement dans les peroxysomes, transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire et prévient la formation du radical hydroxyle, hautement réactif et dangereux **(Kehrer, 2000).**

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} O_2 + 2\,H_2O_2$$

La GPx, sélénium dépendante, possède une forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène et catalyse sa dégradation en eau et en glutathion oxydé, en utilisant le GSH **(Marin-Garcia, 2005**).

$$H_2O_2 + 2\,GSH \xrightarrow{\text{GPx}} 2\,H_2O_2 + GSSG$$

La glutathion réductase (GR) associée au NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) permet la régénération du GSH.

$$GSSG + NADPH \xrightarrow{\text{GR}} 2\,GSH + NADP^{+}$$

2.1.2 Dommages cellulaires induits par le stress oxydatif

Lorsque les antioxydants et les enzymes antioxydantes ne réussissent pas à neutraliser les ERO, divers dommages peuvent affecter toutes les composantes de la cellule. Ces dommages liés au stress oxydant se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation des protéines **(Davies, 2003),** des lipides **(Durand *et al.*, 2005**), de l'ADN (**Cooke et al ,2003**) et des ARN (**Markesbery & Lovell, 2007**). Ces dommages peuvent parfois mener à la mort cellulaire **(Klaunig & Kamendulis, 2007)**. Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyle ($ROO^{\bullet}$). Cette réaction forme une réaction en chaîne car le radical peroxyle formé se transforme en peroxyde (R-O-O-R') au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer *et al.*, 1992**). Le radical peroxyle, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différentes aldéhydes toxiques dont le malonaldialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonenal (4-HNE) (**Favier, 2003**). Les protéines cellulaires subissent au cours d'un stress oxydant deux catégories de réactions d'oxydation : une qui rompt les liaisons peptidiques et les modifie et l'autre qui modifie les peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique. De telles modifications conduisent à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées d'où le bouleversement du fonctionnement cellulaire (**Levine, 2002**). L'ADN nucléaire ou mitochondriale peuvent être aussi la cible de l'oxydation qui peut créer un grand nombre de dommages, à savoir l'oxydation de la guanine conduisant à la formation d'oxoguanine, des cassures des brins d'ADN, la dégradation du désoxyribose ou la formation d'adduits de l'ADN (**Cadet, 1999 ; Marnett, 1999**).

2.2 Implication du stress oxydatif dans la physiopathologie de maladie d'Alzheimer

Les radicaux libres sont des agents délétères puissants qui causent la mort cellulaire et des dégâts irréversibles. Il semble que ces radicaux modifient 10 000 bases d'ADN chaque jour. Il semble que les neurones soient particulièrement vulnérables à l'attaque par les radicaux libres pour de multiples raisons ; leur faible contenu en GSH, la richesse de leur membrane en AGPI et la nécessité de quantités importantes d'oxygène pour le métabolisme cérébral.

Diverses études suggèrent que le stress oxydatif est l'événement déclencheur de la MA. Le fait que l'âge soit le premier facteur de risque de cette démence renforce cette hypothèse du fait que les dégâts causés par les ERO peuvent s'accumuler au fil des années.

Beaucoup d'études ont fourni des arguments en faveurdes conséquences délétères causées par le stress oxydatif sur les cibles cellulaires dans la MA. L'oxydation de l'ADN mitochondrial, et dans une moindre mesure, de l'ADN nucléaire, a été observée dans le cortex pariétal de patients atteints ou non de la MA. De même, l'oxydation des protéines a été observée da façon très marquée au niveau des régions cérébrales présentant des altérations histopathologiques sévères. Une augmentation de la peroxydation lipidique a été remarquée au niveau du lobe temporal des patients Alzheimer où les altérations histopathologiques sont considérables.

Il a été suggéré que la peroxydation est reliée au génotype de l'ApoE. Les sujets portants l'allèle ε4 sont plus susceptibles à cette atteinte. De plus, plusieurs études ont identifié dans les cerveaux de patients Alzheimer, et en particulier au niveau des DNF, des produits de la peroxydation lipidique à savoir le malondialdéhyde, le péroxynitrite, les carbonyles et les AGEs (advanced glycosylation end products) **(Christen, 2000).**

Il a été montré que le 4-HNE est trouvé à des taux importants chez les patients Alzheimer, et qu'il est toxique sur des cellules de l'hippocampe en culture. La grande réactivité de cet aldéhyde pourrait causer la mort cellulaire en altérant les ATPases impliquées dans le transfert ionique et dans l'homéostasie calcique (**Markesbery, 1997**). Les produits de la peroxydation lipidique sont capables de se lier de façon covalente aux protéines et de former des adduits avec les résidus cystéine, lysine et histidine.

De plus, les radicaux hydropéroxydes peuvent subir une endocyclisation pour produire des esters d'AG. Deux classes de ces AG cycliques sont formés ; les iso-poprostanes et les neuroprostanes **(Morrow *et al.*, 1992; Musiek *et al.*, 2005)**. F2-iso- prostanes (F2-IsoPs) est le produit de la peroxydation de l'AA alors que le F4-neuroprostanes (F4- NPs) est le produit de l'oxydation du DHA. Des concentrations élevées de F2-IsoPs ont été observes dans le LCR des patients Alzheimer **(Montine *et al.*, 1998).**

La peroxydation des lipides membranaires peut avoir différentes effets à savoir, l'augmentation de la rigidité de la membrane, la diminution de l'activité des enzymes ancrées

à la surface (pompe à soduim), une altération de l'activité des récepteurs membranaires et de la perméabilité **(Yehuda *et al.*, 2002; Anzai *et al.*, 1999)**

Une relation double existe entre l'Aβ et la production des radicaux libres. D'une part, le processus oxydatif stimule l'agrégation de l'Aβ *in vitro* et d'autre part, l'Aβ est une source de radicaux libres **(Dyrks *et al*., 1992)**

3. Implication des mitochondries

3.1 Structure et fonctionnement des mitochondries

Les mitochondries sont les seules constituantes de la cellule ayant de l'ADN (ADN mt), une machinerie de synthèse des ARN et de protéines. Toutefois, l'ADN mt ne code seulement que pour 13 protéines fondamentales pour la fonction mitochondriale et plus particulièrement pour les complexes de la chaîne respiratoire **(Taylor & Turnbull, 2005)**. Ces organites sont composés d'une membrane externe, un espace inter-membranaire, une membrane interne et une matrice. Les mitochondries ont un rôle critique dans l'homéostasie de la cellule ; elles fournissent 90% de l'énergie nécessaire à divers processus cellulaires et participent à d'autres voies métaboliques. Du point de vue morphologique, la forme et la taille des mitochondries est fortement variable. Leur morphologie est parfois contrôlée par des éléments du cytosquelette, à savoir les neurofilaments et les microtubules **(Hermann *et al.*, 1998)**. Un tiers des mitochondries est en mouvement le long des microtubules et des filaments d'actine tandis que la majorité d'entre elles sont stationnaires. Le mouvement des mitochondries et leur accumulation sont coordonnés, puisqu'elles sont transportées aux régions où la consommation d'ATP (Adénosine tri-phosphate) et la nécessité de l'énergie sont particulièrement importantes. Le nombre de mitochondries varie aussi selon l'état énergétique de la cellule.

Le pyruvate généré par la glycolyse dans le cytosol est métabolisé en acétyl coenzyme A (acétyl CoA) au niveau de la membrane interne mitochondriale. L'acétyl CoA aussi généré par la β-oxydation mitochondriale (et accessoirement peroxysomale) des acides gras est à son tour métabolisé CO_2 en via le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs) en produisant simultanément des électrons. .Les électrons sont alors transportés par étape à travers une série de complexes enzymatiques. Ces complexes sont associés aux crêtes de la membrane interne des mitochondries (face externe de la membrane interne) et assurent le maintien du gradient de proton et la formation d'ATP. En fait, il s'agit de 5 complexes enzymatiques dont chacun est formé de plusieurs sous unités protéiques à savoir NADH-ubiquinone-oxydoréductase

(Complexe I), succinate-ubiquinone-oxydoréductase (Complexe II), cytochrome C-ubiquinone oxydoréductase (Complexe III), cytochrome c-oxydase (Complexe IV) et ATP synthase (Complexe V). Les électrons sont transportés par le NADH et le $FADH_2$, respectivement aux complexes I et II qui transfèrent l'électron à l'ubisemiquinone, cette dernière l'acheminant au complexe III. L'arrivée de l'électron au complexe IV constitue la fin de la chaîne d'oxydoréduction et entraîne la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les réactions associées au passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraînent le passage d'un proton vers l'espace inter-membranaire à travers les complexes. Ce passage établit un gradient électrochimique de protons qui crée une force proton-motrice utilisée par le complexe V pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP, assurant le couplage de la chaîne des oxydoréductions avec la production d'ATP (phosphorylation oxydative).

3.2 Les altérations mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer

Les cellules nerveuses fonctionnent en aérobie et par conséquent, leur activité est dépendante de la consommation de glucose et du métabolisme oxydatif. Dans l'activité neuronale, le métabolisme du glucose et le métabolisme énergétique sont étroitement liés et concentrés dans la mitochondrie. La cellule nerveuse métabolise le glucose au niveau du cycle de Krebs et utilise la chaîne de la phosphorylation oxydative pour produire l'ATP nécessaire au fonctionnement cellulaire. L'énergie fournie sous forme d'ATP au sein de la cellule nerveuse sert globalement à alimenter les pompes ioniques nécessaires au maintien du potentiel de membrane, à permettre le transport axonal et à assurer la synthèse de macromolécules et neuromédiateurs **(Castellani *et al.*, 2002).** Peu de travaux ont été effectués sur la morphologie des mitochondries intra-neuronales dans la MA. Des déformations mitochondriales apparaissent dans les premiers stades de la MA **(Wisniewski *et al.*, 1970)**, en premier lieu dans les neurites puis autour des plaques séniles et dans la cellule autour des dégénérescences neurofibrillaires **(Johnson & Blum, 1970).** Une biopsie de cortex fronto-pariétal montre une réduction de 25% du nombre des mitochondries mais une augmentation de leur taille, ces altérations étant directement liées au taux de dommage oxydatif présent dans les neurones **(Hirai *et al.*, 2001).** Par ailleurs, la perte du transport axonal modifie la répartition des mitochondries dans les différents compartiments cellulaires de régions très diverses comme le cortex cérébral, le thalamus, le striatum, le cervelet ou le locus coeruleus **(Lin & Beal, 2006)**. Ces organites s'accumulent dans le corps cellulaire et la diminution consécutive de leur nombre et de leur taille dans les dendrites distaux contribuent à la perte

des épines et de l'arborisation dendritiques ainsi que des synapses **(Stokin *et al.*, 2005; Baloyannis, 2006**).

Dans la MA, trois enzymes-clés mitochondriales du cycle de Krebs présentent une diminution de l'activité dans les tissus nerveux prélevés en post-mortem, la pyruvate déhydrogénase servant à transformer le pyruvate en acétyl-CoA **(Yates *et al.*, 1990)**, l'α-cétoglutarate déshydrogénase dépendante de la thiamine (**Gibson *et al.*, 1988; Mastrogiacomo *et al.*, 1996)** et l'isocitrate déshydrogénase **(Bubber *et al.*, 2005)**, directement corrélée avec la sévérité du score de démence évalué préalablement chez ces patients **(Bubber *et al.*, 2005).** Le peptide Aβ pourrait être en partie responsable de ce dysfonctionnement enzymatique mitochondrial car une inhibition des activités des la pyruvate déshydrogénase et de l'α-cétoglutarate déshydrogénase est observée sur des culots de mitochondries de cerveau de rat après incubation de ceux-ci avec du peptide Aβ seul ou en association avec du monoxyde d'azote **(Casley *et al.*, 2002).**

4. Rôle potentiel du Peroxysome dans le vieillissement et la MA

4.1 Peroxysome:

Le peroxysome est présent dans toutes les cellules eucaryotes (à l'exception des érythrocytes) ainsi que dans les eucaryotes unicellulaires et les cellules végétales supérieures (**Islinger *et al.*, 2012**). Morphologiquement, ces organites sont caractérisés par une simple membrane qui délimite une matrice protéique constituée de fins granules matriciels de diamètre allant de 0.1 à 1 µm (**Schrader & Fahimi, 2008**). La taille, la forme et le nombre des peroxysomes dépendent de l'organisme et du type cellulaire. Cette différence résulte des processus de fusion, fission et multiplication que subit cet organite. En effet, le peroxysome est capable de proliférer et de se multiplier. Il est dégradé en réponse à des stimuli nutritionnels et environnementaux (**Reddy & Mannaerts 1994**). Parmi les différents organes, les peroxysomes sont plus nombreux au niveau du foie (hépatocytes) et du cerveau (astrocytes). Dans le cytoplasme, ces organites sont très dynamiques, ils se déplacent le long des microtubules chez les mammifères (**Schrader *et al.*, 2003**) et des filaments d'actines chez les plantes et levures (**Mathur *et al.*, 2002**). La biogenèse des peroxysomes est peu connue mais certains auteurs suggèrent que cet organite pourrait provenir du bourgeonnement du RE (proximité des peroxysomes et du RE avec parfois une continuité entre les deux structures observées par microscopie électronique) ou par bourgeonnement à partir de peroxysomes

préexistant. Dans ce cas, les organites primitifs importent des protéines, augmentent alors de taille et se multiplient par division (**Lazarow, 2003; Girzalsky *et al.*, 2010**). Contrairement à la mitochondrie, le peroxysome est dépourvue d'ADN. Toutes les protéines destinées aux peroxysomes sont codées par l'ADN nucléaire, synthétisées dans le cytosol par les polysomes libres et transportées après traduction au peroxysomes. L'adressage de ces protéines vers le peroxysome est réalisé en utilisant des voies d'importations spécifiques. Ces voies impliquent des protéines signal (PTS1 (peroxisomal targeting signal 1) et PTS2) identifiants les protéines péroxysomales matricielles qui seront reconnues respectivement par PEX5 (peroxin 5) et PEX7 (**Eckert & Erdmann, 2003; Rucktäschel *et al.*, 2011**). Le PEX19BS (site de liaison de PEX19) identifie la protéine peroxysomale membranaire et sera reconnu par PEX19 (http://www.peroxisomedb.org/).

4.2 Fonctions péroxysomales en relation avec le métabolisme des AGTLCs

Chez les mammifères, les peroxysomes jouent un rôle essentiel dans le développement, la morphogenèse et la différenciation. Plus de 50 enzymes participent dans différents voies métaboliques et en particulier dans le métabolisme lipidique et oxydatif (**Fransen et al, 2012**). La β-oxydation des AG et l'α-oxydation de l'acide pristanique sont les principales fonctions du peroxysome (**Wanders & Waterham, 2006**). Le peroxysome est aussi nécessaire dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) via l'activité catalase et dans la dégradation des purines, des D-acides aminés, des polyamines, des eicosanoïdes et de l'acide urique. Dans le cerveau, l'une des principales fonctions des peroxysomes est la dégradation des acides gras saturés à très longue chaîne (AGTLC) comme C24:0 et C26:0 ainsi que la participation au maintien de l'équilibre des taux de ces acides gras présents en quantité importante au niveau de la myéline (complexe lipoprotéique entourant les axones des neurones). Ces AGTLCs confèrent à la myéline sa propriété d'isolation mais leur présence en excès peut la déstabiliser (**Ho *et al.*, 1995**) et/ ou devenir toxique pour les cellules nerveuses responsables de la synthèse de la myéline (oligodendrocytes) et le soutien de l'architecture cérébrale (cellules microgliales). Une biogenèse peroxysomale ou une β-oxydation défectueuse aboutit à l'accumulation des AGTLCs dans le plasma et les tissus contribuant ainsi'à la démyélinisation (**Geillon et al ., 2012**) . Dans le cerveau de patients atteints d'X-ALD (X-linked adrenoleukodystrophy) des taux augmenté d'AGTLCs sont observés notamment dans les fractions d'esters de cholésterol, de cérébrosides, de phosphatidylcholines, de sphingomyéline et de sulfatides (**Wilson & Sargent, 1993**). La β-oxydation péroxysomale des AGTLCs est incomplète, la phase terminale de ce processus est

donc assurée par la mitochondrie. Le mécanisme est constituée de 4 étapes enzymatiques : la déshydrogénation, l'hydrations, la déshydrogénation et le clivage thiolytique libérant un acide gras plus court et un acétyl-CoA (**Wanders & Waterham, 2006**). L'AG libéré subit des cycles successifs de β-oxydation jusqu'à la formation d'un octanoyl-CoA. Les Acyl-CoA sont ensuite converties en ester de carnitine par la CAT (Carnitine Acétyl Transférase) ou par la COT (Carnitine Octanoyl Transférase), ce qui leur permet d'être exportés du peroxysome vers la mitochondrie.

La β-oxydation péroxysomale concerne aussi les AGMI, les AGPI et leurs dérivés (les eicosanoïdes et les docosanoïdes), les AG branchés (acide pristanique) et l'acide dicarboxylique, dont l'accumulation pourrait être toxique (**Wanders & Waterham**, **2006**). La dégradation des eicosanoïdes est particulièrement importante vue son implication dans des voies inflammatoire. La dernière étape de synthèse du DHA s'effectue dans le peroxysome suite à un cycle de β-oxydation du C24:6 n-3 (**Ferdinandusse *et al*., 2001**). Le DHA est l'AG le plus abondant dans le cerveau et les tissus nerveux. Il assure un rôle structural au niveau de la bicouche lipidique des membranes. En outre, il est impliqué dans la neurotransmission, la plasticité synaptique, l'expression génique, l'homéostasie calcique (**Chapkin *et al*., 2009; Salem *et al*., 2001**). Sa conversion enzymatique en résolvines, qui réduisent l'inflammation en inhibant la production des molécules inflammatoires et la migration des cellules inflammatoires au site lésionnel, en neuroprotectines et en marsenines (**Ma**crophage mediator in **res**olving **in**flammation) assure un rôle anti-inflammatoire inhibant la génération des prostaglandines, des leucotriènes et des thromboxanes (**Farooqui, 2012; Farooqui *et al.*, 2007**). La concentration cérébrale de DHA dépend de l'apport alimentaire d'AGPI n-3 et de sa synthèse au niveau du foie (**Rapoport *et al*., 2010**). Un autre rôle métabolique majeur est assuré par le peroxysome : il s'agit de la synthèse d'éthers des phospholipides (plasmalogènes) qui se déroule en 2 étapes (**Brites *et al*., 2004**). La première étape consiste à estérifier le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) avec un acyl-coA à longue chaîne grâce à l'enzyme dihydroxyacétone phosphate acyltransférase (DHAP-AT). La deuxième étape transforme l'acyl-DHAP en alkyl-DHAP grâce à l'enzyme alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase (ADHAP-S) (**Hayashi & Hara, 1997**). Le 1-alkyl-DHAP est ensuite réduit pour produire le 1-alkyl-phosphoglycérol qui sera métabolisé dans le RE. Les plasmalogènes semblent jouer des rôles dans la dynamique membranaire, la signalisation cellulaire, le métabolisme et le transport du cholestérol, la lutte contre les oxydants, le métabolisme des

acides gras polyinsaturés (AGPI) et servent de réservoir pour les second messagers (**Braverman & Moser, 2012**).

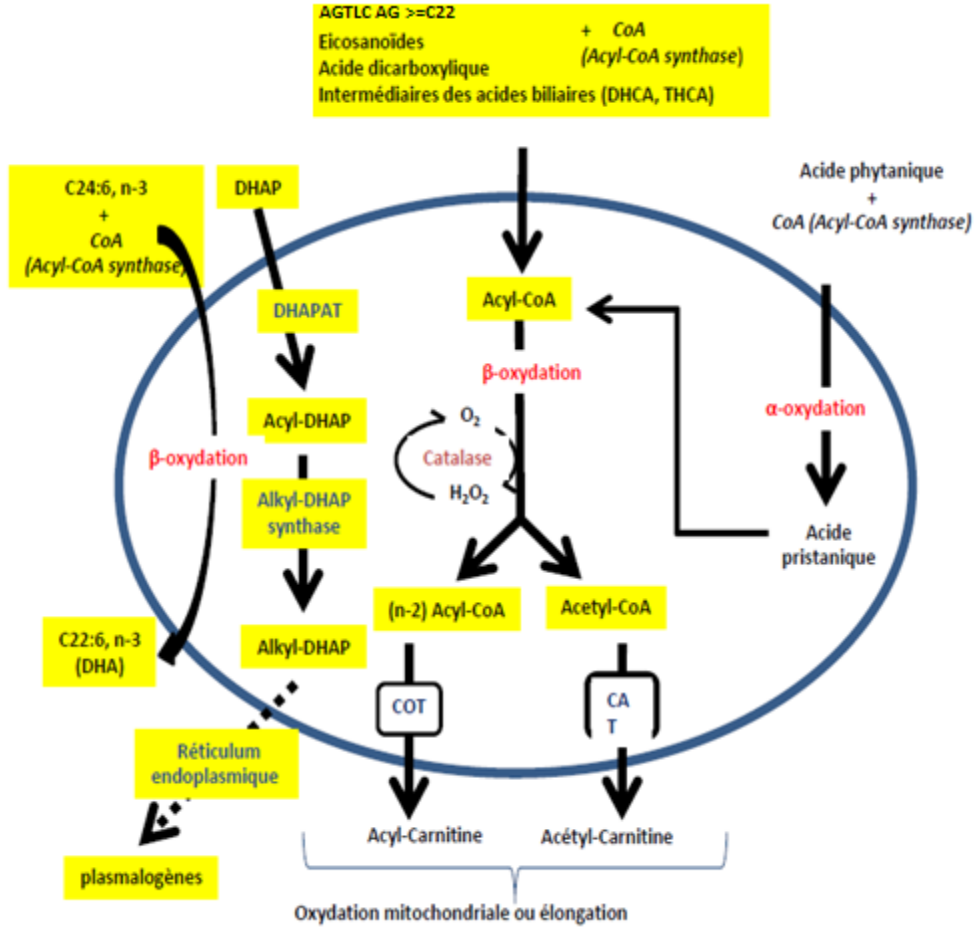


Figure 8 : ***Rôles du peroxysome (Lizard et al., 2012).***

Roles majeurs du peroxysome et voies métaboliques potentiellement affectées dans la maladie d'Alzheimer et dans les démences de type Alzheimer. Le peroxysome assure des activités métaboliques multiples ; ***la biosynthèse*** *à savoir la biosynthèse des plasmalogènes, du DHA et des acides biliaires ainsi que* ***la dégradation*** *par α-oxydation ou β-oxydation des acides gras ainsi que la dégradation des eicosanoides. Les voies métaboliques potentiellement impliquées dans le développemevt de la MA et des démences de type MA sont colorées en jaunes. CoA: coenzyme A; CAT: carnitine acetyltransferase; COT: carnitine octanoyltransferase; DHAP: dihydroxyacetone phosphate; DHAPAT: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase; DHCA: di-hydroxycholestanoic acid; AG: acide gras; THCA: tri-hydroxycholestanoic acid; AGTLC : acide gras à très longue chaîne*

4.3 Rôles du peroxysome dans le contrôle de l'équilibre RedOx et l'inflammation

En plus de leur rôle dans le métabolisme lipidique, les peroxysomes sont impliqué dans le contrôle de stress oxydatif (**Fransen *et al*, 2012**). Certaines enzymes péroxysomales comme l'Acox (acyl-CoA oxidase) ou iNOS génèrent des ERO en particulier l'$O_2^{\bullet -}$, le H_2O_2, et des ERN comme le NO (**Del Rio, 2011**). En même temps, les peroxysomes possèdent des systèmes enzymatiques qui peuvent contrecarrer le stress oxydatif à savoir la catalase, la superoxyde dismutase 1 et la glutathion S-transférase (**Del Rio, 2011**).

Le stress oxydatif peut endommager l'ADN, les protéines et les lipides au niveau des cellules neuronales. Ce déséquilibre RedOx est considéré comme élément déclencheur et/ou amplificateur de la progression des maladies neurologiques. L'altération des fonctions péroxysomales contribue à ce stress et a aussi des conséquences délétères sur la mitochondrie à savoir sur le statut RedOx, énergétique et métabolique **(Ivashchenko *et al.*, 2011; Galea *et al.*, 2012)**.

Le stress oxydatif peut être observé dans le cas de la délétion d'un allèle du gène codant pour Pex11β conduisant à des dégâts oxydatifs au niveau des acides nucléiques. Chez les souris *Pex11β* $^{+/-}$, une augmentation de la SOD_{Mn} au niveau du cervelet et du néocortex a été observée alors qu'une diminution de la catalase au niveau du néocortex des souris *Pex11β* $^{-/-}$ a été remarquée (**Ahlemeyer *et al.*, 2012**). Chez un autre model de souris Zellweger (souris *Pex13*$^{-/-}$), un stress oxydatif a été rapporté dans des neurones de cervelet en culture et au niveau des sections du cervelet (**Müller *et al.*, 2011**). Dans des oligodendrocytes murins (158N), ayant subit une inactivation d'Abcd1 et Acox1 en utilisant des SiRNAs, une surproduction des ERO et des ERN potentialisée avec les AGTLCs a été observée. Ceci s'accompagnait d'une peroxydation lipidique, d'une accululation des lipides et d'une induction de la mort des cellules (**Baarine *et al*., 2012a; Baarine *et al*., 2012b**).

La part prise par le peroxysome dans l'inflammation cytokinique a été établie dans les années 90, au niveau des lésions cérébrales de patients atteints d'adrenoleucodystrophie avec une expression accrue de cytokines proinflammatoires (IL-1, TNF-α) et ICAMs (Intercellular Adhesion Molecules) sécrétées par les astrocytes et les cellules microgliales (**Powers *et al.*, 1992; Powers, 1995**). Pour comprendre le rôle de l'inflammation dans l'X-ALD, **Paintlia *et al*.** ont étudié l'expression des cytokines inflammatoires dans différentes régions de cerveaux de patients; une augmentation de l'expression des ARNm de différentes cytokines (IL-1α, IL-2, IL-3, IL-6, TNF-α, GM-CSF), chemokines (CCL2, -4, -7, -11, -21, -22, CXCL1, CX3CL1

et SDF-2) et iNOS a été remarquée (**Paintlia *et al.*, 2003**). De même, une relation a été observée entre l'accumulation des AGTLCs, les esters de cholestérol, la sphingomyéline et l'inflammation. Des observations similaires ont été faites par **Kassman *et al.*** sur des oligodendrocytes déficients en *Pex 5 ;* il a été mis en évidence une neuroinflammation caractérisée par une augmentation des facteurs proinflammatoires comme le TNF-α, l'IL-10, et l'IFN-γ et des chémoattractants des lymphocytes (MIP-1α, MCP-1, MCP-5 et IP-10) (**Kassmann *et al.*, 2007**). Dans les modèles de souris ayant un dysfonctionnement des peroxysomes neuronaux (souris knockout *Nestin-Pex5*) ou chez les drosophiles portant une mutation de *Pex1*, une induction de l'immunité innée a été observée dans le cerveau associée à une activation des voies reliées aux réponses immunitaires : migration transendotheliale, présentation des antigènes (C1q, un composant de la voie classique du complément, est régulé positivement au niveau du corps calleux), interaction entre cytokines et récepteurs, activation de la voie de signalisation des récepteurs TNF-α, TLR2 and Cxcl-1 dans le corps calleux avant la démyélinisation (**Bottelbergs *et al.*, 2012 ; Mast *et al.*, 2011**). Dans le cerveau déficient en peroxysome, le système immunitaire inné est activé précocement (3 semaines après la naissance) avec une réponse puissante et persistante (**Bottelbergs *et al.*, 2012**).

Chez les patients X-ALD, une relation entre le stress oxydatif et l'inflammation a été suggérée en proposant qu'un niveau élevé des ERO libérées par les cellules neuronales (cellules gliales, oligodendrocytes et neurones) pourrait favoriser une réponse inflammatoire (**Galea *et al.*, 2012**). Certaines études confortent aussi l'hypothèse de l'implication du peroxysome dans la réponse inflammatoire non cytokinique. Ainsi, l'expression de 5-LOX et de COX-2 est augmentée dans les astrocytes déficients en *Abcd1/Abcd2* (**Khan *et al.*, 2010**). De plus, les leucotriènes dérivés de l'activité de la 5-LOX sont significativement élevés dans toute la la matière blanche des patients cALD. L'expression de COX-2 est modérément élevée dans les régions contenant les lésions de démyélinisation, alors que l'expression de 5-LOX et de la PLA-2 est prédominante dans toutes les régions (**Khan *et al.*, 2010**).

4.4 Incidence du cytosquelette sur l'activité peroxysomale

4.4.1 Le cytosquelette : rappels

Le cytosquelette des cellules eucaryotes est composé de 3 réseaux distincts de filaments protéique ; les filaments d'actine ou microfilaments, les filaments intermédiaires (qui varie en fonction du type de cellules considérées : neurofilaments dans les cellules nerveuses ; kératines dans les cellules épithéliales ; vimentine dans les cellules

mésenchymateuses) et les microtubules. Chacun de ces trois réseaux possède des propriétés et des fonctions différentes.

Les microtubules sont les constituants majeurs du cytosquelette qui régissent l'organisation intracellulaire de la cellule eucaryote. Ils sont essentiels à la vie de la cellule car ils interviennent dans de nombreux processus tel que l'acquisition et le maintient de la morphologie et de la polarité cellulaire, le transport vésiculaire, la motilité et la division cellulaire ainsi que le trafic intracellulaire. Un microtubule est une structure cylindrique creuse de 25 nm de diamètre généralement formé de treize protofilaments qui sont eux-mêmes des polymères d'hétérodimères de tubuline. Ces derniers sont constitué de sous-unités de tubuline α et β et forment l'unité fondamentale du microtubule. Ces structures sont capables de s'assembler et de se désassembler rapidement pour répondre aux besoins de la cellule. Cette dynamique nécessite de l'énergie. Dans la MA, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau conduit à une désorganisation des microtubules et à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires.

L'actine-G est une protéine globulaire de 42 kDa qui peut s'auto-assembler et former des microfilaments d'actine, de diamètre approximatif 8 nm. Ces microfilaments ont une structure hélicoïdale double brin dont le pas est d'environ 72 nm, ce qui correspond à environ 28 sous-unités d'actine. Comme les microtubules, les microfilaments d'actine sont polarisés. Dans la MA, une désorganisation de l'actine a aussi été rapportée pouvant conduire à la formation de structures cellulaires particulières appelées corps d'Hirano ou 'Hirano bodies' **(Satoh et *al.*, 2013).**

Les cellules eucaryotes sont capables d'organiser les microfilaments d'actine en de nombreuses structures différentes. Ils peuvent exister sous la forme de longs filaments individuels, mais la plupart du temps, que ce soit pour répondre à des fonctions cellulaires précises ou pour résister à des contraintes mécaniques, les filaments d'actine sont organisés par la cellule en structures élaborées. Essentiellement, deux types d'organisations de filaments d'actine cohabitent dans les différents types cellulaires chez les eucaryotes. ils peuvent être organisés en faisceaux parallèles appelés câbles d'actine ou sous forme de réseaux branchés denses, que l'on trouve dans différents types de cellules motiles tels que les leucocytes et les fibroblastes humains **(Svitkina *et al.*, 1999)**.

Des interactions existent entre les filaments d'actine et les microtubules. Ces dernières peuvent être modifiées dans diverses pathologies incluant les maladies neurodégénératives **(Zhou & Cohan, 2003)**

Les filaments intermédiaires ont un diamètre intermédiaire (de 8 à 12 nm) compris entre celui des microfilaments d'actine et celui des microtubules. Ces filaments ne semblent pas être aussi dynamiques que les microtubules et les microfilaments d'actine. Ils constituent donc grâce à leur élasticité exceptionnelle un support mécanique supplémentaire, comme une charpente cellulaire.

4.4.2 Relations cytosquelette et peroxysome

Les peroxisomes sont remarquablement dynamique en termes de mouvements intracellulaires. Ils peuvent être associés au RE lisse et aux gouttelettes de lipide. Ils peuvent interagir avec d'autres organelles en particulier avec les mitochondries. En fait, un déplacement des peroxysomes vers d'autre peroxysomes en vue d'une éventuelle interaction a été aussi observé **(Schrader *et al.,* 2000).** Cette translocation pourrait être nécessaire pour atteindre d'autre peroxysomes biochimiquement différents et localisés dans d'autres parties du cytoplasme, et ceci afin d'échanger des substrats ou des protéines. La plupart des peroxysomes (87–92%) oscillent sur place ; ils semblent avoir des mouvements aléatoires et vibrationnels avec une vitesse de 0.015±0.002 µm/s tandis qu'une population significative de peroxysomes (8-13 %) suit un mouvement saltatoire dirigé, avec une vitesse de 0.1±0.02 µm/s **(Bharti *et al.,* 2011).** Ce mouvement directionnel exige de l'énergie et assure la translocation de l'organelle sur des longues distances (jusqu'à 10 µm) **(Schrader *et al.,* 2000 ; Wiemer *et al.,* 1997 ; Rapp *et al.,* 1996)**. Le dysfonctionnement de la mitochondrie et en particulier la production d'ATP peut donc affecter ce mouvement. La mobilité peroxysomale peut être aussi modulée par l'environnement extracellulaire. Il peut être prononcé dans des conditions métaboliques nécessitant la présence de peroxisomes ou dans des conditions de stress.

Les peroxysomes dans la plupart des types cellulaires montrent une distribution intracellulaire uniforme **(Schrader *et al.,* 1996).** Cette distribution uniforme est obtenue par l'intermédiaire de leur mouvement le long des composants du cytosquelette. En fait, les peroxysomes peuvent s'associer aux filaments d'actine ou aux microtubules pour se déplacer à des courtes ou à des longues distances, respectivement **(Schrader *et al.,* 1996).**. Plusieurs techniques ont été utilisées pour étudier le comportement dynamique des peroxisomes; l'application des agents dépolymérisant les microtubules, ayant pour rôle de perturber le

réseau de microtubules, a mené à une distribution anormale des peroxisomes et à une inhibition de leur mouvement à longue distance **(Bharti *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2006; Wiemer *et al.*, 1997)** suggérant que la distribution normale des peroxisomes au sein des cellules est dépendante de leur mobilité via le réseau de microtubules. L'utilisation des techniques d'imagerie en temps réel a confirmé que le mouvement des peroxisomes dépend des microtubules **(Rapp *et al.*, 1996; Schrader *et al.*, 2000).** Une colocalisation des peroxisomes et des microtubes a été observée dans divers types cellulaires à savoir, les cellules HepG2 (**Schrader *et al.*, 1996),** CHO **(Rapp *et al.*, 1996)** , CV1 (**Wiemer *et al.*, 1997)** ainsi que dans des fibroblastes de peau humains **(Nguyen *et al.*, 2006).** Chez les mammifères, les peroxisomes se déplacent le long du réseau de microtubules via le complexe dyneine–dynactine et via la kinésine **(Schrader *et al.*, 2000).** Le mouvement des peroxysomes fait aussi appel au PEX14, qui en plus de son rôle dans la machinerie de transport des protéines de la matrice peroxysomale, sert de protéine d'ancrage du peroxysome sur les microtubules et facilite sa motilité dans la cellule **(Bharti *et al.*, 2011).**

4.5 Rôles du peroxysome dans la sénescence et la mort cellulaire

Dans les pathologies impliquant le dysfonctionnement du peroxysome au niveau cérébral, le stress oxydatif et l'inflammation sont associés à la mort cellulaire. Le type de mort cellulaire n'est pas bien caractérisé, mais la nécrose ou l'apoptose sont évoquées. **Singh *et al*** ont décrit, dans des cerveaux humains avec X-ALD, l'apoptose associé au des haut niveaux de céramide et un niveau faible de GSH (**Singh *et al.*, 1998**). Dans le système nerveux central de patients adrénoleukodystrophique, la mort par apoptose a été également décrite essentiellement dans les oligodendrocytes avec activation de la caspase-3 et des cassures de l'ADN, (**Feigenbaum *et al.*, 2000**). Eichler *et al.* ont mis en évidence une mort par apoptose dans des zone cérébrales avec activation des cellules microgliales et ont définit l'apoptose des microglies comme un stade précoce dans l'évolution de lésion dans la maladie ALD (**Eichler *et al.*, 2008**). Hein *et al.* ont fourni plus d'informations sur les processus impliqués dans la mort cellulaire induite par l'accumulation de AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0) sur des cultures mixtes de cellules gliales (oligodendrocytes, astrocytes) et de neurones (**Hein *et al.*, 2008**). Ainsi, cette mort cellulaire est caractérisée par un dysfonctionnent mitochondriale et une dérégulation du Ca^{2+} (**Hein *et al.*, 2008**). Kahn *et al*. ont étudiées les effets des AGTLCs (C24:0; C26:0) sur les oligodendrocytes 158N et n'ont pas observé de signe d'apoptose (**Kahn *et al.*, 2011**). Ces AGTLCs (20 µM) induisent une dépolarisation mitochondriale associée à une surproduction d'anions superoxydes et à une perte la de l'intégrité de la

membrane lysosomale (**Baarine *et al.*, 2012**). Dans les modèles de souris Zellweger (souris *Pex-13*$^{-/-}$), **Müller *et al.*** ont observé un stress oxydatif médié par les mitochondries et une mort des cellules neuronales du cervelet en culture et dans des sections de cervelet (**Müller *et al.*, 2011**). Lors de l'étude des effets de la délétion du gène Pex11β, une mort cellulaire par apoptose une a été observée dans les cultures primaires de neurones du néocortex et du cervelet de souris *Pex11β*$^{+/-}$ et *Pex11β*$^{-/-}$ ainsi qu'au niveau du cerveau de ces souris (**Ahlemeyer *et al.*, 2012**).

La sénescence est présente quand une cellule perd sa capacité de réplication tout en restant métaboliquement active. La catalase, une enzyme péroxysomale, semble jouer un rôle dans la détermination de la durée de vie d'une cellule, en effet la longévité est positivement corrélée avec un stress oxydatif cellulaire réduit (**Giordano *et al.*, 2012**).

Un déclin des taux de la catalase avec l'âge est observé alors que ce taux est maintenu constant ou élevé chez les espèces ayant une longue durée de vie. De plus, quand une cellule entre en sénescence, la catalase est transférée dans la matrice du peroxysome. Si la catalase est restaurée alors la sénescence est retardée (**Giordano *et al.*, 2012**). Certains auteurs suggèrent la possibilité qu'une introduction de la catalase péroxysomale dans les cellules pourrait avoir des effets positifs en cas de maladies associée à un stress oxydatif.

Actuellement, il est très bien admis que la mitochondrie est le principal organite impliqué dans la mort cellulaire par apoptose. Des preuves récentes suggèrent que la mort par nécrose peut être aussi comme l'apoptose une mort programmée (on parle alors de nécroptose) **(Golstein & Kroemer, 2007)** et que les peroxysomes pourraient parfois être impliqués dans l'activation de ce processus. Il a été montré par **Jungwirth *et al*. (2008)** que chez S. cerevisiae, la délétion du gêne PEX6, codant pour une protéine impliquée dans une étape clé de l'importation des protéines peroxysomales, aboutit à une accumulation délétère des ROS et à une mort cellulaire qui présente des caractéristiques de nécrose. De même, les résultats d'**Aksam *et al.* (2008)** ont montré une relation entre la protéine peroxysomale PMP20, membre de la famille des peroxyredoxines (enzymes antioxydantes qui réduisent les peroxydes) et la mort cellulaire par nécrose. En fait, une diminution de la viabilité cellulaire a été observée chez des levures méthylotrophiques (H. polymorpha) déficientes en PMP20 et cultivées en milieu contenant du méthanol.

Des protéines de la matrice peroxysomale ont été mises en évidence au niveau du cytosol de cellules déficiente en PMP20 pendant le processus de nécrose. Ceci rappelle le

relargage des protéines mitochondriales pendant l'apoptose et constitue un argument en faveur de la relation peroxisome-nécrose **(Eisenberg *et al.*, 2010).**

4.6 Peroxysome et vieillissement

L'hypothèse de l'implication du peroxysome dans le vieillissement cellulaire et le développement des maladies neurodégénératives liée à l'âge est confortée par la dérégulation de la production des ERO et des ERN dans cet organite (**Legakis *et al.*, 2002; Tirotenko & Terlecky, 2011; Giordano & Terlecky, 2012**). Ainsi, les patients souffrant d'une hyopcatalasémie héréditaire présentent un risque élevé de développer une maladie liée au vieillissement tel que le diabète, l'athérosclérose et le cancer (**Góth & Eaton, 2000**).

De même, des cellules de patients hypocatalasémiques accumulent le peroxyde d'hydrogène et développent des pathologies liés à l'âge (**Wood *et al.*, 2006**). Dans les conditions d'hyopcatalasémie, la capacité du peroxysome à importer les protéines, à réguler sa croissance et son développement et éliminer les ERO est altérée (**Koepke *et al.*, 2008**).

Au niveau du foie de souris âgées, une régulation positive de certaines protéines péroxysomales tel que l'époxyde hydrolase-2 et le 3-cétoacyl-thiolase A, a été observée en comparaison avec des souris plus jeunes s'opposant ainsi au vieillissement des cellules (**Amelina *et al.*, 2011**). L'équilibre RedOx mitochondrial, une condition nécessaire pour neutraliser le vieillissement, est perturbé dans les cellules déficientes en catalase et suite à une génération des ERO à l'intérieur du peroxisome (**Ivashchenko *et al.*, 2011**).

Par ailleurs, la génèse du peroxysome pourrait être impliqué dans le vieillissement cellulaire. Ainsi, suite à la division des peroxysomes une population hétérogène d'organites est observée dans les cellules. Les jeunes peroxisomes coexistent avec les plus âgés qui présentent des composants dysfonctionnels provenant de dommages causés par les produits issus d'un métabolisme peroxisomal altéré (**Huber *et al.*, 2012**). Ces peroxysomes âgés sont éliminés par autophagie pour maintenir l'homéostasie cellulaire et pour prévenir l'accumulation de composants peroxysomaux endommagés au niveau de la cellule. La délétion de la protéine ATG1, nécessaire pour l'exécution de l'autophagie, induit une augmentation significative du nombre des peroxysomes accompagnée d'une diminution de la viabilité cellulaire (**Aksam *et al.*, 2007**). En outre, la majorité des enzymes peroxymales contiennent un tri-peptide nommé PTS1 reconnu par le récepteur Pex5 qui leur permet de pénétrer dans le peroxysome (**Lametschwandtner *et al.*, 1998**). Dans les cellules âgées, il a été rapporté que l'importation des protéines contenant PTS1 diminue (**Legakis *et al.*, 2002**).

Dans leur ensemble, ces données suggèrent que le peroxysome est impliqué dans un système qui gouverne le vieillissement cellulaire et qu'un dysfonctionnement péroxysomal pourrait favoriser l'apparition de maladies liées à l'âge.

4.7 Peroxysome et maladie d'Alzheimer

Actuellement, il est bien établi que l'activité péroxysomale diminue avec l'âge (**Titorenko & Terlecky, 2011).** Ainsi, un dysfonctionnement du peroxysome a été associé avec le vieillissement et l'apparition des démences. En effet, une diminution de l'activité catalase, une faible synthèse des plasmalogènes et une sensibilité plus importante à la mort cellulaire notamment par nécrose (**Marcus *et al.*, 1998, Goodenowe *et al.*, 2007; Manivannan *et al.*, 2012; López-Erauskin *et al.*, 2013**) pourrait favoriser l'apparition de maladies neurodégénératives comme la MA (**Terlecky *et al.*, 2006; Lizard *et al.*, 2012**).

Les données initiales suggérant l'implication du peroxysome dans la survenue de la MA ont été mises en évidence en utilisant des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat. Dans ces cellules, une prolifération péroxysomale, induite par Wy-14.463, un agoniste puissant de PPARα, a été associé avec une protection de la mort cellulaire induite par l'Aβ (**Santos *et al.*, 2005**). De plus, chez le modèle de souris transgéniques de MA (Tg2576), une altération significative des peroxysomes a été observée bien qu'aucun signe de la maladie n'ait été apparent (**Cimini *et al.*, 2009**).

Chez des souris transgéniques portant la mutation Suédoise, une induction des protéines ABCD3 et ACOX1 a été observée reflétant ainsi la nécessité d'une β-oxydation efficace comme réponse compensatrice au dysfonctionnement des mitochondries (**Fanelli *et al.*, 2013**). De plus, chez le rat, une activité peroxysomale altérée déclenchée par la thioridazine induit une accumulation des AGTLCs qui contribuerait à l'augmentation de l'expression de l'APP et de la β-sécrétase et la génération de l'Aβ (**Shi *et al.*, 2012**).

De même, des altérations peroxysomaux pouvant contribuer à la progression de la MA ont été rapporté chez l'homme. Plusieurs études ont décrit une réduction des niveaux de l'éthanolamine plasmalogène et de la choline plasmalogène dans les régions cérébrales et dans les érythrocytes de patients MA; cette réduction était positivement corrélée avec la sévérité de la maladie (**Igarashi *et al.*, 2011; Wood, 2010**). De plus, chez des patients Alzheimer (stade V-VI selon la calssification de Braak & Braak), une accumulation de C22 :0 et des AGTLCs (C24 :0 , C26 :0), substrats spécifiques de la β-oxydation péroxysomale, une diminution des taux de plasmalogènes, une augmentation de la densité des

peroxysomes dans les cellules neuronales et une diminution du nombre des peroxysomes dans les neurites des cerveaux Alzheimer ont été rapportées (**Kou *et al*., 2011**).

Une diminution des taux de DHA a été observée au niveau du cerveau et du foie de patients Alzheimer (**Astarita *et al*., 2010**).

Ces différentes approches expérimentales sont en faveur d'une implication du métabolisme peroxysomal et éventuellement des AGTLCs dans la physiopathologie de la MA.

III. Mort cellulaire et maladie d'Alzheimer

1. Les différents types de mort cellulaires : généralités

La mort cellulaire peut être définie comme une perte irréversible de l'intégrité de la membrane cellulaire **(Kroemer *et al.*, 2005)**. Elle participe au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire, au développement et à la différenciation cellulaire.

Les cellules subissant un processus de mort cellulaire sont engagées dans un mécanisme réversible jusqu'à ce qu'une première phase, appelée « point de non retour », soit dépassée. Une accumulation massive de caspases, une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi m$, une perméabilisation complète de la membrane externe mitochondriale ou encore l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) sont des exemples de ces points de non retour **(Kroemer *et al.*, 2009).** En l'absence d'événements biochimiques clairement identifiés comme des points de non retour, le NCCD (Nomenclature Commitee on Cell Death) considère une cellule comme étant morte dès lors qu'elle présente l'un des critères moléculaires ou morphologiques suivants :

- La cellule a perdu l'intégrité de sa membrane plasmique, et ceci est mis en évidence par l'incorporation de colorants vitaux (par exemple l'iodure de propidium) *in vitro*.
- La cellule, de même que son noyau, a subi une fragmentation complète pour former des corps apoptotiques.
- La cellule, ou des fragments de cette cellule, a été ingérée par des cellules adjacentes *in vivo*.

Historiquement, trois types de mort cellulaire (apoptose, autophagie et nécrose) ont été distingués selon des critères morphologiques et biochimiques dans les cellules de mammifères.

1.1. Apoptose (ou mort cellulaire de type I)

L'apoptose a été découverte par **Kerr *et al.* (1972)** en décrivant l'aspect morphologique particulier de ce type de mort cellulaire. L'apoptose est une forme active d'autodestruction qui permet l'élimination de cellules anormales, des cellules surnuméraires et des cellules non-fonctionnelles (développement fœtal, régulation de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte) **(Rai *et al,* 2005).**

Elle résulte de l'activation d'enzymes particulières appelées caspases et de l'expression de nombreux gènes pro ou anti-apoptotiques, contribuant à la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante **(Kerr *et al,* 1972).** L'apoptose est caractérisée par un certain nombre de modifications :

- ***Morphologique*s :** la réduction du volume cellulaire (pycnose), la condensation de la chromatine et du cytoplasme, la rupture de la membrane nucléaire et une fragmentation du noyau (caryorrhexis), le bourgeonnement des membranes et la formation de corps apoptotiques, petites vésicules qui sont ensuite phagocytées et dégradées par les cellules voisines (**Figure 9**). L'intégrité des organelles de la cellule est généralement maintenue jusqu'à la phagocytose des corps apoptotiques. Le cytosol et les protéines intracellulaires ne sont pas libérés dans l'espace extracellulaire, ce qui permet d'éviter le déclenchement d'un processus inflammatoire **(Kroemer *et al.*, 2009).**
- ***Biochimiques :*** la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\psi m$), l'activation des caspases et la fragmentation internucléosomale de l'ADN **(Marchetti *et al* ., 1996).** Les caspases (de l'anglais **c**ysteinyl-**asp**artate-cleaving prote**ases** ou aspartic-acid-specific cystein proteases) sont les principaux effecteurs de l'apoptose; ce sont des cystéines à protéases **(Reed, 2001).** Elles sont constitutivement présentes sous forme de zymogène (procaspase) et leur activation pendant l'apoptose requiert un clivage, qui va donner des tétramères, formes actives des caspases **(Couzinet *et al.*, 2002).** Les procaspases peuvent s'autoactiver ou être activées par d'autres caspases.

Au cours de ce phénomène, les cellules mettent en place une condensation de la chromatine associée à une agglomération des organites cytoplasmiques et particulièrement des mitochondries. Ceci est suivi d'une fragmentation du cytoplasme et de l'ADN en multiples de 180-200 paires de bases conduisant à la formation des corps apoptotiques éliminés par les cellules adjacentes **(Arends & Wyllie, 2001).**

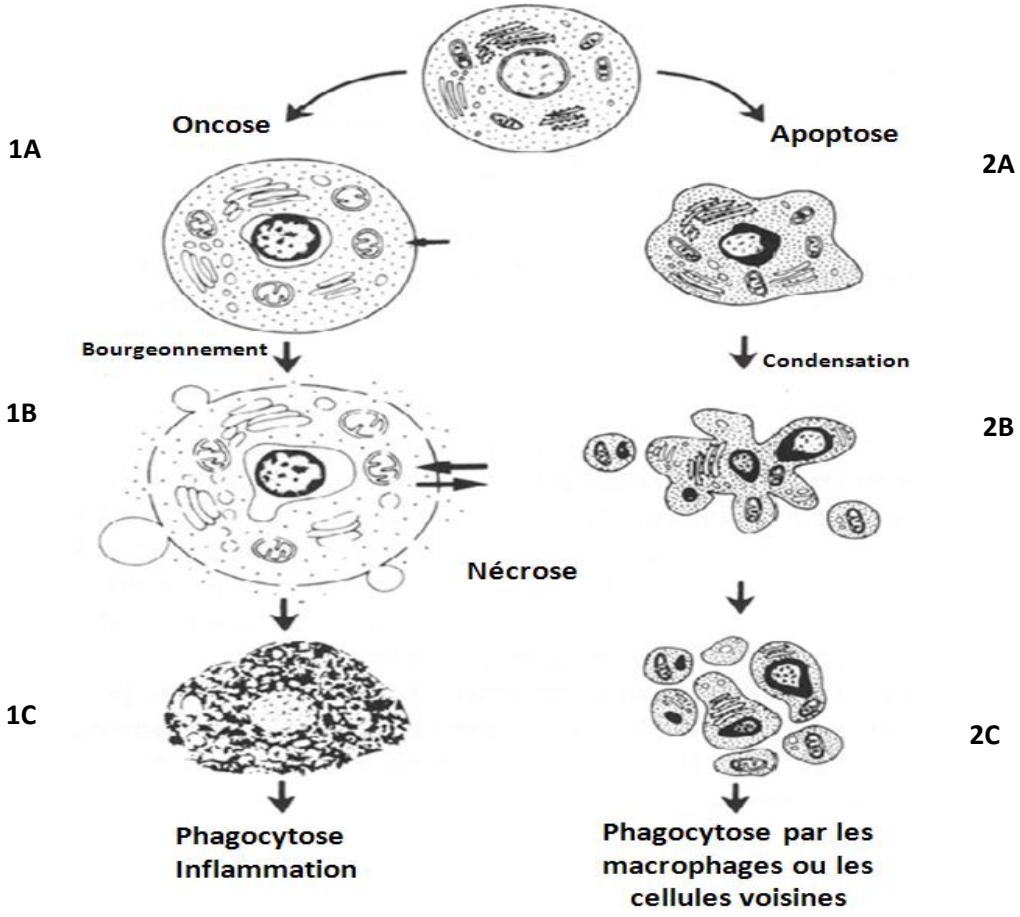


Figure 9 : Mort cellulaire menant à la nécrose ou à l'apoptose. Nécrose - **1A :** gonflement (oncose); **1B :** vacuolisation, bourgeonnement et augmentation de la perméabilité **; 1C :** changement nécrotique ; diminution de la taille de la cellule ; caryolyse ; Apoptose - **2A** : diminution de la taille et pyknose, marginalisation de la chromatine, **2B :** condensation et/ou fragmentation du noyau **2C :** fragmentation cellulaire, formation de corps apoptotiques (**Majno & Joris, 1995)**

Il existe deux voies principales à l'origine du déclenchement de la mort cellulaire apoptotique :

❖ *la voie intrinsèque ou voie mitochondriale*, qui se caractérise par une perméabilisation de la membrane mitochondriale, accompagnée d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de l'ouverture des mégacanaux mitochondriaux **(Zornig *et al.*, 2001),** ce qui a pour conséquence l'altération de la production de l'ATP et le relargage de plusieurs substances de l'espace inter-membranaire vers le cytosol tel que le cytochrome c **(Kelly *et al.*, 2003**). Cette étape est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 tels que Bad

et Bax qui à l' opposé de Bcl-2 ont une activité pro-apoptotique ; en se complexant avec Bcl-2 ces molécules favorisent le passage du cytochrome c vers le cytosol. Quand il quitte la mitochondrie, le cytochrome c se lie à un facteur cytosolique préexistant, l'Apaf1 (apoptotic protease-activating factor 1) pour former en présence de dATP/ATP avec la procaspase 9 un heptamère, l'apoptosome **(Li, 1991).** Ce complexe macromoléculaire active alors la caspase-3 (ou la caspase-7), une activation qui est à l'origine de la dégradation cellulaire aboutissant à l'activation en cascades des caspases.

Une autre voie apoptotique mitochondriale mais indépendante des caspases est déclenchée suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale, et à la libération d'une molécule autre que le cytochrome c, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (**Kroemer *et al*, 2009**). Cette dernière est transloquée vers le noyau où elle induit en coopération avec des endonucléases le clivage de l'ADN en grand fragments **(Van loo *et al.*, 2001).**

La voie intrinsèque est surtout déclenchée par des agents physiques (radiations) et chimiques (xénobiotiques).

❖ *la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort* est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires se trouvant ancré à la membrane cytoplasmique tel que Fas **(Hengartner, 2000 ; Hengartner & Bryant, 2000).** Pour le récepteur Fas, la transmission du signal apoptotique se fait par la formation d'un complexe nommé DISC (Death Inducing Signaling Complex), formé par l'agrégation de Fas, la protéine FADD (Fas Associated Death Domain) et la procaspase 8. Suite à son auto-activation, la caspase-8 dégrade Bid ; Bid tronqué (tBid) contribue en se complexant à Bcl-2 à la chute de potentiel transmembranaire mitochondrial qui favorise l'activation de la caspase-3 (via l'apoptosome) déclenchant la cascade des caspases effectrices, qui vont conduire à la mort cellulaire **(Slee *et al.*, 1999).**

La voie extrinsèque des récepteurs de mort peut aussi impliquer d'autres récepteurs membranaires (TRAIL, TNF-R, DR3, DR5, …) **(Schmitz *et al*., 2000)**.

La voie extrinsèque est déclenchée dans les conditions suivantes : élimination des cellules inflammatoires (délétion périphériques des lymphocytes T matures) ; élimination par les lymphocytes T cytotoxiques des cellules infectées.

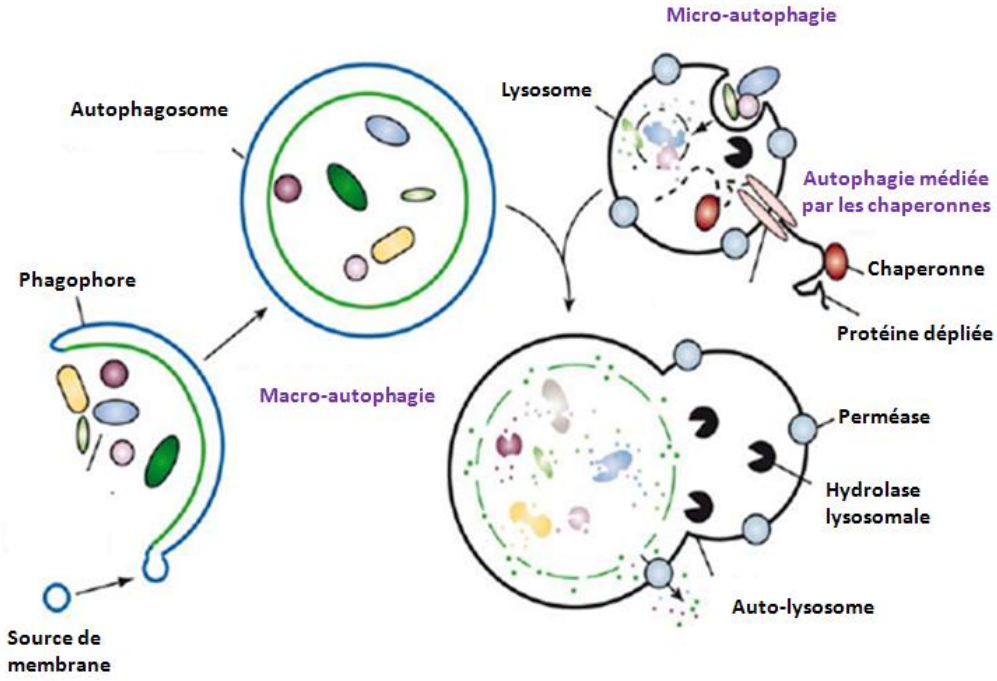
1.2. L'autophagie (ou mort cellulaire de type II)

L'autophagie, encore connue sous le nom de mort cellulaire programmée de type II, est un processus catabolique intracellulaire indispensable à la dégradation et au recyclage de protéines, de ribosomes, mais également d'organites tels que le Réticulum Endoplasmique (RE), les mitochondries ou encore l'appareil de Golgi **(Klionsky *et al.*, 2000).** Ce phénomène peut se déclencher en condition physiologique, dans des cellules normales privées de nutriments ou de facteurs de croissance, mais également en réponse à différents stress cellulaires **(Meijer & Codogno, 2004).** Le phénomène d'autophagie est un processus physiologique au niveau hépatique qui survient en particulier en cas de carences en acides aminés **(Codogno & Meijer, 2013)**. Les cellules autophagiques se caractérisent par une membrane plasmique et un noyau intact, une intense vacuolisation du cytoplasme, une dilatation de l'appareil de Golgi et du RE.

L'autophagie est largement impliquée dans des processus pathophysiologiques tels que le cancer, des troubles métaboliques et neurodégénératifs et des maladies cardiovasculaires et pulmonaires ainsi que dans le vieillissement et dans les réponses physiologiques aux exercices **(Choi Ryter & Levine, 2013).** Ce type de mort correspond à la digestion enzymatique de macromolécules cytoplasmiques ou d'organites cellulaires dans des lysosomes.

Quatre types d'autophagie (**Figure 10**) ont été décrits **(Klionsky *et al.*, 2009; Massey *et al.*, 2006)**

- L'endocytose pour les macromolécules membranaires qui forment les endosomes. Ces derniers fusionnent avec les lysosomes ou avec les autophagosomes.
- La micro-autophagie avec invagination de la membrane lysosomale pour séquestrer, au sein des lysosomes, des molécules cytoplasmiques. Au contact des enzymes lysosomales, ces structures séquestrées sont dégradées.
- Le transport sélectif de macromolécules cytoplasmiques (protéines mal repliées ou oxydées) par l'intermédiaire de chaperonnes sur la membrane des lysosomes.
- La macro-autophagie avec formation d'autophagosome.

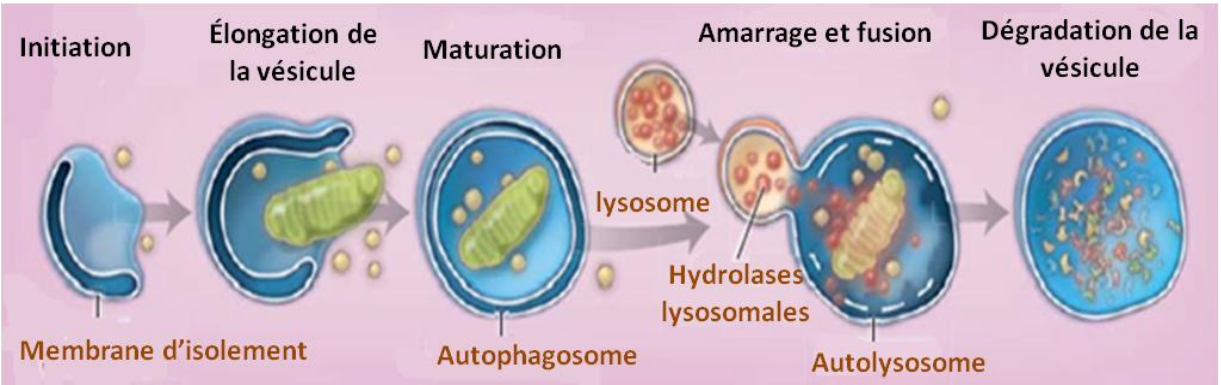


<u>Figure 10</u>: ***Différents types d'autophagie (Klionsky et al., 2009)***

Les analyses faites en microscopie électronique à transmission sur des sections ultrafines ont permis de décrire les différents stades de la macro-autophagie (**Figure 11**). Le premier stade est la formation d'une membrane d'isolation appelée phagophore et provenant d'un repliement du RE lisse. Celle-ci va s'enrouler sur elle-même après une étape d'élongation, emprisonnant une partie du cytoplasme, et va former une structure appelée autophagosome. Ce dernier va ensuite fusionner avec un lysosome pour former un auto-phagolysosome ou auto-lysosome, dont le contenu va être dégradé par les enzymes lysosomales assurant ainsi un recyclage de ce matériel **(Choi Ryter & Levine, 2013).**

Plusieurs organites pouvant être sélectivement ciblés lors de la réponse autophagique, plusieurs formes d'autophagie ont été rapportées dans les cellules de mammifères : RE-phagie, ribophagie, mitophagie ou encore péxophagie **(Beau *et al.*, 2008).**

Le processus d'autophagie fait intervenir de nombreuses protéines cellulaires lors de la formation de l'autopahgosome. Une famille de protéines, dont les gènes correspondants sont nommés les ATg (Autophagy related genes), sont impliquées dans le contrôle de la formation de l'autophagosomece sont ; Atg3, Atg5, Atg7, Atg10, Atg12 et Atg 8 (LC3). La LC3 est exprimée sous deux formes : la LC3-I (cytosolique) et la LC3-II (autophagosome). Le taux de la LC3-II produite suite à un clivage subit par LC3-I, est corrélé à la formation de l'autophagosome et donc à la présence d'un processus d'autophagie.



<u>Figure 11</u>: *Les phases de la voie de macro-autophagie (Choi Ryter & Levine, 2013)*

L'autophagie se déroule en plusieurs phases, l'initiation ou formation d'une membrane d'isolement, maturation de l'autophagosome, séquestration du matériel cytoplasmique et fusion de l'autophagosome avec le lysosome pour former une vacuole d'autophagie dans laquelle la dégradation finale du matériel séquestré intervient grâce aux hydrolases.

1.3 La nécrose (ou mort cellulaire de type III)

La nécrose est caractérisée morphologiquement par une augmentation du volume cellulaire (oncose), une dilatation des organites, une rupture de la membrane cellulaire et une perte subséquente du matériel intracellulaire (**Figure 8**) (**Majno & Joris, 1995)**. De nombreux médiateurs, organites et processus cellulaires sont impliqués dans la mort cellulaire nécrotique. Ce phénomène inclut des altérations mitochondriales, des changements au niveau des lysosomes et du noyau, une dégradation des lipides, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ainsi qu'une activation de protéases telles que les calpaïnes et les cathepsines. La nécrose est considérée comme une forme de mort cellulaire accidentelle et non contrôlée. En l'absence de dénominateur biochimiques, la mort cellulaire nécrotique est le plus souvent définie par l'absence de marqueurs apoptotiques ou autophagiques **(Kroemer *et al.*, 2009).** La nécrose est associée à une réaction inflammatoire qui se développe dans le tissu adjacent en réponse à la libération de débris cellulaires activant les macrophages **(Fink & Cookson, 2005)**

On considère de plus en plus que certaines formes de nécroses seraient régulées par un ensemble de voies de signalisation et de processus cataboliques **(Festjens *et al.*, 2006 ; Golstein *et al.*, 2007)**. Il a été démontré que des récepteurs à domaine de mort (TNFR1, Fas/CD95 et TRAILR) ainsi que des récepteurs Toll-like (TLR3 et TLR4) seraient impliqués dans une forme particulière de nécrose : la nécroptose **(Kalai *et al.*, 2002 ; Degterev *et al.*, 2008 ; Rosenbaum *et al.*, 2010).**

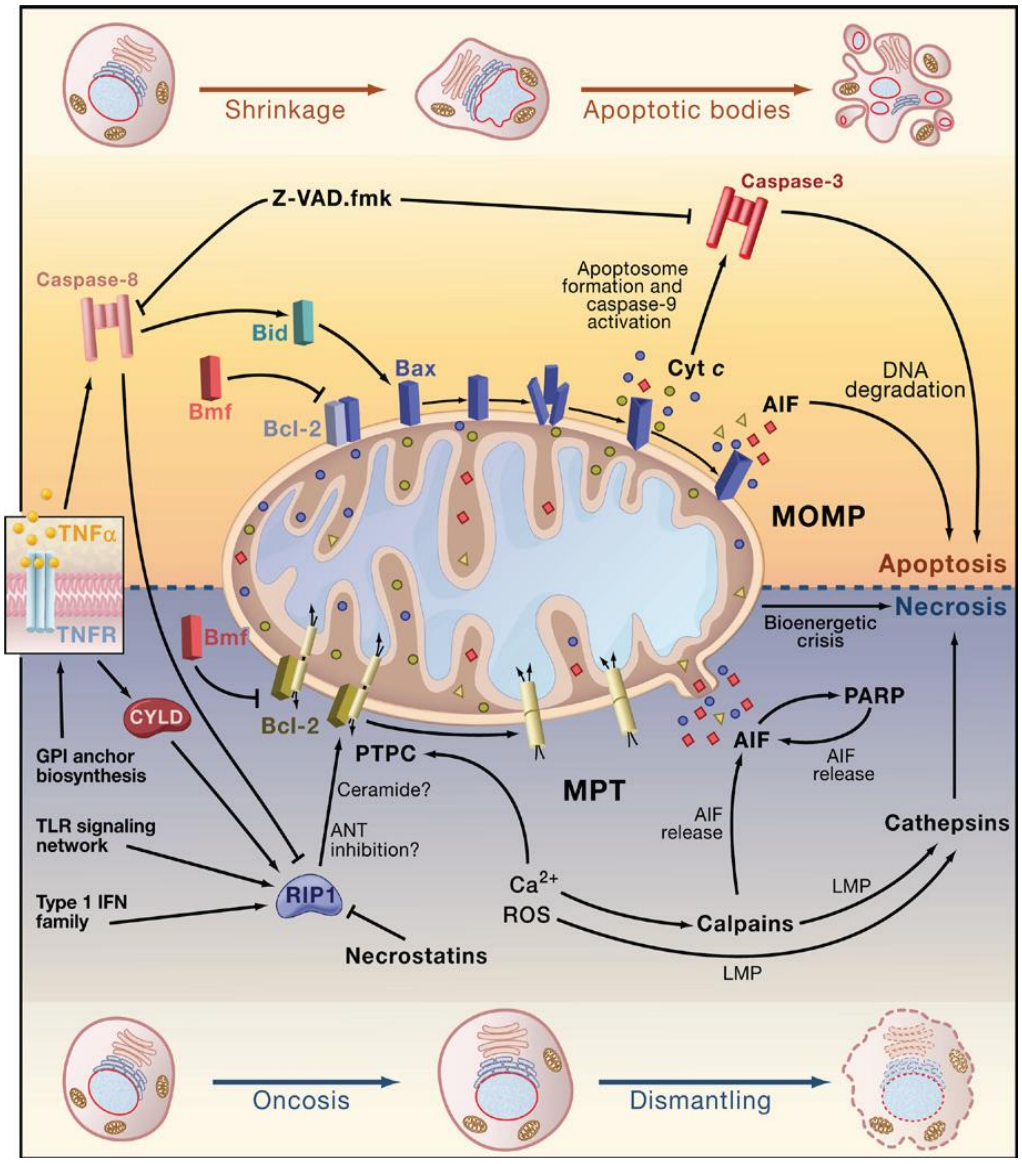
1.4 La nécroptose

Récemment, une forme de nécrose active (par opposition à nécrose accidentelle) a été caractérisée et nommée nécroptose (**Degterev *et al.*, 2008 ;Rosenbaum *et al.*, 2010)**. Morphologiquement, la nécroptose présente les caractéristiques de la nécrose; cependant, elle s'effectue selon une voie de signalisation particulière qui nécessite l'intervention de constituants de la voie apoptotique des récepteurs de mort. L'initiation de la nécroptose est induite par la fixation des ligands comme TNF-α, TRAIL et FasL sur les récepteurs de morts. Ces récepteurs de morts peuvent être TNFR1 et 2 (TNF receptor 1 et 2) et TRAILR1 et 2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 et 2), CD95/Fas, qui activent habituellement la machinerie apoptotique, ou aussi des membres de la famille des récepteurs PRR (pathogen recognition receptor) comportant les récepteurs TLR (Toll-like receptors), NLR (NOD-like receptors) et RLR (retinoic acid-inducible gene I- like receptors) **(Vandenabeele *et al.*, 2010)**

La nécroptose exige la participation des kinases RIP1 et RIP3 (*Receptor Interaction Protein 1 and 3*) dont l'implication a été mise en évidence en utilisant les nécrostatines. La nécrostatine-1 (Nec-1) et les Nec-3 et 5 sont des inhibiteurs de RIP-1. La voie de signalisation de l'exécution de la nécroptose a de nombreuses caractéristiques communes avec la voie extrinsèque de l'apoptose. En aval du TNFR il y a formation d'un complexe multi-protéique impliquant FADD, RIP1, RIP3 et la caspase-8. RIP3 peut ensuite interagir avec des enzymes métaboliques (GUL1, PYGL et GLUD1) et augmenter leur activité catalytique **(Vandenabeele *et al.*, 2010)**. Dans le processus de nécroptose la cyclophiline D prend une part active dans l'ouverture des mégacanaux et contribue à l'activation des phases précoses de la nécroptose **(Galluzzi & Kroemer, 2008)**.

La nécroptose est un type de mort cellulaire qui a été récemment impliqué dans la survenue de maladies neurodégénératives **(Lin & Beal, 2006),** dans la défense de l'organisme contre les infections virales dans le développement des cancers ainsi que dans la réponse cellulaire à de multiples stress **(Wu *et al.*, 2012).**

Figure 12 : *Interface entre apoptose et nécroptose* (*Galluzzi & Kroemer, 2008*)



La voie de la nécrose programmée, nommée nécroptose, se concentre sur l'activation de la kinase serine/threonine RIP1 (receptor-interacting protein kinase 1), qui peut être activée par ligation du TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) ou par inhibition des caspases. L'activation du TNFR active la voie apoptotique extrinsèque dépend de la caspase-8. La dégradation de RIP1 mediée par la caspase-8 représente l'interaction moléculaire majeure entre apoptose et nécroptose. AIF: apoptosis-inducing factor, ANT: adenine nucleotide translocase, Cyt c: cytochrome c, GPI: glycosylphosphatidylinositol, IFN: interferon, LMP: lysosomal membrane permeabilization, PTPC: permeability transition pore complex, ROS: reactive oxygen species; TLR, Toll-like receptor, TNFα: tumor necrosis factor α, TNFR: tumor necrosis factor receptor, Z-VAD.fmk: Z-Val-Ala-Asp (OMe).fluoromethylketone.

1.5 Autres types de mort cellulaire

Plusieurs autres types de mort cellulaire dérivant de ces trois principaux types ont été recensés:

* *La catastrophe mitotique* : un défaut dans la progression du cycle cellulaire ou une altération de l'ADN couplé à un dysfonctionnement des systèmes de contrôle du cycle cellulaire peut induire la catastrophe mitotique. Ce type de mort est associé à des changements morphologiques typiques mais biochimiquement variables. (**Kroemer *et al*., 2008).**

* *L'anoïkis* : correspond à de l'apoptose associée à une perte d'attachement des cellules à la matrice extracellulaire **(Kroemer *et al*., 2008).**

* *L'excitotoxicitée* : il s'agit d'une forme de mort cellulaire survenant dans les neurones provoquée par le glutamate, qui conduit à l'ouverture de canaux calcique (la N-méthyl-D-aspartate), suivie par une surcharge de calcium cytosolique et l'activation des voies de signalisation conduisant à la mort cellulaire **(Orrenius *et al*., 2003; Kroemer *et al*., 2008).**

* *La paraptose* : ce terme a été introduit pour décrire une forme de mort cellulaire programmée, morphologiquement et biochimiquement distincte de l'apoptose. Dans plusieurs types de cellules, la paraptose est déclenchée par l'expression du récepteur du facteur de croissance insulin-like I, et elle est associée à une vacuolisation cytoplasmique prononcé et à un gonflement mitochondrial, sans les autres marques morphologiques distinctives de l'apoptose **(Sperandio *et al*., 2000; Kroemer *et al*., 2008).**

1.6 Relation entre les différents types de mort

L'inactivation de certaines molécules comme les caspases n'empêche pas la mort cellulaire mais amène la cellule à adopter un autre mécanisme de mort cellulaire. Les cellules meurent toujours, mais différemment **(Figure 12).** En effet, La liaison du TNFR à son ligand déclenche la voie extrinsèque de la mort cellulaire par apoptose. Dans ce cas, la caspase-8 dégrade RIP-1, une kinase nécessaire à la l'exécution de voie la nécrotique, ceci empêche le passage de la cellule vers une mort par nécroptose. Parallèlement, une inhibition de l'activité des caspases induit la mort par nécroptose. La dégradation de RIP1 par la caspase-8 est l'un des principales liaisons moléculaires entre l'apoptose et la nécroptose. La perméabilisation de la membrane mitochondriale contribue au déroulement de ces deux voies de mort par la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et par l'ouverture des pores de transition **(Galluzzi & Kroemer, 2008)**

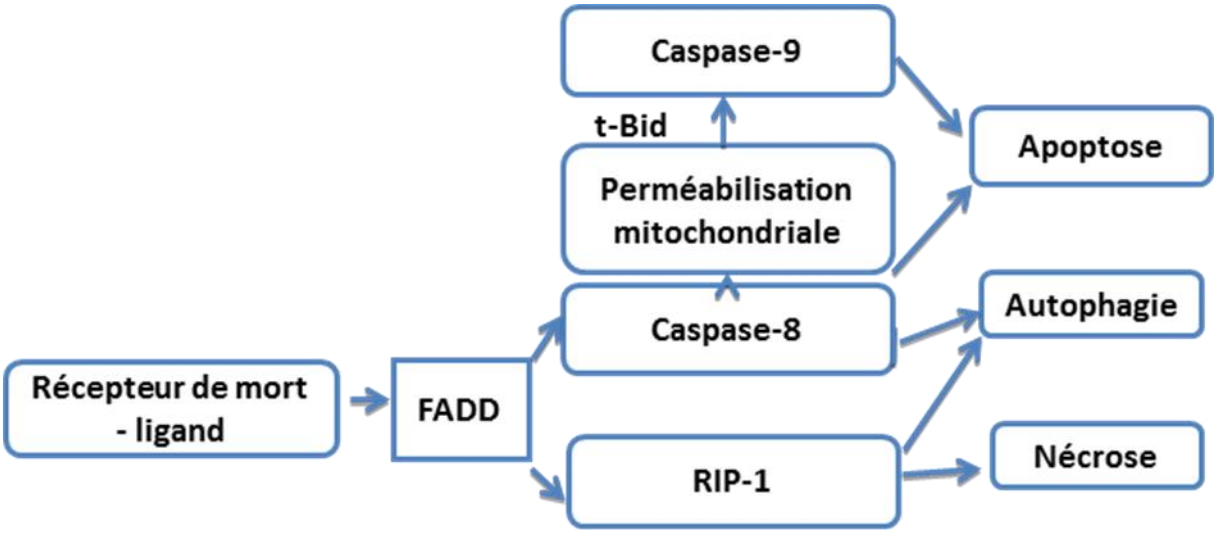


Figure 13 : ***Relation entre les différents types de mort cellulaire lors de l'activation de la mort cellulaire par les récepteurs de mort****. Suite à la fixation des ligands, les récepteurs de mort cellulaires comme TNFR ou CD95/Fas, transforment un signal pouvant impliquer FADD. Ceci mène fréquemment à l'apoptose par activation de la caspase-8. Suite à l'inhibition des caspases ou dans certains types de cellules, une autre voie, qui implique RIP1, peut mener à la nécrose (Nécroptose). L'inhibition de caspase-8 peut aussi déclencher la mort cellulaire autophagique par RIP1* **(Golstein & Kroemer, 2005).**

2. Types de mort cellulaires associés à la maladie d'Alzheimer

Le déclin des fonctions cognitives est associé à une atrophie de diverses régions du cortex cérébral dont les plus importantes se situent au niveau des zones associatives et dans les noyaux sous-corticaux. Cette atrophie est due à la perte des neurones par un processus de mort dont le type reste au centre des débats et l'hypothèse d'un phénomène complexe unissant dégénérescence axonale, apoptose, nécrose et/ou autophagie est aujourd'hui envisagé.

De même, le rôle de la mort cellulaire dans cette pathologie neurodégénérative reste encore très controversé, certains proposant qu'elle participe à la perturbation des capacités cognitives, d'autres suggérant qu'il s'agirait plutôt d'un phénomène secondaire tardif.

L'analyse post mortem de cerveaux de patients décédés de la MA réalisé par **Broe *et al.* (2001)** a montré la présence de noyaux neuronaux contenant de la chromatine condensée. Cette étude, bien qu'apportant une preuve morphologique de la mort neuronale ne permet pas de discriminer avec certitude le type de mort impliqué nécrose ou apoptose. La présence des caspases-3 , 6, 8 et 9 sous forme active et l'accumulation de produits issus de leur activation protéolytique dans les cerveaux de ces patients **(Eckert *et al.*, 2003; Takuma *et al.*, 2002)**

ainsi que les résultats obtenus à partir de cultures cellulaires *in vitro* suggèrent que la mort neuronale induite lors de la MA impliquerait un mécanisme de type apoptotique dépendant des caspases. Selon diverses études, $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$, constituants majeur des plaques séniles, jouent un rôle crucial dans ce type de mort. Ces peptides se sont avérés cytotoxiques quand ils sont utilisés sur des neurones en culture. Cette toxicité est essentiellement observée après l'oligomérisation d'Aβ sous forme de fibrilles. La génération de radicaux libres induite par ces peptides, qui seraient à l'origine d'une peroxydation des lipides faisant suite à l'activation d'un stress oxydatif, pourrait expliquer au moins en partie cette mort cellulaire apoptotique **(Rohn *et al.*, 2002)**.

Par ailleurs, l'autophagie pourrait aussi jouer un rôle central dans la physiopathologie de la MA. Une dérégulation de cette voie de mort cellulaire a été initialement liée avec la maladie au cours des observation faites au microscope électronique, en mettant en évidence l'accumulation de vacuoles d'autophagie dans les cerveaux de patients atteints par la MA **(Nixon *et al.*, 2005)**. La mort par autophagie augmente après stimulation avec Aβ et chez des souris transgéniques APP/PS1, un modèle de souris Alzheimer **(Yu *et al.*, 2005).** Certains auteurs plaident en faveur d'une formation d'Aβ à l'intérieur des vacuoles autophagiques durant le processus d'autophagie suggérant que l'activation de l'autophagie dans le cerveau pourrait renforcer la pathogénie de la MA et augmenter les niveaux d'Aβ **(Yu *et al.*, 2005; Nixon, 2007).** Il a aussi été par **Boland *et al*. (2008)** que la clearance des vacuoles d'autophagie est altérée dans les cerveaux Alzheimer alors que ces vacuoles sont efficacement éliminées dans les neurones sains. En outre, l'inactivation de PS1, gène muté chez les formes familiales de MA, induit une altération de la clairance des vacuoles d'autophagie, une acidification lysosomale et une activité protéolytique lysosomale plus importante. De la même façon que l'inactivation, l'expression de PS1 mutants conduit à des modifications similaires de l'autophagie et de l'activité lysosomale **(Lee *et al.*, 2010).** Dans leur ensemble, ces observations suggèrent que l'activation de l'autophagie et l'altération de la clearance des vacuoles autophagiques contribuent à leur accumulation dans les cerveaux Alzheimer.

En outre, il a été démontré par diverses études que la voie autophagie-lysosome est impliquée dans la dégradation de l'APP et de l'Aβ (**Kragh *et al.*, 2012**). Ce processus est perturbé dans la MA (**Kragh *et al*, 2012 ; Jaeger *et al.*, 2010**). En effet, une réduction de l'expression de Beclin 1, une protéine nécessaire à l'initiation de la formation de l'autophagosome pendant l'autophagie a été observée en association à des taux élevés d'APP et d'Aβ et ce qui conduirait à une altération de la dégradation des autophagosomes **(Jaeger *et al.*, 2010)**.

L'autophagie est impliquée aussi dans la modulation du niveau et de la fragmentation de la protéine Tau. Cette protéine, sous sa forme soluble ou agrégée, est dégradée par autophagie et l'inhibition de cette voie contribuerait à augmenter l'agrégation et la toxicité de la protéine **(Berger *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009).** En accord avec cette observation, un traitement par la rapamycine, molécule impliquée dans l'activation de l'autophagie, diminue l'agrégation de la protéine Tau (**Caccamo *et al.*, 2010).**

OBJECTIFS ET MODÈLES D'ÉTUDE

Le peroxysome est supposé prendre part au processus de vieillissement et ses dysfonctions pourraient contribuer au développement de la maladie d'Alzheimer (**Lizard *et al.* , 2012**). Cette dernière étude a révélé une accumulation d'acides gras à très longue chaîne (C22 :0, C24 :0 et C26 :0) au niveau des lésions corticales de malades atteints de MA aux stades V et VI de la classification de Braak & Braak. Des anomalies des plasmalogènes ainsi que des diminutions de la densité en peroxysomes ont aussi été révélées au niveau des lésions (**Kou *et al.*, 2011**). Ces dysfonctions peroxysomales pourraient en partie expliquer l'accumulation des AGTLCs qui sont dégradés au niveau du peroxysome par béta-oxydation (**Wanders & Waterham, 2006**). Ces anomalies du peroxysome pourraient aussi en partie expliquer les modifications de plasmalogènes dont les deux premières enzymes sont peroxysomales (**Brites *et al*., 2004**).

Pour préciser la part prise par les AGTLCs et par le peroxysome dans la physiopathologie de la MA différentes approches complémentaires ont été mises en œuvre.

- *In vitro,* des cellules neuronales humaines SK-N-BE ont été utilisées afin de préciser les activités biologiques des AGTLCS sur des paramètres impliqués dans le développement de la MA : neurodégénérescence faisant intervenir des modifications mitochondriales, lysosomales et peroxysomales, désorganisation du cytosquellette (en particulier de la tubuline), stress oxydatif, inflammation cytokinique et non cytokinique, production d'amyloïdes béta et évaluation de l'expression d'APP, d'alpha et de béta-sécrétase.

- *Ex vivo,* sur des coupes de cerveaux de souris sauvages et transgéniques APPswe/PS1-A246E, l'expression de marqueurs du peroxysome a été recherché (catalase, ABCD3) en association avec des marqueurs de la MA (béta-amyloide 17-24, phospho Tau) et des protéines du cytosquelette (tubuline, neurofilaments) généralement altérées dans cette pathologie. Les dépôts amyloïdes ont par ailleurs été visualisés par coloration à la thioflavine T et au Rouge Congo.

- Dans le cadre d'une étude clinique réalisée à l'hôpital Fattouma Bourguiba, Monastir, Tunisie, un profil d'acides gras renseignant sur le stress oxydant et le métabolisme peroxysomal a été réalisé sur des sujets déments incluant des malades atteints de MA et des sujets contrôles appartenant à la même tranche d'âge.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Pour mener à bien les différentes études abordées i) *in vitro* pour préciser les effets des AGTLCs sur cellules neuronales en cultures, ii) dans le cadre d'une étude clinique pour tenter d'identifier de nouveaux biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer, iii) sur modèle animal pour préciser la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, plusieurs techniques ont été mises en œuvre.

I Etude *in Vitro*

1 Matériel biologique (lignée cellulaire) et anticorps utilisés

Les cellules utilisées sont des cellules SK-N-BE, ce sont des cellules de neuroblastome humaines immortalisées**.** Ces cellules sont utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires associés à la MA car elles permettent d'aborder l'amyloïdogénèse et la Tauopathie. En effet, ces cellules expriment entre autre la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), les sécrétase α et β conduisant à la production respective d'amyloïde α (sAPPα) et β (sAPPβ) ainsi que la sécrétase γ permettant d'obtenir P3 à partir de sAPPα et l'Aβ1-40 ou l'Aβ1-42 à partir de sAPPβ : ces paramètres permettent l'étude de l'amyloïdogénèse. Par ailleurs, ces cellules expriment la tubuline et la protéine Tau qui permettent l'étude de la Tauopathie (**Zhou *et al.*, 2011**). Les différents anticorps et leurs conditions d'utilisations sont listés dans le tableau suivant (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Les différents anticorps et leurs conditions d'utilisations

Spécificité	Hôte	Fournisseur	Dilution	Application
Anti-catalase	souris	Abcam (Réf : Ab 16771)	1/100 1/50	IF (conventionnelle et confocale) et CMF IHC
MitoProfile® Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail	souris	MitoSciences (Réf: Ab110411)	1/500	WB
Anti-160 kDa Neurofilaments	souris	Abcam (Ref:Ab7794	1/100	IF, IHC
Anti PMP70 (ABCD3)	lapin	Zymed (Réf: 71-8300)	1/500 1/300 1/200	IF CMF IHC
Anti ABCD2	lapin	Drs D Trompier/ S Savary / G Lizard	1/200	IHC

Suite Tableau 1

Anti ACOX1	lapin	Prof M Cherkaoui-Malki	1/100	IF IHC
Monoclonal anti PHF-tau	souris	Thermo Scientific (Réf : MN 1020)	1/100	IHC
β-Amyloïde	souris souris	Sigma-Aldrich (Réf: 39220)	1/1000 1/100	WB IHC
4HNE	souris	Chemicon (Réf:AB5605)	1/300	CMF
α-β Tubuline (B-7) α-Tubuline	souris lapin	Santa Cruz Biotechnology (Réf: sc-5286) Abcam (Réf: Ab 59680)	1/300 1/100	WB IHC
Anti-β-Actine	souris	Sigma Aldrich (Réf: A5316)	1/10000 1/500	WB IF
LAMP1	lapin	Abcam (Réf: Ab 24170)	1/300	IHC
Alexa fluor 488	lapin anti souris	Molecular probes/Invitrogen	1/300	IF, CMF
Alexa fluor 488	Chèvre anti-lapin	Molecular probes/Invitrogen (Réf: A 11034)	1/30	IHC
FITC	Lapin anti-souris	Dako (Réf: F 0232)	1/300	IHC
HRP	Chévre anti-souris	Dako (Réf: P 0447)	1/100	IHC

CMF : cytométrie en flux ; IF : immunofluorescence ; IHC : immunohistochimie. ; WB : western blotting ;

2. Culture et traitement des cellules

Le milieu employé est du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Lonza). Ce milieu de base contient des nutriments indispensables à la survie cellulaire, des ions minéraux, des cofacteurs, des vitamines, des acides aminés et surtout du glucose (substrat énergétique essentiel). Il est supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Pan Biotech) décomplémenté par chauffage pendant 30 min à 56°C qui apporte les facteurs de croissance indispensables. Pour éviter d'éventuelles proliférations bactériennes, 1% d'un

mélange d'antibiotiques (pénicilline (100 U/ml)-streptomycine (100 U/ml)) (Pan Biotech) est ajouté au milieu de culture. Cela constitue le milieu de culture complet. Le détachement des cellules en vue de leur passage est réalisé en utilisant l'action conjuguée de trypsine (0,5 mg/mL) et d'EDTA (0,2 mg/mL) (Pan Biotech). A confluence, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire est rincé avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) sans calcium ni magnésium ce qui permet de supprimer toute trace d'inhibiteurs de trypsine. Après avoir ajouté la trypsine, 3 mL par boite de Pétri (100x20 mm style, BD Biosciences), les boites sont placées à 37°C pendant 2 à 3mn et le détachement des cellules est suivi au microscope. Une fois détachées, les cellules sont dispersées dans du milieu de culture complet, puis récupérées par centrifugation (900 g pendant 5 min). Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont alors homogénéisées à la pipette dans 4 mL de milieu complet frais, puis comptées sur cellules de Malassez. Une partie de la suspension cellulaire sera réensemencée dans de nouvelles boites de Petri. L'autre partie pourra être congelée et conservée pour des cultures ultérieures. La congélation est alors faite dans les conditions suivantes : $5x10^6$ cellules / mL de milieu complet contenant 10% de DMSO ; une journée à -80°C puis stockage dans l'azote liquide.

L'acide docosanoique (C22:0), tétracosanoique (C24:0), et hexacosanoique (C26:0) (Sigma-Aldrich) ont été solubilisés dans l'α-cyclodextrine (Sigma-Aldrich) de la façon suivante : une solution d' α-cyclodextrine (20 mM) a d'abord été préparée dans du tampon tris-HCl (100 mM, pH=8) et filtrée sur filtre Millipore de diamètre 0.2 µm afin d'obtenir une solution stérile. Les acides gras ont été pesés afin d'obtenir une concentration de 400 µM. Puis, ces acides gras ont été mis en présence de la solution α-cyclodextrine (20 mM) dans des pilluliers en verre stérilisés. Le mélange a été soniqué jusqu'à obtention d'une solution homogène.

L'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6 n-3) fourni sous forme liquide a été préparé à une concentration de 4 mM dans l' α-cyclodextrine (20 mM).

L'amyloïde β1-40 (Aβ1-40, 1 mg) (Sigma Aldrich) a été dissout dans 1 mL de PBS exempt de calcium et incubé à 37°C pendant une semaine afin d'obtenir un maximum d'activité biologique. Le traitement des cellules SK-N-BE avec les acides gras à très longue chaîne (AGTLCs) a été réalisé comme suit : après 24 h d'ensemencement des cellules dans des plaques de 12 puits à raison de 200 à 400 x 10^3 cellules par puits, les cellules ont été cultivées pendant 48 h en absence ou en présence de différentes concentrations d'AGTLCs

(0 ; 0,1 ; 1 ; 5 ; 10 et/ou 20 μM) associés ou non à du DHA (5, 10, 50, 100 et 150 µM) diluées dans du milieu HAM's F-10 supplémenté avec 5% SVF (Pan Biotech) et 1% d'antibiotiques.

Le traitement des cellules SK-N-BE avec l'Aβ1-40 a été réalisé comme suit : Après 24 h d'ensemencement des cellules dans des plaques de 12 puits à raison de 400 x 10^3 cellules par puits, les cellules ont ensuite été incubées pendant 24 et 48 h en présence ou en absence d'Aβ1-40 à différentes concentrations (10, 20 ,50 et 100 µM) diluées dans le milieu HAMF-10 supplémenté avec 5% SVF (Pan Biotech) et 1% d'antibiotiques.

3. Mesure de la viabilité et de la prolifération des cellules SK-N-BE

Afin d'évaluer l'effet des AGTLCs et d'Aβ1-40 sur la viabilité et la prolifération des cellules SK-N-BE, plusieurs méthodes ont été utilisées.

3.1 Numération cellulaire en présence de bleu trypan

Le nombre total de cellules mortes et vivante a été déterminé par comptage après coloration au bleu trypan. Ce dernier est un réactif chromophore de couleur bleu chargé négativement qui a tendance à pénétrer dans les cellules. Une fois dans la cellule, la molécule va être rejetée dans le milieu extérieur. Ce mécanisme d'exclusion nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant de l'ATP peuvent le réaliser. Ainsi, une cellule vivante exclura la molécule de bleu trypan et restera réfringente au microscope alors qu'une cellule morte sera colorée en bleu.

Après 48 h de traitement avec les AGTLCs, utilisés à différentes concentrations, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récupérées et centrifugées à 900 g pendant 5 min. le culot a été resuspendu dans 1mL de milieu de culture. La coloration au bleu trypan a été réalisée en prélevant 25µL de suspension cellulaire mis en présence de 25 µL de la solution de Bleu trypan. Le comptage a été réalisé à l'aide dune cellule de comptage de type Kova.

3.2 Evaluation de la confluence par coloration au Crystal Violet

Le Crystal Violet colore les noyaux avec une couleur violet foncé aidant à la visualisation des noyaux et permettant ainsi d'évaluer la confluence cellulaire.

Après culture et traitements des cellules SK-N-BE dans des plaques 12 puits, les puits ont été rincées 2 fois avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes puis 500 µL de la solution de coloration (Crystal Violet 0,5 %, méthanol 25 %) ont été ajoutés dans chaque

puits. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'excès de colorant a été éliminé en effectuant 3 lavages des cellules avec du PBS. Les puits sont séchés (10 min, température ambiante) et 250 µL de la solution de dissolution (citrate de sodium 0,1 M, éthanol absolu 50%) ont ensuite été ajoutés pendant 10 min à température ambiante, puis l'absorbance a été mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre lecteur de plaques (MRX Revelation, Dynex Technologies).

3.3 Méthode d'évaluation de l'activité mitochondriale et de la densité cellulaire par le test MTT

Le test MTT donne une indication sur l'activité mitochondriale et la densité cellulaire. Le principe du test MTT consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT (3 [4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromure), de couleur jaune, en cristaux de bleu de formazan de couleur pourpre et insoluble (**Figure 14**). La membrane des cellules est imperméable aux cristaux de formazan causant ainsi leur accumulation intracellulaire. L'addition d'un détergent solubilise les cristaux de formazan. L'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale permet d'apprécier la toxicité cellulaire mitochondriale qui est directement corrélée avec la viabilité cellulaire mais aussi avec la densité cellulaire. Cette activité succinate déshydrogénase est appréciée par dosage spectrophotométrique.

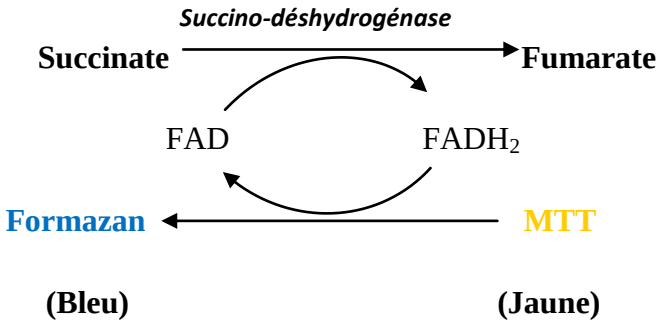


Figure 14 : ***Réaction de réduction du MTT en bleu de formazan, catalysée par la succinate-déshydrogénase en présence du coenzyme (FAD)***

Pour réaliser le test MTT, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 12 puits à raison de 400 x 10^3 cellules/puits dans un volume de 1 mL de milieu DMEM complet. Après 24 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO_2, les cellules ont été

incubées avec les AGTLCs (48 h) ou avec l'Aß1-40 (24 et 48 h), utilisés à différentes concentrations à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO_2. Après cette incubation, le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en présence d'une solution de MTT (0.05 mg/mL) diluée dans du milieu DMEM complet à raison de 1mL /puits pendant 3 h à 37°C. La solution de MTT a ensuite été éliminée et les puits ont été rincées deux fois avec du PBS. Les cristaux de formazan insolubles formés ont été dissous dans la solution de DMSO puis l'absorbance a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque (MRX Revelation, Dynex Technologies). L'activité succinate déshydrogénase est déterminée par rapport à celle des cellules contrôles.

3.4 Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par coloration au 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3))

Une différence de potentiel existe de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Cette différence est crée par les pompes à protons qui créent un gradient électrochimique (ΔΨm) entre l'espace inter-membranaire et la matrice La mesure de ΔΨm est largement utilisée pour caractériser l'activité métabolique mitochondriale et la mort cellulaire à un stade précoce.

Le potentiel transmenbranaire mitochondrial (ΔΨm) a été mesuré par coloration au DiOC6(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) et analysé par cytométrie en flux. Le DiOC6(3) ($\lambda_{Ex\ Max}$= 488 nm ; $\lambda_{Em\ Max}$= 501 nm) est un fluorochrome cationique, lipophile ; son accumulation dans la mitochondrie dépend du ΔΨm et l'intensité de sa fluorescence est inversement proportionnelle au ΔΨm.

Pour effectuer la coloration en présence de DiOC6(3), les cellules ayant subi différents traitement avec les AGTLCs pendant 48 h sont mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution mère de DiOC6(3) est préparée dans du DMSO à une concentration de 1 mM. Cette solution est par la suite diluée dans de l'eau distillée à une concentration de 20 µM et utilisée sur les cellules dans le milieu de culture à la concentration finale de 40 nM. Après 15 min d'incubation à 37°C, l'analyse est réalisée extemporanément par cytométrie en flux en prenant en compte 10 000 cellules. Le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées correspond au pourcentage de cellules DiOC6(3) négatives qui est quantifiée sur une échelle logarithmique de fluorescence.

3.5. Evaluation de la mortalité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium

L'iodure de propidium (IP) est un agent fluorescent intercalant des acides nucléiques (ADN; ARN). Il est utilisé pour quantifier la viabilité cellulaire ; il ne colore que les acides nucléiques des cellules mortes ayant perdu leur intégrité membranaire. L'IP s'excite à 305 et 538 nm et il émet une fluorescence orange/rouge avec un maximum d'émission 617 nm. La solution mère d'IP est préparée dans de l'eau milliQ à la concentration de 1 mg/mL. Cette solution est stockée à +4°C à l'abri de la lumière.

Pour évaluer la mortalité, 5-10 x 10^5 cellules sont reprises dans une solution d'IP à1 µg/mL dans le PBS. Après une incubation de 15 min à 37°C, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules mortes correspond au pourcentage de cellules IP positive. L'analyse est réalisée par cytométrie en flux en prenant en compte 10 000 cellules. La fluorescence de l'IP est sélectionnée par un filtre passe-bande 590 ± 20 nm. Cette fluorescence est quantifiée soit sur une échelle linéaire ou logarithmique. Les données sont ensuite analysées à l'aide des logiciels Flomax (Partec) ou Flowjo (Tree Star Inc.).

3.6. Dosage de l'activité lactate déshydrogénase

La mort cellulaire peut se produire soit par apoptose appelée aussi mort programmée impliquant des cascades de transduction du signal faisant intervenir des enzymes appelées caspases ou par nécrose (nécrose primaire). La nécrose est accompagnée d'altérations précoces de la membrane cytoplasmique et par un gonflement des mitochondries tandis que l'apoptose est associée à une dégradation progressive de la cellule en corps apoptotiques entourés de membrane. La rupture de la membrane cytoplasmique entraîne la libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire. En conséquence, la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme cytosolique, est libérée et son activité est mesurée dans le milieu de culture ce qui permet d'évaluer la mort cellulaire, en particulier la nécrose primaire et la nécrose secondaire (nécrose faisant suite à l'apoptose).

L'activité LDH dans le milieu de culture a été mesurée à l'aide du kit LDH (Cayman Chemical Company), selon le principe suivant **(Figure 15):**

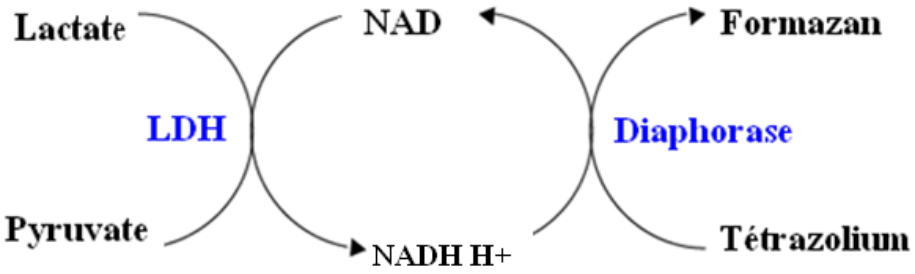


Figure 15: ***Principe du dosage de l'activité LDH.***

La mesure de la mort des cellules, en réponse au traitement, a été réalisée en utilisant une réaction à deux étapes associées. Dans la première étape, la LDH catalyse la réduction de NAD^+ en NADH et H^+ par oxydation du lactate en pyruvate. Dans la deuxième étape de la réaction, la diaphorase utilise NADH et H^+ nouvellement formée pour catalyser la réduction d'un sel de tétrazolium en formazan très coloré qui absorbe fortement à 490-520 nm. La quantité de formazan produit est proportionnelle à la quantité de LDH libérée dans le milieu de la culture à la suite d'une cytotoxicité. Pour cela, 100 µL du milieu de culture récupéré après traitement des cellules avec les AGTLCs (48 h) ou avec l'Aβ1-40 (24 et 48 h), utilisés à différentes concentrations ont été mis en présence du mélange réactionnel (NAD^+ (100X), acide lactique substrat de la lactate déshydrogénase (100X), sel de tétrazolium (100X) et diaphorase) dilué dans du tampon fournit avec le kit. Après incubation du mélange (1 h, 37°C), l'absorbance a été lue à 490 nm. L'activité LDH a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage absorbance en fonction de l'activité LDH (µU).

3.7. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Le cycle cellulaire évalué par cytométrie en flux permet de détecter 3 phases (**Figure 16**). Durant la première phase (phase G0/G1), la cellule est en dehors du cycle (cellules quiescentes : G0) ou croit et devient plus large (G1), il y a synthèse de protéines permettant la division cellulaire. A partir d'une certaine taille, la cellule entre dans la deuxième phase (S), dans laquelle débute la synthèse de l'ADN. Dans la troisième phase (G2), la cellule se prépare à la division cellulaire (Mitose : M).

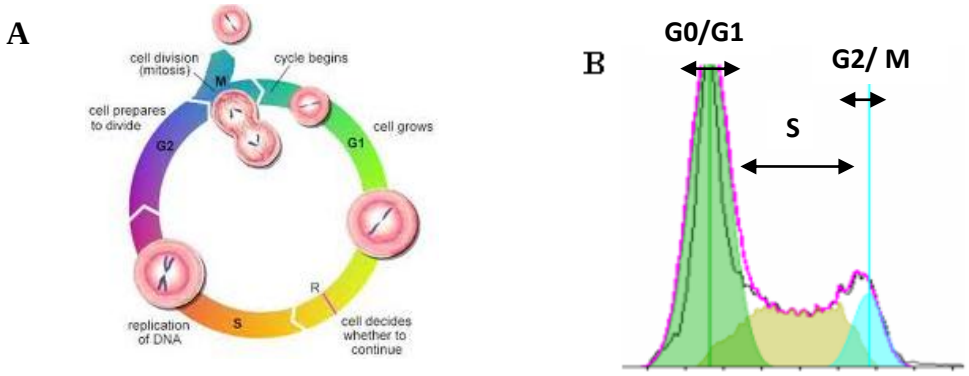


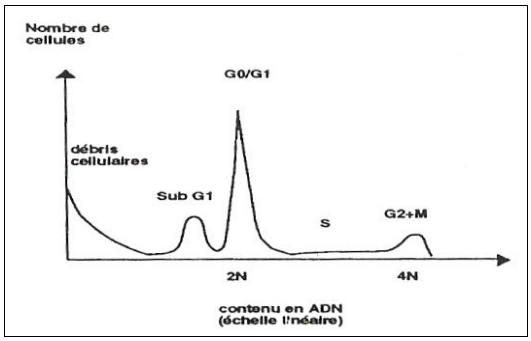
Figure 16 : ***Représentation du cycle cellulaire (A) et analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle selon le modèle de Dean & Jett (B).***

La méthode d'analyse du cycle cellulaire, par cytométrie en flux, est basée sur l'émission de la fluorescence des noyaux marqués à l'IP. L'IP est un fluochrome qui s'intercale de façon stœchiométrique entre les acides nucléiques en émettant une fluorescence rouge. En présence de RNAses, la fluorescence de l'IP est proportionnelle à la quantité d'ADN. Les cellules ont été détachées de leur support par trypsination, rincées deux fois au PBS puis fixées à l'éthanol froid (-20°C) pendant 12 h. Les cellules fixées ont été ensuite rincées deux fois avec du PBS et incubées avec 10 µg/mL de RNase A (Sigma) et 50 µg/mL d'IP pendant 1 h à 37°C. La fluorescence de l'IP a été quantifiée sur un cytométre en flux Galaxy (Partec) en prenant en compte 10 000 cellules. L'acquisition des données a été faite avec le logiciel Flomax ; les analyses ont été réalisées avec le logiciel FlowJo (Tree Star Inc.) selon le modèle de Dean-Jett Fox (**Figure 16 B**). Le modèle de Dean & Jett aussi appelé « SOBR (Sum of Broadened Rectangle) method » repose sur des algorithmes sophistiqués évaluant les phases G0/G1 et G2+M par des courbes gaussiennes et la phase S par un polynome.

3.8. Détection des cellules en phase Sub-G1

L'analyse du cycle cellulaire peut faire apparaître un pic Sub-G1 (pic précédent les cellules en G0/G1 détectées par cytométrie en flux) **(Ormerod *et al.*, 1992).** Ce pic Sub-G1 (**Figure 17**) est représentatif d'une population cellulaire apoptotique, caractérisée par une condensation et/ou une fragmentation nucléaire associée à une fragmentation internucléosomale de l'ADN. En effet, lors du protocole opératoire mis en œuvre pour

l'étude du cycle, les cellules sont perméabilisées avec de l'éthanol à -20°C créant des micropores dans la membrane cytoplasmique. Ces micropores permettent la pénétration de l'IP qui pourra aller s'intercaler dans l'ADN. Au cours des « lavages » successifs des cellules, les micropores laissent échapper dans le milieu extracellulaire les petits fragments d'ADN résultant de l'apoptose. Les cellules apoptotiques se retrouvent alors avec un contenu en ADN fortement diminué, mais néanmoins marquées par l'IP, générant ainsi le pic Sub-G1.



<u>Figure 17</u>: ***Schéma représentant la phase Sub-G1 par rapport aux autres phases du cycle cellulaire.***

4. Caractérisation morphologique de la mort cellulaire induite par les AGTLCs

4.1 Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie en contraste de phase

La morphologie des cellules SK-N-BE a été étudiée en plaques 12 puits après 48 h de traitement par les AGTLCs à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Axiovert 40CFL, Zeiss) équipé d'une caméra Axiocam utilisée pour digitaliser les images.

4.2 Analyse de la morphologie des noyaux par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342

La coloration avec le Hoechst 33342 est utilisée pour distinguer entre mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. Au cours de l'apoptose, les cellules mortes se caractérisent par des noyaux condensés et /ou fragmentés alors que les cellules nécrotiques en fonction de leur progression dans le processus de nécrose ont soit des noyaux gonflés (cellules oncotiques), soit des noyaux recroquevillés, plus petits au contour diffus. En revanche, les cellules vivantes ont des noyaux ronds et réguliers (**Majno & Joris, 1995; Lizard *et al*., 1995**).

Les cellules SK-N-BE ensemencées et traitées pendant 48 h avec différentes concentrations d'AGTLCs ont été collectées par trypsination, fixées avec du PFA 1% puis déposées (150 µL desuspension cellulaire contenant environ 40 000 cellules) sur lame à l'aide d'une cytospine (Shandon ; 1 200 tours/min, 5 min). Une goutte de Hoechst 33342 (1 µg/mL) est ensuite appliquée sur le champ cellulaire et incubée pendant 5 min à température ambiante. Après rinçage en PBS et montage entre lame et lamelle avec le liquide de montage Dako, les lames sont stockées à + 4°C. Les cellules colorées au Hoechst 33342 sont observées sous Ultraviolet à l'aide d'un microscope droit à fluorescence (Axioskop, Zeiss).

4.3 Etude l'ultrastructure cellulaire par microscopie à transmission électronique

La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon et l'utilisation d'un système de lentilles magnétiques donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0.8 Angstrom.

Dans notre travail, la microscopie à transmission électronique a été utilisée pour visualiser les modifications ultrastructurales induites par les AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0 utilisés à 10 µM). Pour cela, les échantillons ont été fixés pendant 1 h à 4°C avec le glutaraldehyde 2.5 % dilué en tampon cacodylate (0.1 M pH 7.4), lavés deux fois dans le tampon cacodylate, puis post-fixés au tétroxyde d'osmium 1% dilué dans le sodium cacodylate (0.1 M, pH 7.4) pendant 1 h à température ambiante dans l'obscurité et rincés deux fois dans le tampon cacodylate. Les préparations ont été alors déshydratées par des bains dans des gradients d'éthanol croissants (50, 70, 90 et 100%), puis inclus en Epon. Des sections ultrafines ont été réalisées avec un ultramicrotome au tranchant de diamant. Les coupes ont été colorées pendant plusieurs minutes avec une solution aqueuse alcoolisée d'acétate d'uranyle pour contraster différentiellement les différentes structures puis avec du citrate de plomb aqueux et enfin examinées au microscope électronique H7500 (Hitachi).

5. Analyse de l'effet des AGTLCs sur les organites cellulaires : mitochondrie, lysosome et peroxysome

5.1 Analyse des effets des AGTLCs sur la mitochondrie

5.1.1 Détermination de la masse et de la distribution des mitochondries par coloration au MitoTraker Red

La sonde MitoTracker (Molecular Probes/Invitrogen) utilisée traverse la membrane par diffusion passive pour s'accumuler dans les mitochondries métaboliquement actives. L'accumulation du MitoTracker au niveau mitochondrial ne dépend pas du ΔΨm. En effet, la présence d'un groupement chlorométhyl réactif lui permet de rester dans la membrane mitochondriale malgré une chute du potentiel ΔΨm permettant ainsi une fixation des cellules à analyser.

Pour évaluer la distribution des mitochondries (topographie mitochondriale) dans les cytoplasmes cellulaire, les cellules SK-N-BE, ensemencées sur des lamelles en verre et traitées avec différentes concentrations d'AGTLCs pendant 48h ont été incubées avec la solution de MitoTracker Red ($\lambda_{Ex\ Max}$=579 ; $\lambda_{Em\ Max}$=599) à 1 µM pendant 15 min à 37°C. A la fin de l'incubation, les cellules ont été rincées en PBS, fixées avec du paraformaldehyde 2% pendant 10 min à +4°C et rincées deux fois en PBS. Après montage entre lame et lamelle avec du liquide de montage (Dako), les lames ont été stockées à +4°C à l'abri de la lumière pour être observées ultérieurement avec un microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss). Les images ont été digitalisées avec une caméra Axiocam (Zeiss).

Pour étudier la masse mitochondriale et/ou la quantité de mitochondries par cellules, les cellules SK-N-BE, ont été ensemencées dans des plaques 12 puits et traitées avec différentes concentrations d'AGTLCs pendant 48 h. Les cellules ont été collectées par trypsination et incubées avec le Mitotraker Red à 1 µM pendant 15 min à 37°C. Ensuite, un rinçage des cellules avec du PBS a été effectué et les cellules ont été resuspendues dans 1 mL de PBS pour tre analysées par cytométrie en flux avec un cytomètre Galaxy (Partec).

5.1.2 Dosage de l'ATP

L'ATP (ou Adénosine Tri-Phosphate) est un intermédiaire énergétique majeur et obligatoire de nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. Il est produit par la mitochondrie au cours de la phosphorylation oxydative.

Pour effectuer le dosage de l'ATP, on mesure la lumière émise par la réaction enzymatique de bioluminescence utilisant la luciférine et la luciférase de luciole, ainsi que de

l'ATP. L'ATP intervient dans l'étape d'activation du complexe luciférase-luciférine, dont l'oxydation est à l'origine d'une émission lumineuse proportionnelle à la quantité d'ATP. En utilisant la luciférine et la luciférase de la luciole, il est donc possible, à l'aide d'un fluorimètre d'obtenir une évaluation de la quantité d'ATP dans un échantillon. La valeur obtenue en unité relative de lumière (URL), permettra grâce à un étalon d'estimer la quantité d'ATP.

Le dosage de l'ATP a été réalisée en utilisant le kit « ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II » (Roche Molecular Biochemicals).

Pour doser l'ATP, une lyse des cellules collectées par trypsination après traitement avec les AGTLCs, a été réalisée. Pour cela 100 µL d'eau bi-distillée ont été ajoutées aux cellules et après10 min d'incubation à température ambiante, une centrifugation a eu lieu à 1000 g pendant 5 min. Le surnageant récupéré a servi au dosage de l'ATP et au dosage des protéines totales. Une gamme étalon a été préparée à partir d'une solution mère d'ATP (10,5 mg/mL) en utilisant l'ATP lyophilisé fourni par le kit. 50 µL de luciférase ont été ajoutés à 50 µL de chaque lysat cellulaire et à chaque point de la gamme afin de mesurer la bioluminescence de chaque échantillon. La courbe d'étalonnage a été tracée et a servi pour le calcul de la concentration cellulaire en ATP.

Pour le dosage de l'ATP mitochondrial, une élimination de l'ATP provenant de la glycolyse a été faite par traitement des cellules avec l'iodoacétate (25 µmol/L) pendant 1 h.

5.2 Analyse des effets des AGTLCs sur le lysosome : Evaluation du pourcentage de cellules avec des lysosomes déstabilisés par coloration à l'acridine orange

La déstabilisation de la membrane lysosomale peut être étudiée par coloration à l'acridine orange (AO). L'AO ($\lambda_{Exc\ Max}$ = 502 nm, $\lambda_{Em\ Max}$ = 525 nm) est une sonde lysosomotropique lipophile, cationique, capable de traverser la membrane cytoplasmique et celle des organites cellulaires. L'AO est un colorant métachromatique qui se caractérise par sa capacité à émettre une fluorescence verte en milieu basique et une fluorescence orange/rouge en milieu acide. La quantité de fluorescence orange/rouge sera donc proportionnelle au volume et à la quantité de compartiments acides dans la cellule. La perméabilisation de la membrane lysosomale se caractérise par une diminution de la fluorescence orange/rouge.

Les cellules, à raison de 2 x 10^5 cellules par tube, ont été mises en suspension dans 1 mL de PBS. Afin d'évaluer les cellules à membrane lysosomale perméable, la suspension cellulaire a été incubée en présence de 1 µg/mL d'AO pendant 15 min à 37°C. L'analyse a été

réalisée extemporanément par cytométrie en flux; les fluorescences verte et rouge ont été sélectionnées respectivement par des filtres passe-bande 520 ± 20 nm et passe-long 630 nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence est quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique en utilisant en cytomètre en flux Galaxy (Partec).

5.3 Analyse des effets des AGTLCs sur le peroxysome

5.3.1 Étude de la topographie et de l'expression du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3/PMP70 par immunofluorescence indirecte

La topographie et l'expression d'ABCD3 ont été respectivement étudiées par microscopie à fluorescence conventionnelle et cytométrie en flux.

Le transporteur ABCD3 (ATP binding cassette transporter D3)/PMP70 (70-Peroxisomal Membrane protein)) est un constituant majeur de la membrane peroxysomale. Il assure un rôle important dans la fonction cellulaire et dans le métabolisme lipidique **(Schrader & Fahimi, 2008)**

Les peroxysomes sont impliqués dans le processus de β-oxydation des AGTLCs. Une altération des fonctions peroxysomales peut induire des modifications lipidiques délétères. ABCD3 peut être identifié par immunofluorescence indirecte et quantifié par cytométrie en flux **(Baarine *et al.*, 2009).**

Pour l'analyse par immunofluorescence par cytométrie en flux, les cellules ont été cultivées dans les plaques de cultures de 12 puits. Après 48 h de traitement avec différentes concentrations d'AGTLCs, les cellules ont été collectées par trypsination puis fixées avec du paraformaldéhyde à 2% dilué dans du PBS pendant 10 min à +4°C et ensuite lavées par 2 mL de PBS. Les cellules ont alors été perméabilisées et les sites non spécifiques ont été bloqués par incubation des cellules avec une solution de saturation (PBS, 10% SVF, 0,05% saponine) pendant 30 min. Après rinçage des cellules en PBS, 100 µL d'anticorps polyclonal de lapin (Zymed) dirigé contre ABCD3/PMP70 et dilué au 1/500 dans la solution de saturation ont été ajoutés sur le culot cellulaire. Après 1 h d'incubation à +4°C, les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS et 100 µL d'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (Invitrogen/Molecular Probes) (dilué au 1/300 dans la solution de saturation) ont été ajoutés. Après 30min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées 2 fois avec 1 mL du PBS et resuspendues dans 1 mL de PBS. L'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La lumière verte a été collectée par un filtre passe-bande 520 ± 20nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence a été quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. Les données ont été analysées avec les logiciels Flomax et FlowJo.

Pour définir la taille des peroxysomes ainsi que leur topographie au sein de la cellule, l'immunomarquage ABCD3 a été réalisé sur des cellules ensemencées sur lamelles en verre de 14 mm et traitées avec les AGTLCs. A la fin de l'immunomarquage (réalisé selon la même procédure qu'en cytométrie en flux) les préparations on été montées entre lame et lamelle en présence de milieu de montage Dako et stockées au moins une nuit à+4°C avant d'être observées avec un microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss).

5.3.2 Étude de la topographie et de l'expression de la catalase par immunofluorescence indirecte

La topographie et l'expression de la catalase ont été respectivement étudiées par microscopie à fluorescence conventionnelle et confocale et par cytométrie en flux.

L'analyse de la catalase par immunofluorescence indirecte a été effectuée sur des cellules ayant été cultivées dans des plaques de cultures de 12 puits et traitées pendant 48 h avec différentes concentrations d'AGTLCs.

Pour l'analyse par cytométrie en flux, Les cellules ont été collectées par trypsination puis fixées avec du paraformaldéhyde à 2% dilué dans du PBS pendant 10 min à +4°C et ensuite lavées par 2 mL de PBS. Les cellules ont été alors perméabilisées et les sites non spécifiques ont été bloqués par l'incubation des cellules avec une solution de saturation (PBS, 10% SVF, 0,05% saponine) pendant 30 min. Après rinçage des cellules en PBS, 100 µL d'anticorps dirigé contre la catalase (Abcam) dilué au 1/100 dans la solution de saturation ont été ajoutés sur le culot cellulaire. Après 1 h d'incubation à +4°C, les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS et 100 µL d'anticorps secondaires Alexa Fluor 488 (Molecular Probes/Invitrogen) (dilué au 1/300 dans la solution de saturation) ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées 2 fois avec 1 mL de PBS et resuspendues dans 1 mL de PBS. L'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La lumière verte a été collectée par un filtre passe-bande 520 ± 20 nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence a été quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. Les données ont été analysées avec les logiciels Flomax et FlowJo.

Pour analyser la taille et la topographie des peroxysomes au sein de la cellule, l'immunomarquage de la catalase a été réalisé sur des cellules ensemencées sur lamelles en verre de 14 mm et traitées avec les AGTLCs. A la fin de l'immunomarquage (réalisé selon la même procédure qu'en cytométrie en flux) les préparations on été montées entre lame et lamelles en présence de milieu de montage Dako et stockées au moins une nuit à +4°C avant

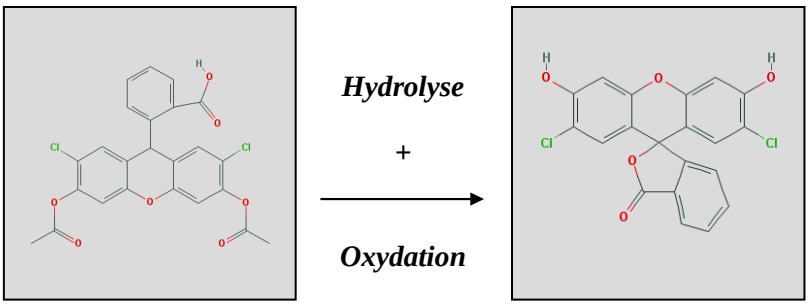
d'être obsevées soit avec un microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss), soit avec un microscope confocale (Leica).

6. Dosage des marqueurs du stress oxydatif

6.1 Evaluation de la surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène et de l'azote par coloration avec H_2DCFDA

Le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H_2DCFDA) est utilisé pour quantifier *in situ* les espèces réactives de l'oxygène (ERO) tel $OH^{\cdot}$ et ROO^{-} et de l'azote (ERN) tel que $NO^{\cdot}$ et $ONOO^{-}$. Cette sonde pénètre dans la cellule où elle sera clivée par les estérases intracellulaire en 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine (DCFH) qui une fois oxydé par une variété des ERO et des ERN donne naissance à la molécule fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (**Figure 18**).

.



2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H_2DCFDA) **2',7'-dichlorofluorescein (DCF)**

Figure 18 : ***Schéma d'oxydation de H_2DCFDA en DCF*** **(Bass *et al.*, 1983)**

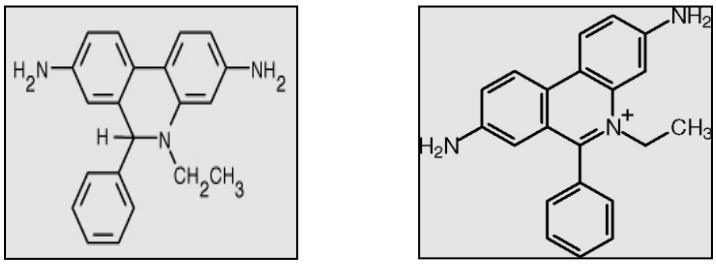
Le DCF s'excite à 494 nm et émet dans le vert à 517 nm. La solution mère de H_2DFDA est préparée extemporanément dans de l'éthanol absolu à la concentration de 5 mM. Le H_2DFDA est utilisé à 10 µM sur les cellules

Pour évaluer la production d'ERO et ERN, les cellules à raison de 5-10 x 10^5 ont été reprises dans un 1mL de PBS ou de milieu de culture avec 10 µM de H_2DCFDA puis incubées 30 min à 37°C à l'abri de la lumière. Les cellules ont ensuite été analysées extemporanément par cytométrie en flux sur un cytomètre Galaxy (Partec) en collectant la fluorescence verte avec un filtre passe-bande 520 ± 20 nm en prenant en compte 10 000 cellules sur une échelle logarithmique de fluorescence. Un contrôle positif a été utilisé en traitant de l'antimycine A (50 µM) ou H_2O_2 (10 µM). Les données ont été analysées avec les logiciels Flomax et FlowJo.

6.2 Evaluation de la production des anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux et par cytométrie en flux

Les cellules, ensemencées dans des plaques de 12 puits et ayant subi différents traitement avec les AGTLCs pendant 48 h, ont été trypsinées et mises en suspension dans 1 mL de PBS. La production intracellulaire d'anion Superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) a été détectée avec la dihydroethidine DHE (Molecular Probes/Invitrogen). Le DHE est un composé non-fluorescent qui peut diffuser à travers les membranes cellulaires et qui est rapidement oxydé en ethidium fluorescent ($\lambda_{Ex\ Max}$= 488 nm ; $\lambda_{Em\ Max}$= 575 nm) sous l'action d'$O_2^{\cdot-}$. L'ethidium se fixe ensuite de façon covalente au niveau des bases azotés de l'ADN. Ceci permet sa rétention dans la cellule et donc sa détection par cytométrie en flux (**Figure 19**).

La solution mère de (DHE) a été préparée dans du DMSO à une concentration de 1,6 mM. Cette solution est par la suite utilisée sur les cellules à la concentration finale de 2 µM. Après 15 min d'incubation à 37°C, l'analyse est réalisée par cytométrie en flux sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence de l'ethidium produit collectée par un filtre band pass 590 ± 20 nm est mesurée sur une échelle logaritmique de fluorescence en prenant en compte 10 000 cellules. Les données ont été analysées avec les logiciels Flomax et FlowJo.



Dihydroethidine (DHE) ***Ethidium fluorescent (HE)***

Figure 19 : Schéma *d'oxydation de DHE en HE (Rothe & Vallet, 1990)*

La production mitochondriale d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) a été détectée avec le MitoSOX (Molecular Probes/Invitrogen). Le MitoSOX ™ Red est un dérivé cationique de la dihydroethidine (Ref Bouquin Molecular Probes). Il pénètre dans les cellules vivantes et se fixe spécifiquement aux mitochondries. Une fois dans la mitochondrie, le MitoSOX ™ Red est oxydé par les anions superoxydes et émet une fluorescence rouge ($\lambda_{Ex\ Max}$ = 510 nm; $\lambda_{Em\ Max}$ = 580 nm). Ce fluorochrome est oxydé par les anions superoxydes, et faiblement par d'autres ERO ou ERN (**Figure 20**).

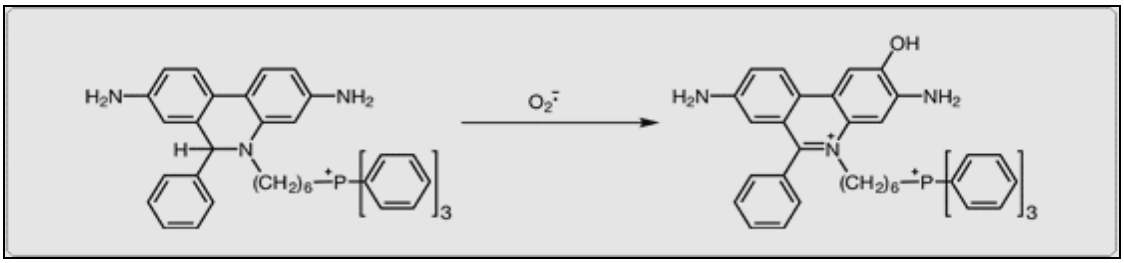


Figure 20: ***Oxydation du MitoSOX ^{TM} Red par les anions superoxydes***

Les cellules, ensemencées dans des plaques de 12 puits et ayant subit différents traitements avec les AGTLCs pendant 48 h, ont été trypsinées et mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution de MitoSOX qui a été initialement préparé à 5 mM dans du PBS est utilisés sur les cellules à 5 µM. Les cellules ont été incubées pendant 15 min à 37°C avant d'être analysées avec un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence orange/rouge est collectée par un filtre band pass 590 ± 20 nm. Elle est mesurée sur une échelle logaritmique de fluorescence en prenant en compte 10 000 cellules. Les données ont été analysées avec les logiciels Flomax et FlowJo.

6.3 Evaluation de la production de monoxyde d'azote par le 4,5-Diaminofluorescein diacétate

La production du monoxyde d'azote (NO) intracellulaire a été détectée à l'aide du DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate) (Molecular Probes/Invitrogen). À l'intérieur des cellules, le DAF-FM diacétate réagit rapidement avec le NO et principalement avec le trioxyde d'azote (N_2O_3) pour former un composé fluorescent le trizolofluorescein ($\lambda_{Ex\ Max}$ = 485 nm; $\lambda_{Em\ Max}$ = 535 nm). L'intensité de la fluorescence reflète donc la quantité de NO présente dans la cellule.

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 12 puits et traitées avec différents concentrations d'AGTLCs pendant 48h. Ensuite, les cellules ont été trypsinées et mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution DAF-FM a été préparée à 5 mM dans du DMSO et utilisé à 10 µM sur les cellules (10^6 cellules/mL de PBS). Après 15 min d'incubation à 37 °C, les cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux Galaxy (Partec) en prenant en compte 10 000 cellules. Le signal fluorescent a été sélectionné par un filtre passe bande à 520 ± 20 nm sur une échelle logarithmique de fluorescences. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Flomax.

6.4 Evaluation de la production de peroxyde d'hydrogène par coloration à la Dihydrorhodamine 123

La Dihydrorhodamine 123 (DHR123) est un fluorochrome lipophile sensible au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La DHR123 pénètre facilement dans la cellule et les compartiments intracellulaires. La DHR123 est oxydé par H_2O_2 et forme un composé cationique fortement fluorescent, la Rhodamine 123 (RH123), ($\lambda_{Ex\ Max}$ = 505 nm ; $\lambda_{Em\ Max}$ = 529 nm) qui est incapable de traverser les membranes. Ainsi, la fluorescence RH123 reflète le niveau de H_2O_2 intracellulaire.

Pour doser la production de H_2O_2 intracellulaire, les cellules, ayant subit différents traitements avec les AGTLCs pendant 48 h, sont récupérées par trypsination et mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution mère de DHR123 (Sigma-Aldrich) a été préparée à 2 mM dans du DMSO et utilisé à 6 µM sur les cellules (10^6 cellules / mL de PBS). Après 15 min d'incubation à 37 °C, les cellules ont été analysées sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec). Le signal fluorescent vert a été collecté par un filtre passe-bande à 520 ± 20nm, en prenant en compte 10 000 cellules sur une échelle logarithmique de fluorescences. Les données en été analysées avec le logiciel FloMax.

6.5 Quantification du GSH par coloration au monochlorobimane

Le monochlorobimane (MCB, Sigma) est un composé qui devient fluorescent lorsqu'il est complexé avec une fonction thiol (-SH). Le glutathion réduit possède une fonction –SH, ce qui va donc nous permettre de le doser après réaction enzymatique catalysée par la glutathion S transférase, avec le MCB. Ce fluorochrome est excité de façon maximum par les UV à 390 nm et émet une fluorescence maximum après réaction avec le glutathion réduit (liaison covalente au niveau de la cystéine à 478 nm.

Les cellules ayant subi différents traitements avec les AGTLCs pendant 48 h ont été récupérés par trypsination et mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution mère de monochlorobimane (MCB) utilisée pour quantifier le glutathion réduit (GSH) **(Hedley & Chow, 1994**) a été préparée dans de l'éthanol absolu à une concentration de 4 mM. Cette solution est par la suite utilisée sur les cellules dans le milieu de culture à la concentration finale de 200 µM. Après 30 min d'incubation à 37°C, un lavage avec du PBS est réalisé. Les suspensions cellulaires sont ensuite déposées sur des lames en verre par cyto-centrifugation à l'aide d'une cytospine (Shandon, 1 200 tours/min, 5 min). Une observation des cellules montées entre lame et lamelle avec un liquide de montage (Dako) est faite sous UV à l'aide

d'un microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss). Un comptage des cellules fluorescentes (contenant du GSH) et non fluorescentes (ne contenant pas de GSH) est réalisée en prenant en compte un total d'au moins 300 cellules par lame.

6.6 Mesure de l'activité superoxyde dismutase et catalase

6.6.1 Extraction et dosage des protéines

L'extraction des protéines a été réalisée sur 8-12 × 10^6 cellules dans les conditions suivantes : les cellules ont été mélangées avec 1 mL PBS contenant un mélange d'inhibiteurs de protéase (Roche Diagnostics Inc). Les cellules ont ensuite subit trois cycles de congélation-décongélation successives. Les échantillons ont été soniqués, centrifugés (20 000 g ; 30 min) et le surnagent, constituant la solution enzymatique, a été récupéré.

La concentration de protéine totale a été dosée comme suit : le réactif utilisé est constitué d'acide bicinchoninique (BCA) et d'ions cuivriques en milieu alcalin (kit BCA, Interchim). Les ions cuivreux générés par réduction par les liaisons peptidiques forment avec le BCA un complexe stable et intensément coloré en bleu. Le dosage a été réalisé en microplaques. Pour cela,un volume de l'extrait protéique (2,5 µL) a été mis en présence de 175 µL du mélange BCA et d'ions cuivreux (50:1). Une incubation de 30 min à 37°C a ensuite été réalisée et l'intensité de la coloration a été mesurée à 570 nm. La concentration protéique des échantillons a été calculée à partir d'une gamme d'étalonnage d'albumine sérique bovine (BSA).

6.6.2 Mesure de l'activité catalase

Après préparation des extraits protéiques, l'activité catalase a été quantifiée avec le kit Amplex Red Catalase Assay Kit (Invitrogen).

Le principe du dosage de l'activité catalase est le suivant. La catalase réagit d'abord avec H_2O_2 pour produire de l'eau et l'oxygène (O_2). Ensuite, le réactif Amplex Red réagit avec H_2O_2 n'ayant pas réagi en présence de peroxydase du raifort noir (HRP) pour produire un produit d'oxydation fortement fluorescent, la résorufine. Une forte activité catalase se traduit donc par une petite quantité de résorufine formée. La solution stock d'Amplex Red a été préparée dans du DMSO et stockée à -20°C. Le milieu réactionnel contenant 25 µL de H_2O_2 (20 µM en concentration finale) et 25 µL de solution enzymatique a été incubée à température ambiante pendant 30 min. À la fin du temps d'incubation, 50 µL de mélange de réaction (Amplex Red 100 µM ; 0,4 U/mL HRP) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 37°C

pendant 30 min. L'absorbance de la solution de résorufine formée a été mesurée à 570 nm en utilisant le spectrophotomètre lecteur de plaques (MRX Revelation, Dynex Technologies). Une unité de l'enzyme est définie comme 1 µmol de H2O2 consommée par minute et l'activité spécifique a été normalisée par rapport à la quantité de protéine totale et a été exprimée en unités par milligramme de protéine.

6.6.3 Mesure de l'activité de la SOD

La Superoxyde Dismutase (SOD) est l'une des enzymes antioxydantes les plus importantes. Elle catalyse la dismutation des anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) pour donner l'eau oxygénée (H_2O_2) et l'oxygène moléculaire (O_2).

Après préparation des extraits protéiques des cellules traitées avec les AGTLCs, l'activité SOD a été quantifiée en utilisant le kit « SOD Assay Kit-WST » (Dojindo Molecular Technologies).

Le principe de dosage repose sur l'utilisation du sel de tetrazolium WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-*2H*-tetrazolium, monosodium salt) hautement soluble dans l'eau et qui produit du formazan hydrosoluble suite à sa réduction avec les anions superoxydes. Le taux de la réduction de WST-1 avec $O_2^{\cdot -}$ est lié à l'activité de la xanthine oxydase (XO) qui catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique et génère des $O_2^{\cdot -}$ dans le milieu. La réduction de WST-1 est inhibée par la SOD (**Figure 21**) ce qui permet de déterminer l'IC50 (concentration inhibant de 50 % l'activité de la SOD) par méthode colorimétrique.

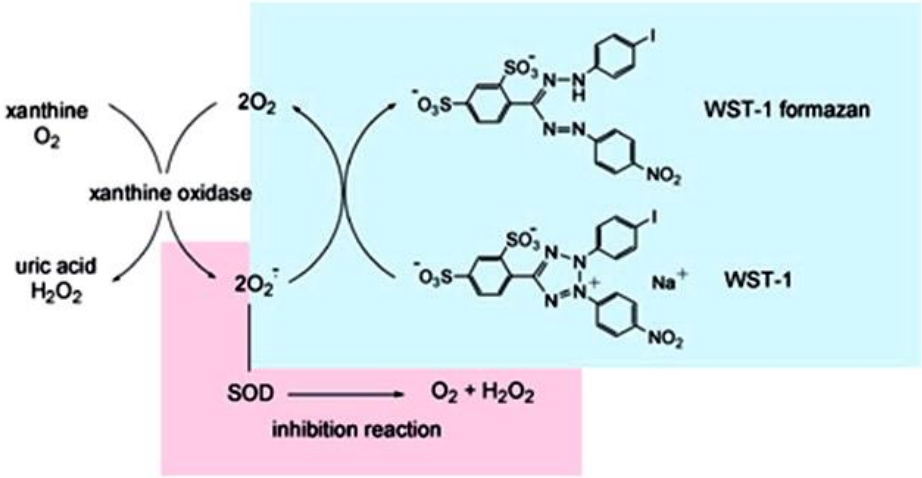


Figure 21: ***Principe de dosage de l'activité SOD***

Dans une plaque de 96 puits, 20 µL d'extraits protéiques ont été mis en présence de 200 µL de solution WST-1 et de 20 µL de solution (Enzyme working solution). Après agitation, le mélange a été incubé à 37°C pendant 20 min et l'absorbance a été lue à 450 nm en utilisant le spectrophotomètre lecteur de plaques (MRX Revelation, Dynex Technologies). Une gamme d'étalonnage a été réalisée et a permis de calculer l'activité de l'enzyme.

6.7 Détection et quantification du 4-hydroxy-2-nonénal par immunofluorescence indirecte et analyse par cytométrie en flux

Le 4-hydroxy-2-nonénal (4-HNE) est le produit majeur formé par la peroxydation lipidique, c'est un produit de dégradation final des acides gras insaturés (**Khatoon *et al.*, 2012**) . Le dosage du 4-HNE a été réalisé sur des cellules SK-N-BE ensemencées dans des plaques de 12 puits et traitées par les AGTLCs. Après 48 h de traitement, les cellules ont été collectées par trypsination, fixées avec du PFA 2% pendant 10 min à +4 °C puis lavées avec du PBS. Afin de perméabiliser la membrane cytoplasmique et bloquer les sites antigéniques non spécifiques, les cellules ont été mises en présence d'une solution de saturation (PBS, 10% SVF ; 0,05% saponine) durant 30 min à température ambiante.

Le 4-HNE a été détecté par un anticorps monoclonal de souris anti 4-HNE (Abcys) dilué dans la solution de saturation (2 µg/mL). Après 1 h d'incubation, les cellules ont été lavées avec du PBS et mises en présence pendant 30 min de l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (Molecular Probes/Invitrogen) préparé au 1/300 dans la solution de saturation. Après eux lavages en PBS, les cellules ont été resuspendues dans 1mL de PBS et analysées avec un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence a été recueillie par un filtre band pass à 520 ± 20 nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence a été quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. L'acquisition des données a été faite avec le logiciel Flomax et leur analyse a été réalisée par le logiciel FlowJo.

6.8 Détection et quantification des dérivés oxydés du cholestérol par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

6.8.1 Hydrolyse des esters

Dans un tube de 10 mL contenant 500 µL de cellules traitées avec les AGTLCs ou l'A$\beta_{1\text{-}40}$ pendant 48 h, 2 mL de méthanol, 200 µL de KOH à 10 M, 5 µL de butylhydroxytoluène à 2 mM dans l'éthanol (permettant d'éviter l'auto-oxydation), 100 µL d'une solution acqueuse d'EDTA à 20 mM, 10 µL d'une solution éthanolique

d'épicoprostanol à 100 µg/mL (étalon interne pour le dosage du cholestérol), 10 µL d'une solution éthanolique de 19-hydroxycholestérol à 10 µg/mL (étalon interne pour le dosage des oxystérols) et 2 mL d'éther éthylique ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été incubés 2 h à 37°C.

6.8.2 Extraction des oxystérols

Dans les tubes, 2 mL d'acide acétique ont été ajoutés suivi après agitation de 2 mL d'hexane. Les tubes ont été agités 5 min et centrifugés 5 min à 1 500 g. La phase organique supérieure a été récupérée entube de 10 mL et évaporée a sec sous azote.

6.8.3 Dérivation

L'extrait sec est repris avec 5 mL de mélange BSTFA (Bis (triméthylsily) trifluoroacetamide) et TMCS (Triméthylchlorsilane) (4 :1,v :v). Après incubation de 45 min à 80°C, la phase organique a été évaporée à sec sous azote et l'extrait sec a été repris dans 50 µL d'hexane.

6.8.4 Analyse par CPG/ SM

Pour l'analyse par CPG/SM, une calibration est nécessaire. Une gamme a été réalisée de la façon suivante : des tubes contenant 500 µL de NaCl et 5,10, 20, 40 µL de cholestérol à 2 mg/mL , 25 µL de 7β-hydroxycholestérol à 10 µg/mL , 25 µL de 7 α-hydroxycholestérol à 10 µg/mL, 25 µL de 7-cétocholestérol à 10 µg/ mL et 25 µL de 27- hydroxycholestérol à 10 µg/ mL, ont été traités de la même manière que les échantillons depuis l'hydrolyse des esters.

La séparation a été réalisée sur une colonne HP-5MS de 30 m x 0,25 mm et 0,25 µm d'épaisseur de film. Le chromatographe en phase gazeuse est un appareil HP6890. La température du four était programmée de 180°C à 260°C à 10°C/min, puis de 260°C à 280°C à 10°C/min et maintenue à 280°C pendant 5 min. Le chromatographe était couplé à un détecteur de masse à simple quadripôle HP5973. La température de l'interface était de 280°C celle du quadripôle de 150°C et celle de la source de 230°C. La quantification a été faite à partir du rapport entre les surfaces des pics correspondant aux ions choisis pour les composés à doser et à celles des ions choisies pour les étalons internes. Ce rapport a été comparé à des courbes d'étalonnage réalisées dans les mêmes conditions d'analyse à partir de produits standards.

7. Analyse des effets des AGTLCs sur le cytosquelette

7.1 Coloration des filaments d'actine par la Rhodamine-phalloïdine

Les cellules ensemencées sur des lamelles en verre stériles et traitées avec les AGTLCs ont été fixées avec du paraformaldehyde 2% pendant 10min et lavées 3 fois en PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées et les sites non spécifiques ont été bloquées par incubation avec une solution de PBS, 10% SVF et 0,05 % saponine, pendant 30min à température ambiante. Les filaments d'actine ont ensuite été colorés avec 200 µL de solution de Rhodamine-phalloïdine à 0,1 µM pendant 30 min à 37°C. Après des lavages en PBS, les noyaux des cellules ont été colorés avec du Hoechst 33342 (0,1 µg/mL) et le montage des lamelles a été réalisé avec le liquide de montage Dako. Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss). Les images ont été digitalisées à l'aide d'une caméra Axiocam (Zeiss) en utilisant un objectif x 100 à immersion à huile.

7.2 Immunomarquage des neurofilaments

Les cellules ensemencées sur des lamelles en verre stériles et traitées avec les AGTLCs ont été fixées avec du paraformaldehyde 2% pendant 10 min et lavées 3 fois en PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées et les sites non spécifiques ont été bloquées par incubation avec une solution de saturation (PBS, 10% SVF, 0,05% saponine) pendant 30 min. A la fin de la période d'incubation, les cellules ont été rincées en PBS et ensuite incubées avec l'anticorps anti-neurofilaments 160 KDa (Abcam) dilué dans la solution de saturation au 1/100, pendant 1 h à +4°C. Après lavage en PBS, une incubation des cellules avec l'anticorps secondaires Alexa Fluor 488 (Molecular Probes / Invitrogen) dilué au 1/300 dans la solution de saturation a eu lieu pendant 30 min. Après lavages en PBS, coloration des noyaux avec du Hoechst 33342 (0,1 µg/mL) et montage des cellules avec le liquide de montage Dako, les préparations ont été observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss). Les images ont été digitalisées à l'aide d'une caméra Axiocam (Zeiss) en utilisant un objectif x 100 à immersion à huile.

7.3 Coloration de la tubuline par coloration au Tubulin Tracker Green.

Les cellules ensemencées sur des lamelles en verre stériles de 14 mm et traitées avec les AGTLC ont été rincées en PBS. Les sites antigéniques non spécifiques ont été bloqués par l'incubation des cellules avec une solution de saturation DAKO pendant 15 min. Suite au lavage en PBS, les cellules ont ensuite été fixées au méthanol 90% pendant 3 min. 200 µL de la solution de coloration Tubulin Traker Green dilués dans le milieu DMEM (200 nM) ont été

ajoutés et incubé avec les cellules pendant 5 min. Après des lavages avec du PBS, Les noyaux des cellules ont été colorés avec du Hoechst 33342 (0,1 µg/mL) et le montage des lamelles a été réalisé avec le liquide de montage de Dako. Les lames ont été observées avec un microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss). Les images ont été digitalisées à l'aide d'une caméra Axiocam (Zeiss) en utilisant un objectif x 100 à immersion à huile.

8. Analyse des effets des AGTLCs sur les protéines utilisées comme biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer

8.1 Dosage par ELISA de la protéine amyloïde Aβ (1-42)

L'amyloïde beta 1-42 (Aβ 1-42) est le composant majoritaire des plaques séniles trouvées au niveau des cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. La capacité des AGTLCs à induire une production d'Aβ 1-42 a été évaluée sur des milieux de culture de cellules SK-N-BE traitées par les AGTLCs pendant 48 h. Ce dosage a été réalisé en utilisant une méthode immunoenzymatique ELISA (Invitrogen).

Pour doser l'Aβ1-42, une microplaque avec 12 barrettes de 8 puits a été utilisée. 50 µL de milieu de culture ont été ajoutés dans chaque puits et incubés ensuite avec 50 µL d'anticorps (Human Aβ1-42) pendant 3 h sous agitation à température ambiante. 3 lavages ont été effectués et 100 µL de l'anticorps secondaire couplé à HRP ont été ajoutés dans chaque puits. Après 30 min d'incubation, une solution du substrat chromogène a été ajoutée et incubé pendant 30 min ; les échantillons positifs vont développer une coloration bleue. Ensuite, la réaction a été stoppée par addition de 100 µL de solution stop. La DO a été alors mesurée à 450 nm et la quantité d'Aβ1-42 a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage DO en fonction de la concentration en Aβ1-42 (pg/mL)

9. Quantification de l'expression protéique par Western blot

9.1 Préparation des extraits cellulaires :

Les cellules ensemencées dans des boites de Pétri (100x20 mm) et traitées avec différentes concentrations d'AGTLCs, ont été collectées par trypsination. Afin de préparer les extraits cellulaires, le contenu de chaque boîte a été transvasé dans un tube Falcon de 15 mL. Les tubes ont été centrifugés à 900 g pendant 5 min. Le culot a ensuite été lavé en PBS et suspendu dans 100 µL de tampon de lyse (Tris HCl 10 mM, pH 7,2 ; NaCl 150 mM ; Nonidet NP40 0,5% ; Na deoxycholate 0,5% ; SDS 0,1% ; EDTA 2 mM et NaF 50 mM) en présence

d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics Corporation) pendant 15 min dans la glace. Une centrifugation a été à nouveau réalisée à 20 000 g pendant 15 min à + 4°C. Le surnageant, qui constitue l'extrait cellulaire, a été récupéré puis conservé à -20°C jusqu'au moment de son utilisation. Toutes ces étapes sont effectuées dans la glace. Le dosage des protéines a été réalisé en utilisant le kit BCA (Interchim) selon la procédure décrite en 6.6.1

9.2 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Ce type d'électrophorèse permet de séparer les protéines chargées négativement par le SDS et soumises à un champ électrique. La séparation s'effectue en fonction de la masse moléculaire. Le support électrophorétique utilisé est le gel de polyacrylamide. Il s'agit d'un copolymère d'acrylamide et bis-acrylamide. Il est possible de modifier la réticulation et donc de calibrer le diamètre des pores en modifiant le rapport acrylamide/bis-acrylamide. Ainsi, le gel se comporte comme un tamis moléculaire. L'électrophorèse est effectuée selon la méthode décrite par **Laemmli (1970**). Les protéines sont préalablement dénaturées par la chaleur, en présence de β-mercaptoéthanol et de dodécyl sulfate de sodium (SDS). Le SDS charge toutes les protéines négativement, la migration vers l'anode se fera uniquement en fonction de la masse.

Le gel d'électrophorèse est constitué d'un gel de séparation qui permet, comme son nom l'indique, de séparer les protéines sous un champ électrique en fonction de leur masse moléculaire, et d'un gel de tassement ou de concentration qui permet la coordination des fronts de migration des protéines.

Le gel de séparation est tout d'abord préparé (la concentration en acrylamide/bisacrylamide dépend des masses de protéines à séparer). Par la suite, le gel de concentration est coulé sur le premier gel et le peigne est positionné. Après polymérisation des deux gels, des quantités égales de protéines de chaque extrait (50 µg) sont ajoutées dans 5 µl de tampon de charge (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; SDS 10% ; glycérol 25% ; bleu de Bromophénol 1% ; β-mercaptoéthanol 14,4 mM). Ce mélange est porté à 95°C pendant 3 min puis déposé dans les puits du gel de concentration. Ensuite, la migration est faite dans le tampon de migration (0,3% Tris ; 1,5% Glycine ; 0,1% SDS) à un ampérage de 20 mA (60 V) pour le gel de concentration et à 40 mA (120 V) pour le gel de séparation. Après électrophorèse, le gel servira au transfert des protéines.

9.3 Transfert des protéines

Après électrophorèse, on dispose de gels de polyacrylamide qui sont généralement fragiles et ne se prêtent pas ou mal aux traitements par certains réactifs de révélation des protéines, en particulier l'utilisation d'anticorps qui diffusent très lentement dans le gel. La technique de transfert des protéines sur membrane permet d'éviter ces contraintes de révélation et d'exploiter au maximum le pouvoir de résolution élevé des gels de polyacrylamide.

Le « Western Blot ou "Immunoblotting" est une technique puissante qui permet d'identifier une protéine spécifique ou un épitope dans un mélange complexe après leur séparation par électrophorèse (**Towbin *et al* ., 1979).** Pour cela, il faut disposer d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux capables de reconnaître la protéine d'intérêt.

Après électrophorèse, le gel est délicatement déposé sur une membrane de nitrocellulose ou sur une membrane de polyvinylidéne difluoride (PVDF) préalablement imprégnée du tampon de transfert. L'ensemble est encadré de part et d'autre par deux feuilles de papier Wattman 3 mm également imprégnées du tampon. Une légère pression est exercée pour maintenir le gel et la membrane bien en contact et cela par l'utilisation d'une éponge et de grilles articulées. L'ensemble est placé dans l'appareil de transfert. La cuve de transfert est remplie avec 500 ml de tampon de transfert.

Le transfert s'effectue pendant 1 h à 50 V pour des protéines de 10 à 60 KDa et pendant 2 h pour les protéines de 100 à 200 KDa sous agitation, avec refroidissement. Après transfert les membranes sont immédiatement placées dans du TBST 0,1%. Pour vérifier que le transfert est bien réalisé, la membrane est colorée par immersion dans une solution de rouge Ponceau (rouge Ponceau S à 0,1% dans l'eau) pendant 5 mn puis décolorée par rinçage à l'eau. Aussitôt après, la membrane est plongée dans une solution de saturation constituée du TPBS (PBS, 0,1% Tween20), additionnée de 5% de lactoprotéines (Régilait) pendant 1 h à température ambiante ou une nuit à 4°C. Sur la membrane, les sites de liaisons qui ne sont pas occupés par les protéines transférées sont ainsi bloqués par l'agent de saturation de manière à éviter toute adsorption parasite des réactifs de révélation. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 5 min avec la solution de TBST 0,1%.

L'étape d'immunodétection commence par incubation de la membrane pendant 2 h à température ambiante sous agitation avec l'un des premiers anticorps (anti-OXPHOS mixture

(MS601, Abcam/Mitosciences), anti-actine (Sigma), anti-GSK-3α/β (Santa Cruz Biotechnology), anti-AKT (Cell Signaling) et anti - α Tubuline (Santa Cruz Biotechnology) dilués selon les recommandations données par le fournisseur. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 10 min, puis incubée 1 h à température ambiante sous agitation avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) qui reconnaît le premier anticorps (dilué au 1/5000 dans la solution TPBS, lactoprotéines 5%). Après 3 nouveaux lavages, la membrane est révélée à l'obscurité par chimioluminescence en utilisant le kit ECL (Amesham) puis quantifié à l'aide du logiciel Image J.

10. Analyse par RT-qPCR

10.1 Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide du Kit « RNeasy Mini Kit (250) » (Qiagen). Dans les boites de Pétri (100x20 mm) contenant les cellules traitées avec les AGTLCs, 600µL de tampon de lyse RLT (RNA lysis Tissus) à 1% de β–mercaptoéthanol ont été ajoutés. Ce tampon contient des sels de guanidium qui sont hautement dénaturants et qui, avec l'aide du β- mercaptoéthanol, permettent la lyse des cellules ainsi que l'inactivation des RNases. Les lysats cellulaires ont été transférés dans des tubes Eppendorfs où un volume de 600µL d'éthanol à 70% a été ajouté. Après agitation, les échantillons ont été transférés sur colonne « RNeasy Mini Spin » (Qiagen) où les ARN sont retenus par la membrane de silice. Un lavage avec le tampon RW1 (RNA Wash Buffer 1) a ensuite été effectué. La DNase l (« RNase-free DNase Set »Qiagen) a ensuite été déposée dans chaque colonne afin de digérer l'ADN génomique. Deux lavages, l'un avec le tampons RW1 et l'autre avec le tampon RPE (RNA Buffer Ethanol) ont été effectués, puis les colonnes ont été centrifugées deux fois de suite à 20 000 g pendant 1 min afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Les ARN ont enfin été élués par centrifugation à 15 000 g pendant 1 min dans 50 µL d'eau sans RNase (Qiagen).

10.2 Dosage d'ARN

Le dosage des ARN totaux a été fait grâce à un spectrophotomètre par lecture de la densité optique (DO) à 260 nm. Les concentrations ont été calculées sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 40 µg/mL d'ARN. De plus, le rapport DO260/DO280 nous a permis de calculer la pureté des ARN. Idéalement, ce rapport doit être compris entre 1,80 et 2,00 unités d'absorbance car en dessous de 1,80, une contamination protéique est à redouter,

alors qu'au dessus de 2,00, c'est l'ADN génomique qui risque d'être le contaminant. Les ARN totaux ont été ensuite stockés à – 80°C.

10.3 RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction

La Reverse Transcription (RT-PCR) a été effectuée à l'aide du Kit « i Script CDNA Synthesis » (Biorad), dans un thermocycleur « Gene AMP PCR System 2400 » (Perkin Elmer). Des ADN complémentaires ont été synthétisés à partir des ARN totaux de nos échantillons par l'action d'une polymérase appelée Reverse Transcriptase qui utilise de l'ARN comme matrice. Pour cela, les ARN totaux ont été dilués dans un volume total de 30 µL d'eau stérile afin d'avoir une quantité d'ARN équivalente pour chaque échantillon égale a 0,2 µg. Ensuite 1 µL d'enzyme 'Reverse Transcriptase' et 4 µL de tampon de RT ont été ajoutés par tube. Les échantillons ont été ensuite incubés 5 min à température ambiante ce qui permet l'hybridation des amorces. L'étape d'élongation du brin d'ADNc a été faite à 42°C pendant 40 min, suivie d'une étape de 5 min à 85°C permettant la dénaturation des brins néosynthétisés. Enfin, les échantillons ont été maintenus à + 4°C afin de stopper la réaction et de conserver les ADNc. Ces derniers ont été ensuite stockés à -20°C.

10.4 qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

La PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel a été effectuée à l'aide du kit « IQ SYBR green Supermix » (Biorad), dans un thermocycleur i Cycler IQ (Biorad).

La qPCR est une réaction de PCR classique visant à amplifier spécifiquement un ADN particulier, dans le but de quantifier par fluorescence la formation du produit de PCR. Dans notre cas, elle nous a permis de mesurer de façon indirecte l'impact des traitements testés sur l'expression de nos gènes cibles.

Le fluorophore utilisé a été le SYBR green, un agent intercalant des acides nucléiques doubles brins qui se fixe au niveau du petit sillon, et qui est capable d'émettre de la fluorescence dans le vert lorsqu'il est excité par les UV. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de SYBR green fixé, donc à la quantité d'ADN dans l'échantillon. Le SYBR green est non spécifique et ne peut donc pas exclure les dimères d'amorces par exemple ou d'autres éventuels contaminants double brin.

La technique de qPCR a été faite en plaque 96 puits dans laquelle 20 µL de mix de qPCR et 5 µL d'ADNc dilué ont été introduits, la dilution pouvant aller de 1 /10ème à 1 /100ème selon la quantité d'ADNc disponible. Le mix de qPCR a été préparé à partir de « IQ SYBR green Supermix » (Biorad), qui contient le SYBR green, les dNTPs, l'enzyme

« Hot Start », et d'autres éléments nécessaires à la réaction comme le $MgCl_2$, auxquels on a ajouté des amorces sens et anti-sens spécifique du gène d'intérêt à 400 nM final chacun, et de l'eau stérile.

La plaque 96 puits a été alors centrifugée 1 min à 1000 rpm puis insérée dans l'i Cycler. Le programme utilisé comprend trois étapes : une première phase 30 s à 25°C, une seconde phase d'activation de l'enzyme 2 min à 95°C, et une troisième phase elle-même découpée en 3 étapes : la dénaturation des acides nucléiques 30 s à 94°C, l'hybridation avec les amorces 30 s à 60°C et l'élongation 30 s à 72°C. Cette dernière phase est répétée sur 40 cycles. La fluorescence est mesurée à chaque fin de phase d'élongation, nous obtenons donc une courbe de fluorescence comprenant trois phases : la phase d'initiation durant laquelle la quantité de produit de PCR est trop faible pour être mesurée ce qui correspond au bruit de fond , la phase exponentielle durant laquelle en théorie le nombre de produit de PCR, est doublé à chaque cycle, et la phase de plateau où la fluorescence obtenue a atteint son maximum. A la fin des 40 cycles de PCR, une étape, supplémentaire est effectuée afin de vérifier la spécificité du produit amplifié et la présence d'éventuels contaminants. Elle permet d'établir une courbe de fusion.

Chaque produit de PCR est caractérisé par sa température de fusion ou Melting Température (TM) qui est différente pour chaque produit et qui dépend de la séquence du produit et de sa taille. Ce paramètre correspond à la température à laquelle la moitié du produit est hybridé, sous forme double- brin.

Pour établir la courbe de fusion, l'appareil effectue une montée en température de 0,5 °C toutes les 5 s (de 70 à 95°C) et mesure la fluorescence en fonction de la température. A une température faible, toutes les molécules sont sous forme double-brin, mais il y a de nombreuses hybridations non spécifiques : la fluorescence est maximale. Plus la température augmente, plus l'hybridation est spécifique et donc le nombre de molécules sous forme double-brin diminue. Lorsque la température est trop élevée, toutes les molécules sont dénaturées et il n'ya plus de double brin : la fluorescence est donc minimum.

Pour déterminer le TM d'un produit, il suffit de regarder à quelle température nous obtenons la moitié de la fluorescence maximal, c'est-à-dire la moitié des molécules sous forme de double-brin. Sur la courbe dérivée dF/dT en fonction de la température, le TM correspond à la température à laquelle on obtient un pic, là où la variation de fluorescence est la plus importante.

Il suffit ensuite de vérifier que la température de fusion obtenue pour chaque puits concernant un même gène soit unique et identique. Les dimères d'amorces forment des pics à des températures plus basses que les amplicons dont les tailles varient entre 75 et 120 pb.

10.5 Analyse des résultats de qPCR

Les courbes de fluorescence obtenues on été analysées avec le logiciel « i Cycler IQ » (Biorad) ce qui nous permet de déterminer les cycles seuil (Thershold Cycle, Ct), cycle auquel la fluorescence commence à être suffisante pour être quantifiée. Le Ct correspond au nombre de cycles de qPCR nécessaires pour atteindre une certaine valeur de fluorescence, appelée seuil, fixée pour tous les échantillons. Le gène L27 a été utilisé comme gène de normalisation il a été sélectionné comme étant le plus stable face aux traitements.

Pour chaque échantillon, nous obtenons un Ct. Le ΔCt qui correspond à la différence entre le Ct du traité et le Ct du témoin a été calculé : plus la différence est importante, plus le traitement a un impact sur la transcription.

Les résultats d'expression relative de notre gène par rapport au gène de normalisation sont ensuite représentés sous forme de graphisme grâce au logiciel.

11. Evaluation et quantification des acides gras et des plasmalogènes par CPG/MS.

11.1 Extraction des lipides totaux

Après traitement, les cellules ont été trypsinées et centrifugées. Après comptage avec la cellule de malassez, les culots cellulaires ont été placés dans un tube en verre. 10 µL de diheptadecanoylphosphatidylcholine à 1 mg / mL dans le chloroforme, ont été ajoutés. Ce composé va servir de standard interne. Ensuite, on a ajouté 4 mL de chloroforme/méthanol (2/1, v/v) contenant 50 mg/L de BHT et 1 mL de NaCl 150mM. Les tubes ont été agités pendant 30 min puis centrifugés 5 min à 2000 g. la phase organique inférieure a été récupérée et évaporée à sec sous azote. L'extrait sec a été ensuite repris avec 500 µL de chloroforme.

11.2 Purification des phospholipides

500 mg de silice (LC-NH_2) ont été versés dans des petites colonnes en verre, puis la silice a été lavée 2 fois avec 2 mL d'hexane. 300 µL de l'extrait lipidique a été déposé sur la colonne, puis 3 fractions différentes ont été éluées : le tube A correspondant aux lipides neutres a été éluée avec 4 mL de chloroforme/isopropanol (2/1) , le tube B correspondant aux

acides gras libres a été élué avec 4 mL d'éther éthylique contenant 2 % d'acide acétique et le tube C correspondant aux phospholipides a été élué avec 4 mL de méthanol.

11.3 Dérivation des acides gras des phospholipides pour l'analyse en CPG /SM

La première étape est une étape de saponification permettant la libération des acides gras ses phospholipides. Pour cela, le tube C a été évaporé à sec. L'extrait sec a été repris dans 1 mL d'éthanol. 60 µL de potasse 10 M ont été ajoutés et le tube a été incubé 45 min à 56°C, puis refroidi. Pour extraire les acides gras libérés, 1 mL d'HCl 1,2 M a été ajouté dans le tube et les acides gras ont été extraits avec 2 mL d'hexane. Après agitation, environ 10 min les tubes ont été centrifugés et la phase organique (phase supérieure) a été évaporée à sec sous azote. Pour l'analyse, les acides gras doivent ètre dérivés sous forme de pentafluorobenzyl esters. Pour cela, l'extrait sec a été repris par 100 µL d'acétonitrile, 5 µL de pentafluorobenzyle bromide, 5 µL de diiosopropylethylamine et les tubes ont été incubés 30 min à température ambiante. Après ajout de 1 mL d'eau, les pentafluorobenzyle esters (PFB) ont été extraits avec 2 mL d'hexane. Après agitation et centrifugation des tubes, une évaporation de la phase organique à sec sous azote a été réalisée, l'extrait obtenu a été repris dans 100 µL d'hexane.

11.4 Analyse par CPG/ SM

Le chromatographe en phase gazeuse Hewelett Packard était muni d'un injecteur automatique Hewlett Packard HP7683 et couplé a un détecteur de masse Hewelett Packard HP5973. L'injection a été faite en mode Pulsed Split. La colonne capillaire e, silice fondue HP-5MS de 30 m x 0,25 mm et 0,25 µm d'épaisseur de film. Le gaz est l'hélium et son débit initial a été de 1.1 mL /min. La détection a été faite par ionisation chimique négative. La température du four a été programmée comme suit : température initiale de 140°C puis une rampe de 5°C /min jusqu'à 300°C. Cette température a été maintenue 5 min. le gaz réactif a était le méthane. La température de l'interface était de 300°C, celle du quadripôle de 106°C et celle de la source de 150°C. L'acquisition a été faite en mode SIM en balayant les ions [M-PFB]

II Etude clinique

1 Population d'étude

Il s'agit d'une étude cas-témoins menée au service de Neurologie de l'Hôpital Fattouma Bourguiba (Monastir, Tunisie) recrutant tous les patients ayant consulté pour une plainte

mnésique durant la période allant de janvier 2011 au juillet 2011. Tous les malades ont été convoqués et un bilan neuropsychologique détaillé évaluant la mémoire du travail, la mémoire épisodique, les fonctions exécutives, la fluence verbale, les fonctions gnosiques et praxiques et l'humeur a été appliqué à tous les patients. De même, les patients ont subi une imagerie cérébrale (tomodensitométrie (TDM) ou imagerie par résonnance magnétique nucléaire (IRM)) et un bilan biologique.

Les critères DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, 4^{é} édition**)** étaient sollicités pour tenir le diagnostic du syndrome démentiel.

* Pour la MA, les critères NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer Disease and Related Disorders Association) ont été utilisés. Pour la variante comportementale de la démence fronto-temporale (DFT), les critères rapportés par **Vercelleto *et al*. (2006**) ont été utilisés.

* Pour la démence à corps de Lewy (DCL), les critères rapportés par **McKeith *et al.* (2008)** ont été utilisés.

* Pour les démences vasculaires (DV) les critères NINDS-AIREN (National Institute of Neurological Disorders and Stroke- Association Internationale pour la recherche et l'Enseignement en Neurosciences) rapportés par **Roman *et al.*** (**1993**) ont été utilisés.

En outre, les patients ont bénéficié d'un questionnaire détaillé prenant en compte les éléments suivants ;

- l'âge, le sexe, le niveau d'instruction, la profession et les habitudes de vie en particulier le tabagisme et l'alcoolisme,
- Les antécédents personnels (diabète, hypertension artérielle (HTA), dyslipidémie, cardiopathie, insuffisance rénale, traumatisme crânien…),
- Une éventuelle consanguinité parentale ou cas similaires dans la famille,
- L'âge de début de la maladie et de la 1ère consultation.

Les données ont été recueillies sur une fiche de renseignement pré-établie avec le consentement du patient. (**Voir Annexe**).

1.1 Recrutement

Les patients ont été choisis selon les critères suivants.

1.1.1 Malades

Critères d'inclusion

- Age supérieur à 50 ans.
- Les patients ayant un diagnostic de démence validé selon les critères DSM IV.

Critères d'exclusion

- Refus de la personne ou du tuteur,
- Troubles auditifs ou visuels notables limitant la fiabilité des tests neuropsychologiques,
- Pour les dosages biochimiques un refus de la personne ou du tuteur ou une insuffisance rénale et hépatique chronique,
- Un syndrome dépressif sans atteinte cognitive (selon l'échelle de dépression gériatrique « GDS : geriatric depression scale »)

1.1.2 Contrôle

Critères d'inclusion

- Age supérieur à 50 ans,
- Score minimal mental state (MMS : minimal mental score) supérieur à 26.

Critères d'exclusion

- Refus de la personne,
- Présence d'affections neurologiques centrales,
- Présence d'antécédents familiaux de démence.

2 Prélèvements et préparation des échantillons

Pour chaque sujet, nous avons effectué un prélèvement sanguin. Les échantillons de sang veineux ont été recueillis sur différents tubes : 1 tube EDTA, 1 tube Héparine et 1 tube sec. Après centrifugation des échantillons de sang à 1 400 g pendant 10 min à +4°C, les surnageants plasmatiques et sériques ont été récupérés et aliquotés. Le culot cellulaire a été lavé 3 fois en NaCl 0,9 % puis tous les aliquots ont été conservés à -80°C. Au moment de l'analyse des activités enzymatiques, des marqueurs de stress oxydatif et du profil d'acide gras, une lyse des érythrocytes a été faite : Pour cela 200 µL du culot cellulaire ont été mis en

présence d'eau déionisée à +4°C pendant 5 min. Un dosage des protéines totales des hémolysats obtenus a été réalisé avec la méthode de Bradford.

3 Diagnostic Biologique

Un bilan biologique de routine a été réalisé chez tous les patients et les contrôles. Il comprenait : un bilan glycémique, rénal, lipidique et hépatique. Tous les dosages biologiques utilisés dans ce travail ont été réalisés au laboratoire de Biochimie à l'Hôpital Universitaire Farhat Hached de Sousse (Tunisie).

3.1 Bilan glycémique

Le dosage de glucose se fait par une méthode enzymatique colorimétrique selon la réaction suivante :

$$\text{Glucose} + H2O + O2 \xrightarrow{\textit{glucose oxydase}} \text{Acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O + \text{phénol} + \text{4-aminoantipyrine} \xrightarrow{\textit{peroxydase}} \text{Quinone imine} + 4\ H_2O$$

L'absorbance de la quinone imine colorée en rose est mesurée à 510 nm, le dosage a été réalisé sur l'automate Synchron CX9 (Beckman). Les valeurs usuelles sont de 3,9 à 6,1 mmol/L.

3.2 Bilan rénal

Le bilan rénal comprenait trois paramètres de routine : l'urée, la créatinine et l'acide urique.

3.2.1 Dosage de l'urée

L'urée a été dosée par deux réactions couplées à l'action de l'uréase/glutamate déshydrogénase(GLDH) selon le schéma suivant :

$$\text{Urée} + H_2O \xrightarrow{\textit{Uréase}} 2NH_3 + CO_2$$

$$2\alpha\text{-oxoglutarate} + 2\ NH_4^+ + 2\ \text{NADH}, H^+ \xrightarrow{\textit{GLDH}} 2\text{L Glutamate} + 2NAD^+ + 2H_2O$$

L'absorbance est mesurée à 340 nm et le dosage a été réalisé sur l'automate Synchron CX9 (Beckman). Les valeurs usuelles sont comprises entre 2,5 et 7,5 mmol/L.

3.2.2 Dosage de la créatinine

La créatinine est formée dans l'organisme humain par déshydratation non enzymatique de la créatine, synthétisée par le foie et stockée dans les muscles squelettique ; la créatininémie constitue le mode d'évaluation de la fonction rénale dans la mesure où la créatininémie est corrélée au débit de la filtration glomérulaire.

Le dosage de la créatinine plasmatique a été réalisé par une méthode colorimétrique, utilisant la réaction de Jaffé en mode cinétique sur l'automate Synchron CX9 (Beckman). La créatinine réagit avec l'acide picrique en milieu alcalin pour donner un complexe orangé rouge qui absorbe à 530 nm. Les valeurs usuelles sont 71-130 µmol/L.

3.2.3 Dosage de l'acide urique

L'acide urique est le principal produit de catabolisme des nucléosides puriques (adénosine, guanosine). L'acide urique est hydrolysé par l'uricase, avec production d'allantoïne, de CO_2 et de peroxyde d'hydrogène ; ce dernier subit l'action de la peroxydase, pour oxyder l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzènesulphonique (3,5 DCHBS). Le dosage s'effectue selon la réaction suivante :

$$\text{Acide urique} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\textit{uricase}} \text{Allantoïne} + CO_2 + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{acide 3,5 DCHBS} + \text{4-aminophénazone} \xrightarrow{\textit{peroxydase}} \text{Quinoné imine rose} + 4\ H_2O$$

L'absorbance est mesurée à 520 nm et les valeurs usuelles sont comprises entre 179 – 416 µmol/L. Le dosage a été réalisé sur l'automate Synchron CX9 (Beckman).

3.3 Bilan lipidique

3.3.1 Dosage du Cholestérol total (CT)

Le dosage du cholestérol s'effectue par la méthode enzymatique colorimétrique. Le cholestérol est le principal stérol circulant dans le plasma. Il peut être sous forme libre ou estérifiée et dans les deux cas il est incorporé dans les lipoprotéines comme les autres lipides plasmatiques. Son dosage fait partie du bilan de l'exploration du métabolisme lipidique et se fait selon la cascade des réactions suivantes :

Le cholestérol estérifié est hydrolysé par le cholestérol estérase (CH estérase) en cholestérol libre

$$\text{CH estérifié} \xrightarrow{\textit{CH estérase}} \text{CH} + \text{acide gras}$$

Le cholestérol libre est alors soumis à l'action du cholestérol oxydase (CH oxydase).

$$CH + O_2 \xrightarrow{\textit{CH oxydase}} \text{4-cholestérol 3-one} + H_2O_2$$

Le péroxyde d'hydrogène formé est dosé par la réaction de Trinder :

$$2H_2O_2 + \text{amino-4-antipyrine} + \text{phénol} \xrightarrow{\textit{peroxydase}} \text{quinone imine} + 4H_2O$$

Le dosage a été réalisé sur l'automate Synchron CX9 (Beckman). L'absorbance est mesurée à 500 nm et les valeurs usuelles sont 3,9 – 6,7 mmol/L.

3.3.2 Dosage des triglycérides (TG)

Les triglycérides proviennent de l'estérification du glycérol par 3 molécules d'acide gras. Les dosages colorimétriques enzymatiques sont les plus utilisées.

$$TG \xrightarrow{\textit{Lipase}} \text{Acide gras libres} + \text{glycérol}$$

$$\text{Glycérol} + ATP \xrightarrow{\textit{glycérol kinase}} \text{glycérol-3-phosphate (G3P)} + ADP$$

$$G_3P + O_2 \xrightarrow{\textit{Glycérol-3-phosphate oxydase}} \text{dihydroxyacétone} + H_2O_2$$

$$\text{Amino-4-antipyrine} + \text{phénol} + H_2O_2 \xrightarrow{\textit{Péroxydase}} \text{Quinone imine rose} + H_2O$$

Le dosage a été réalisé sur l'automate Synchron CX9 (Beckman). L'absorbance est mesurée à 505 nm et les valeurs usuelles sont comprises 0,68 – 1,7 mmol/L.

3.3.3 Dosage du HDL-cholestérol

Le HDL est la lipoprotéine plasmatique protectrice des coronaropathies. Le dosage se réalise selon la méthode des polyanions synthétiques (Daiichi). Le principe de la méthode consiste en l'adsorption sélective des polyanions synthétiques à la surface des chylomicrons, VLDL et LDL pour former des complexes résistants aux détergents.

$$\text{CH estérifié} \xrightarrow{\textit{CH estérase}} \text{CH} + \text{Acide gras}$$

$$CH + O_2 \xrightarrow{\textit{CH oxydase}} CH + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\textit{Catalase}} 2H_2O + O_2$$

La mesure spécifique de HDL selon les réactions suivantes :

$$\text{CH estérifié} \xrightarrow{\textit{CH estérase}} \text{CH} + \text{Acide gras}$$

$$CH + O_2 \xrightarrow{\textit{CH oxydase}} CH + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + 4\text{-AA} + HDAOS \xrightarrow{\textit{peroxydase}} \text{Quinine imine} + 4H_2O$$

HDAOS : N (2hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5dimethoxyaniline

L'absorbance est mesurée à 660nm et les valeurs usuelles sont comprises entre 0,68-1,7mmol/l. Le dosage a été réalisé sur l'automate Synchron CX9 (Beckman).

3.3.4 Dosage des LDL-cholestérol

Les LDL sont calculés par la formule de Fridwald suivante :

LDL-C = CT – (TG/2,2 + HDL)

Cette formule est valable pour des TG ≤ 4 mol/L. Les valeurs usuelles sont comprises 0,5- 4,4 mmol/L.

3.3.5 Dosage de l'Apolipoprotéine A_1 ($ApoA_1$)

L'ApoA1 est la principale composante protéique des HDL. La fraction d'ApoA1 par apport à la protéine HDL totale représente environ 65%. Les sujets ayant des pathologies vasculaires athéromateuses ont souvent des concentrations d'ApoA1 diminuées. L'intérêt du dosage de l'ApoA1 est l'évaluation du risque d'athérosclérose.

Le dosage se fait par une réaction immunochimique, les protéines contenues dans le sérum humain forment avec les anticorps spécifiques des complexes immuns sur lesquels est envoyée une lumière. L'intensité de la lumière dispersée est fonction de la concentration dans l'échantillon de la protéine et le dosage se fait par apport à un standard de concentration connue. Le dosage a été réalisé par immuno-néphélémétrie à l'aide du système Dade-Behring. Les valeurs usuelles sont comprises entre 1,1 et 2,15 g/L.

3.3.6 Dosage de l'Apolipoprotéine B (Apo B)

L'Apo B est la principale composante protéique des LDL, représentant environ 95% de la protéine totale. L'Apo B est indispensable à la liaison avec les récepteurs LDL dans le foie et sur les parois cellulaires et participe ainsi au transport du cholestérol depuis le foie jusqu'aux cellules vasculaires. Des concentrations d'Apo B augmentées sont souvent observées dans les pathologies vasculaires athéromateuses et constituent un indicateur de risque de l'athérosclérose.

Le principe du dosage est le même que celui de l'ApoA1. Les valeurs usuelles sont comprises entre 0,55 et 1,4 g/L**.**

4 Dosages de l'activité des enzymes antioxydantes plasmatique et érythrocytaire

4.1 Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la glutathion peroxydase est mesurée selon la méthode de **Flohe & Gunzler, (1984)**. Elle a été calculée par la diminution du taux de glutathion réduit (GSH) par rapport à la réaction non enzymatique et en utilisant H_2O_2 comme substrat. Cette activité a été exprimée en µmol de GSH/min/mg de protéine.

Pour préparer les extraits enzymatiques, une dilution des hémolysats avec du tampon phosphate (50 mM pH 7,8) a été faite. Le dosage de l'activité enzymatique est par la suite réalisé comme décrit dans le **Tableau 2**:

Tableau 2 : Dosage de l'activité enzymatique de la GPx

	Echantillon	**Blanc**
Extrait enzymatique	200 µL	-
GSH 0.1 mM	400 µL	400 µL
TPO_4 (pH 7,8)	200 µL	400 µL
Incubation au bain marie à 25°C pendant 5 min		
H_2O_2	200 µL	200 µL
Laisser agir 10 min au repos		
TCA 1%	1 mL	1 mL
Mettre le mélange dans la glace 30 min		
Centrifugation 1 000 g pendant10 min		
Surnageant	480 µL	480 µL
Na_2HPO_4 $12H_2O$	2.2 mL	2.2 mL
DTNB	320 µL	320 µL
Formation d'un composé coloré →Lecture de DO à 412 nm dans les 5 min suivant la réaction		

- Activité du GSH consommée /min/mg de protéine :

$$\frac{0.04\ (DOE - DOB).\ 5\ .1000}{DoB\ .10.X}$$

Avec

X : la quantité de protéine totale de l'extrait enzymatique.

DO_B : Densité optique du Blanc

DO_E : Densité optique de l'échantillon

4.2 Dosage de la Superoxyde Dismutase l'activité érythrocytaire

L'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD) a été mesurée selon la méthode de **Beauchamp and Fridovich.** En fait, la photoréduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde O_2^- est utilisée comme base de détection de l'activité. En aérobie le mélange Riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre. En présence de la SOD, l'oxydation du NBT est inhibée d'où l'atténuation de la coloration bleue.

Les hémolysat de globules rouges ont été mis en présence du mélange réactionnel qui contenait du tampon phosphate (50 mM pH 7,8), EDTA 0,1 mM, de la L-méthionine (13 mM), de la riboflavine 2 µM et du NBT 75 mM. Le mélange a été exposé à un faisceau de lumière blanche pendant 20 min. La couleur bleue développée dans la réaction a été mesurée à 560 nm. L'unité d'activité a été exprimée comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50 % la réduction du NBT.

La mesure de l'activité spécifique de la SOD :

$$\frac{Y}{50}$$ (unités SOD/mg de protéine)

Avec $$Y = \frac{(DOB - DOE)\ .100.20}{DOB\ .\ X}$$

X : la concentration des protéines totales.

DO_B : Densité optique du Blanc

DO_E : Densité optique de l'échantillon

4.3 Mesure de l'activité catalase

L'activité de la catalase a été mesurée selon la méthode de **Clairbone, (1985)** par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution de H_2O_2 0,5 M, après addition de l'extrait. L'absorbance a été mesurée à 240 nm durant 1 min 30 s à 25°C. Cette diminution est due à l'hydrolyse du peroxyde par la catalase selon la réaction suivante :

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O+O_2$$

L'activité enzymatique a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire (ε) de 0,043 nM^{-1} cm^{-1} et les résultats ont été exprimés en µmol de H_2O_2 décomposé par minute et par milligramme de protéine.

Pour des hémolysats déjà préparés, l'activité de la catalase a été déterminée comme suit : à 20 µL de l'hémolysat, on ajoute 780 µL de tampon phosphate (100 mM pH 7,4) (NaH_2PO_4 $2H_2O$, $NaHPO_4$ 12 H_2O 0,2 M) et 200 µL de H_2O_2 (500 mM). Une lecture de la DO à 240 nm a été effectuée toute les 15 s durant 1 min 30 s. La cinétique de la courbe de la DO en fonction du temps est ensuite tracée et sert pour le calcul de l'activité catalase.

Activité catalase (µmol de H_2O_2/min/mg de protéines)

$$= \frac{\Delta DO \,.\, \text{dilution de l'échantillon au début}}{\varepsilon \,.\, L \,.\, X \,.\, 0{,}02}$$

Avec ;

ΔDO : La différence de la DO entre deux temps pour lesquels la chute de la DO est exponentielle

ε=0,043 mM^{-1}/L .cm^{-1}=0,043 µM /mL.cm^{-1}

L= longueur de la cuve =1 cm

X= concentration en protéine par mg /mL.

5 Dosages des marqueurs de la peroxydation lipidique plasmatique et érythrocytaire

5.1 Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde est un produit de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées par certains contaminants. Le MDA est un agent alkylant capable de réagir avec les macromolécules

biologiques (**Pellerin-Massicotte, 1994**). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (95°C) entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment rose absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

Dans ce présent travail, le taux du MDA a été évalué selon la méthode de Yoshioka et al. (**Yoshioka *et al.*, 1979**). La précipitation des protéines a été réalisée par l'addition de 1,25 mL de solution d'acide trichloracétique (20 %) à 0,25 mL de plasma. Par la suite, 0,5 mL d'une solution d'acide thiobarbiturique (0,67 %) a été ajouté. Après incubation dans un bain marie (95°C) pendant 30 min, le mélange a été refroidi rapidement. Après l'addition de 4 mL de n-butanol, le mélange a été vortexé et centrifugé à 900 g pendant 10 min. Les valeurs de DO ont été lues à 532 nm et les concentrations exprimées en mmol/L ont été calculée en utilisant la loi de Beer Lambert ;

$$DO= \varepsilon * C * L \quad C= DO/ \varepsilon * C * L$$

L= longueur de la cuve =1 cm

$\varepsilon=1.56.10^{-5}$

5.2 Dosages des diènes conjugués

Les diènes sont des hydrocarbures qui contiennent deux doubles liaisons séparées par une seule liaison simple. Ces diènes sont formés suite à la peroxydation des acides gras polyinsaturés et sont caractérisés par une absorption maximale en UV.

Le dosage des diènes conjugués a été réalisé selon la méthode décrite par **Esterbauer *et al.* (1989).** Un mélange chloroforme/ méthanol (2v/1v) et NaCl 0,9% a été ajouté à 100 µL de plasma ou de culot érythrocytaire. Après 2 min d'agitation au vortex, une centrifugation a eu lieu à 1 000 g pendant 10 min. La phase chloroformique inférieure a alors été récupérée dans un tube à hémolyse en verre et vaporisée sous flux d'azote. 1 mL Hexane a été ajouté à l'extrait sec et les DO ont été lues à 243 nm. Les concentrations exprimées en µmol/L ont été calculées en utilisant la formule suivante :

$$DC\ (\mu mol/ml) = \frac{DO\ .103}{2.8}$$

6 Dosage des protéines carbonylées plasmatique et érythrocytaire

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyl dans la protéine.

Le dosage des protéines carbonylées a été réalisé selon la méthode d'**Oliver *et al.* (1987)** en laissant agir le DNPH 10 mM, dissous dans du HCl 2,5 N, avec 200 µL de plasma ou d'hémolysat érythrocytaire pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une agitation a été effectuée toute les 15 min durant le temps de l'incubation. 1 mL de l'acide tricholoacétique (TCA) 20% a été ajouté, suivi d'une incubation du mélange dans la glace pendant 10 min. Une centrifugation 1 800 g, 5 min a eu lieu et le surnagent a été éliminé, deux lavages du culot protéique ont été effectués avec le TCA (10 %) et de l'éthanol-éthylacétate (1v/1v) suivi de centrifugations afin d'éliminer le DNPH. Le précipité final a été enfin dissout par ajout de 500 µL de guanidine hydrochloride (6 M) et incubation à 37°C pendant 10 min. La DO a ensuite été lue à 370 nm et la concentration de protéines carbonylées au niveau des échantillons a été calculée.

7 Détermination du profil d'acides gras plasmatique et érythrocytaire par CPG

L'extraction des lipides pour les analyses qualitatives des acides gras a été conduite selon la méthode de **Folch *et al.* (1957)**. Les lipides ont été extraits à partir de plasma ou d'érythrocytes en mélangeant 200 µL de l'échantillon avec 2 mL de méthanol, 1 mL de chloroforme, 50 µL de standard interne (C17 :0 ; 1 mg/mL), 40 µL Butylhydroxytoluène (BHT) 5 mM. Après agitation au vortex, 1 mL d'eau désionisé et 1 mL de chloroforme ont été ajoutés et une centrifugation 1 000 g, 10 min a été réalisée. La phase inférieure chloroformique est alors récupérée dans un tube à hémolyse en verre et vaporisée sous flux d'azote. Ensuite, une méthylation des acides gras a eu lieu en utilisant 1 mL de méthanol-trifluorure de bore (BF3, 14 % méthanol) à 50°C pendant 30 min. Les extraits lipidiques ont été refroidis à température ambiante, 2 mL d'hexane et de l'eau désionisée ont été ajoutés à l'extrait. Suite à une agitation du mélange une centrifugation 1 000 g, 10 min a eu lieu et la phase supérieure héxanique a été récupérée et séchée sous flux d'azote.

L'analyse des acides gras a été effectuée par CPG en injectant 1 µL de l'extrait. Les esters méthyliques ont été séparés, identifiés et dosés par CPG à l'aide d'un chromatographe (Hewlett Packard) muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire polaire en silice de type HP Innowax (Crabowax 20 M) (30 m × 0.25 mm diamètre intérieur) et de 0,25 µM épaisseur du film).

Les analyses ont été pratiquées dans les conditions suivantes: programme du four: la température initiale du four : 180°C, 10°C/min jusqu'à 250°C pendant 10 min, le détecteur porté à 280°C, l'injecteur porté à 220°C. Les surfaces des pics ainsi que le pourcentage de chaque acide gras ont été déterminés grâce à un logiciel HP-chemstation permettant de piloter

le chromatographe et d'agir sur les paramètres physiques des analyses. L'identification des différents acides gras a été réalisée par comparaison avec des chromatogrammes des standards injectés séparément dans la colonne.

8 Dosage du plasmalogène et de l'acide phytanique plasmatique et érythrocytaire par CPG/SM.

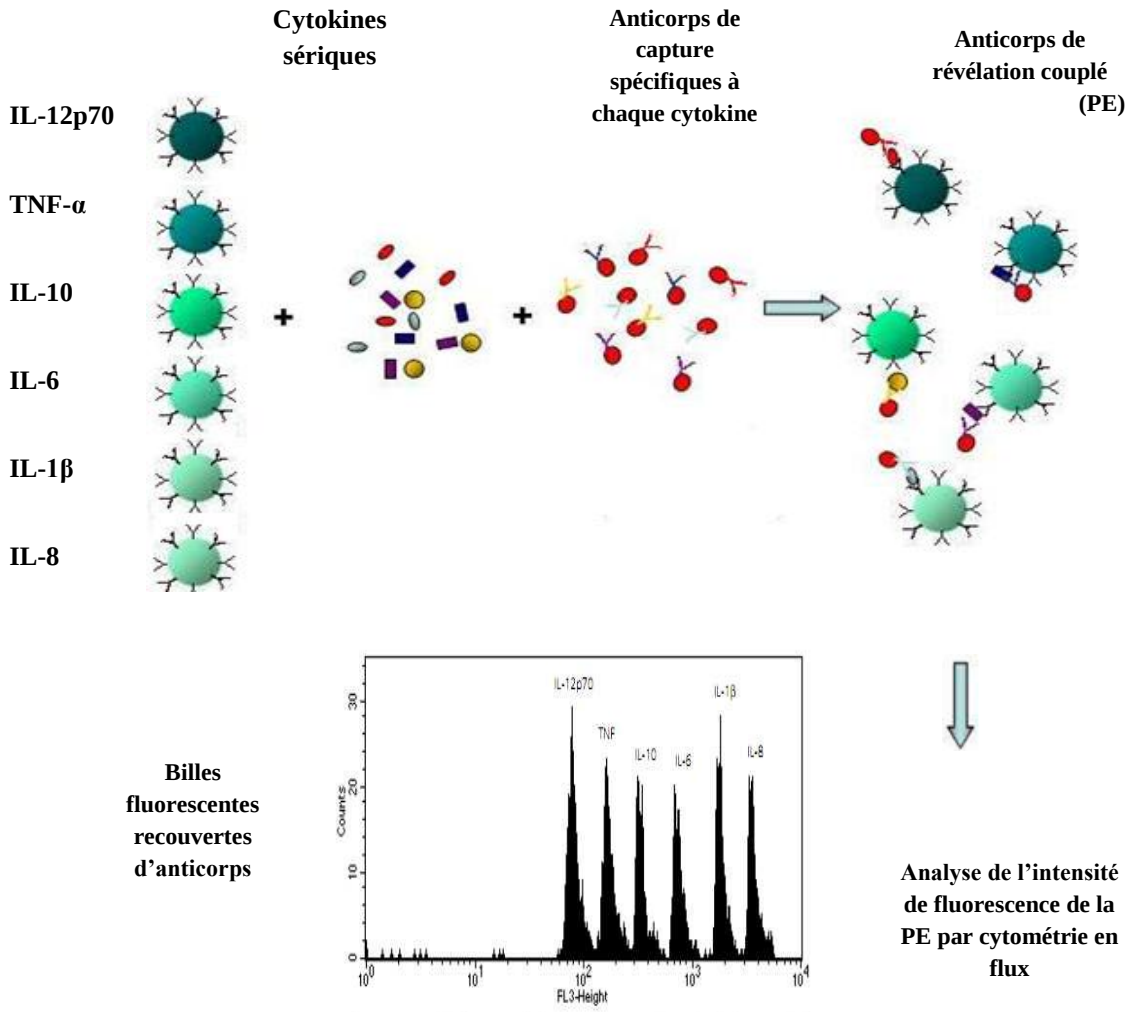
Le dosage simultanée du plasmalogene C16:0 et de l'acide phytanique a été réalisé selon la méthode décrite par **Takemoto *et al.* (2003).** Dans un tube en verre, 100 µL de plasma ou d'érythrocytes et 100 µL de C17:0, utilisé comme un standard interne, ont été mélangés avec 2 mL d'acide hydrochlorique 5% méthanolique. Après agitation, le mélange a été incubé 2 h à 100°C. Après le refroidissement à température ambiante, les dérivées méthylés ont été extraits deux fois avec 2 mL de n-hexane, ensuite séché sous un flux d'azote et dissous finalement 60 µL n-hexane. 1 µL de l'extrait obtenu a été injecté dans le système de CPG/SM (Hewlett Packard 5890 Series II Gaz Chromatograph / Hewlett Packard 5972 MS) équipé du programme informatique HP Chemstation et d'une colonne HP-INNOWAX (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) de diamètre interne 250 µm, de longueur 30 m et d'épaisseur du film 0,25 µm. Les analyses ont été pratiquées dans les conditions suivantes: - gaz vecteur :Hélium - débit colonne : 1,1 mL /min, - mode d'injection : Split et rapport de Split :1/10. Le programme du four était comme suit ; la température initiale du four : 100°C, 15°C/min jusqu'à 240°C pendant 10 min. la température de l'injecteur 240°C et de l'analyseur 280°C ; P 8,9Psi ; EMV 1376V ; PM 70eV. L'acquisition a été faite en mode SIM. La quantification a été faite à partir du rapport entre les surfaces des pics correspondant aux ions choisis pour les composés à doser et à celles des ions choisies pour l'étalon interne. Ce rapport a été comparé à des courbes d'étalonnage réalisées dans les mêmes conditions d'analyse à partir de produits standards.

9 Dosage de cytokines par analyse multiplex par cytométrie en flux

La production des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β, IL-6), régulatrices (IL-12) ou anti-inflammatoires (IL-10), ou de certaines chimiokines (IL-8), sécrétées a été évaluée dans le plasma de sujets sains et atteints de démences en utilisant le kit CBA *(cytometric bead array) (*The multiplexed CBA human inflammation kit (BD-Biosciences)) ou un kit Diaclone. Le kit CBA est constitué de billes (diamétre: 7,5 µm; λ Ex: 488 nm ; λEm: 600) (**Figure 22**). **(Prunet *et al*., 2006).**

Les kits Diaclone utilisés pour doser IL1-β et TNF-α sont des kits simplex. Les méthodes de révélation diffèrent du CBA en faisant intervenir un anticorps de révélation biotinylé et de la streptavidine phycoérythrine **(Prunet *et al*., 2006).**

Cytometric Bead Array (CBA)



<u>Figure 22</u> *: Principe de dosage de cytokines par analyse multiplexe CBA.*

10 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines totales a été réalisé selon la méthode de Bradford **(Bradford, 1976).** C'est un dosage colorimétrique basé sur la propriété du bleu de Coomassie de se lier spécifiquement aux protéines, la longueur d'onde d'absorbance maximale passant de 465 à 595 nm lorsqu'il est lié à une protéine. C'est une méthode rapide, car la fixation est complète après 5 min et l'absorbance du complexe colorant-protéine est relativement stable. L'intensité de la coloration est fonction de la concentration protéique.

À 1 µL d'échantillons protéiques ont été ajoutés 19 µL d'eau distillée et 980 µL de réactif de Bradford. La lecture d'absorbance à 595 nm a été effectuée après une incubation du mélange pendant 5 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une courbe d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution de BSA.

III Modèle animal

1 Isolement des cerveaux et inclusion en paraffine

Les cerveaux de 3 souris femelles sauvages (wild type : WT) et de 3 souris transgéniques portant la mutation (APP PS1 ΔE9) et âgées de 11-12 mois ont été remis par le Dr Marie-Stéphane Aigrot (Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France). Ces souris transgéniques produisent 5 à 6 fois plus de protéine APP mutée que de protéine endogène et ont des taux d'$A\beta_{1-40}$ et d'$A\beta_{1-42}$ très important. Les cerveaux de ces souris ont été fixés par perfusion en PFA 2% et conservés en PFA 3,7% pendant environ 1 semaine. Ils ont ensuite été inclus en paraffine au Centre de Microscopie de l'IFR Santé STIC IFR100 INSERM (Dijon, France).

2 Immunomarquages sur coupes de cerveaux déparaffinées.

Afin d'étudier l'expression de biomarqueurs conventionnels de la maladie d'Alzheimer (Aβ et protéine Tau), des marqueurs de différents organites (peroxysome, mitochondrie, lysosome) et du cytosquelette (neurofilament, tubuline), des immunomarquages ont été effectués sur des cerveaux de souris sauvages WT et transgéniques (APP PS1 ΔE9). Pour cela, les blocs obtenus ont été coupés au microtome afin d'obtenir des sections d'environ 5 µm et de 12 µm. Les coupes de tissus ont ensuite été déposées sur des lames et fixées avec de l'albumine diluée au 1/100 dans de l'eau. Les lames ont été égouttées, séchées sur une platine à 58°C puis à l'étuve (2 h à 50°C). Afin d'assurer une bonne réactivité des anticorps, les lames ont été déparaffinées en les incubant successivement dans une solution de xylène

(deux fois, 5 min), puis dans de l'éthanol absolu (3 min), puis dans l'éthanol à 95% (3 min). Les lames ont ensuite été traitées avec une solution de blocage (Protéine Block serum free, Dako) pendant 30 min afin de bloquer les sites aspécifiques. Un rinçage des lames été réalisé 2 fois pendant 5 min avec du TBS-Tween. Une incubation des lames avec 200 µL d'anticorps primaire anti-amyloïde-β, anti-tau phosphorylé, anti-catalase, anti-ACOX1, anti-ABCD3, anti-cytochrome c, anti-LAMP1, anti-α tubuline et anti-neurofilament (**Tableau 1**). Après incubation d'une heure en chambre humide à température ambiante, les lames ont été rincées 2 fois pendant 5 min avec du TBS-Tween et incubées durant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires appropriés couplés soit à l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), soit à l'Alexa fluor 488, soit à la peroxydase de Raifort (HRP) (**Tableau 1**). Les lames ont été rincées avec du TBS-Tween puis celles incubées avec l'anticorps secondaire couplé avec HRP ont été mises en contact pendant 30 min avec la solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB Chromogen–Substrat, Dako). Lors de l'oxydation, la DAB forme un produit final marron sur le site de l'antigène cible. L'excès de réactif a été éliminé par rinçage des lames à l'eau du robinet. Les noyaux ont été colorés soit à l'hémalun, colorant acide, pendant 5 min, soit au Hoechst 33342 (1 µg/mL).

Après rinçage des lames à l'eau du robinet pour la coloration hémalun ou au PBS pour la coloration Hoechst, les lames ont été montées avec liquide de montage (Dako). Lorsque les lames sont montées à l'automate la procédure est la suivante : de fines gouttes de xylène sont appliquées sur la lame et un film plastique est collé permettant ainsi de protéger le marquage. Les lames ont été conservées à 4°C avant d'être observées au microscope optique ou à fluorescence (Axioskop, Zeiss) ou confocal (Leica). Les lames traitées avec l'anticorps couplé FITC ou Alexa 488 ont été observées par excitation avec une lumière bleue à l'objectif X 20, X 40, X 63 ou X 100. Les lames traitées avec l'anticorps couplé HRP ont été observées sous lumière blanche aux objectifs X 20, X 40, X 63 ou X 100. Les images obtenues ont été digitalisées en utilisant une caméra Axiocam (Zeiss) ou le logiciel associé au microscope confocal.

3. Colorations sur coupes de cerveaux déparaffinées.

L'expression de biomarqueurs conventionnels de la maladie d'Alzheimer (Aβ et protéine Tau), des marqueurs de la mitochondrie, du lysosome et du cytosquelette (actine), des colorations ont été effectués sur des cerveaux de souris sauvages WT et transgéniques (APP PS1 ΔE9) en utilisant différents fluorochromes.

Pour cela, des coupes de tissus (5 µm et de 12 µm d'épaisseur) ont été déposées et fixées sur lames puis déparaffinées comme décrit ci-dessus.

4. Dosage des acides gras et de plasmalogène-C16 :0 dans le cerveau, le plasma et les érythrocytes de souris sauvage et transgénique APP PS1Δ9

Pour ces dosages, une souris transgénique et une souris sauvage ont été utilisées. Le sang a été prélevé sur EDTA au sinus rétro-orbitale sur les souris anesthésiées. Les érythrocytes et le plasma ont été séparés par centrifugation à 1 500 g pendant 10 min à 4°C. Les cerveaux ont été broyés au potter. Les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à l'analyse par CPG/SM selon le protocole décrit au chapitre 8 « Dosage du plasmalogène et de l'acide phytanique plasmatique et érythrocytaire par CPG/SM ».

RÉSULTATS

A. Etude In Vitro

I Effets du C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur la prolifération cellulaire, le dysfonctionnement des organites et la mort cellulaire

Afin de préciser les effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur des cellules neuronales humaines en culture, cellules SK-N-BE, différentes méthodes de biochimie, d'imagerie et de cytométrie en flux ont été utilisées. Plusieurs paramètres morphologiques et fonctionnels ont été évalués au niveau des cellules mises en présence des acides gras à différentes concentrations (0,1, 1, 5, 10 et/ou 20 µM) pendant 48 h. Les concentrations choisies sont dans la gamme des taux plasmatiques trouvés chez 15 malades Alzheimer (Service de Neurologie, CHU Fattouma Bourguiba, Monastir, Tunisie): C22:0 (Moyenne 4,2 µM ; gamme, 0,8-8,4 µM) et C24:0 (moyenne 4,9 µM, gamme 0,8-10,6 µM) (**Zarrouk *et al*., 2012**).

Pour chaque acide gras dosé par CPG/SM, la quantité incorporée et la quantité métabolisée ont été calculées. La quantité incorporée est calculée comme suit : quantité apportée dans le milieu en début de traitement – quantité trouvée dans le milieu en fin de traitement. La quantité métabolisée est calculée de la façon suivante : quantité incorporée par les cellules en fin de traitement – quantité trouvée dans les cellules en fin de traitement. Dans ces conditions, quels que soit les acides gras considérés, la quantité métabolisée est pratiquement égale à la quantité incorporée qui est elle-même proche de la quantité apportée. Ainsi, à 10 µM et à 48 h de traitement, les SK-N-BE incorporent et métabolisent pratiquement tous les acides gras (AGTLCs : C22:0, C24:0 et C26:0) avec lesquels elles sont mises en présence.

La prolifération et la viabilité cellulaires ont été évaluées par plusieurs méthodes. Une numération des cellules viables par coloration au Bleu Trypan, une évaluation de la confluence par coloration au Crystal violet, une estimation de la morphologie et de l'ultrastructure des cellules par microscopie en contraste de phase et microscopie électronique à transmission.

1 Effets du C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur la prolifération

1.1 Numération cellulaire en présence de bleu trypan

Le nombre total de cellules SK-N-BE viables a été déterminé par coloration au bleu trypan. Ce colorant est capable de pénétrer dans les cellules mortes et leur confère une couleur

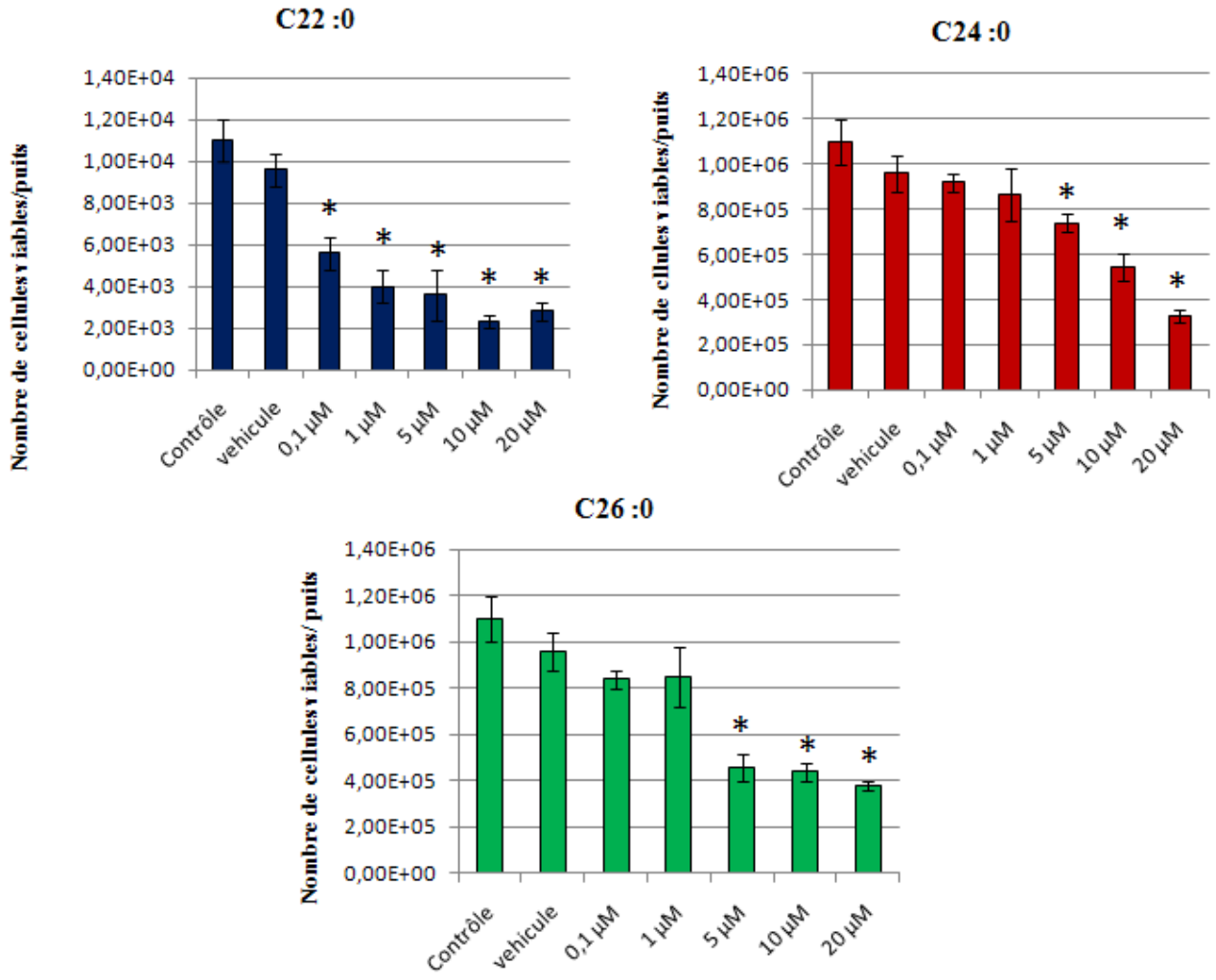
bleue alors qu'il est rapidement rejeté par les cellules vivantes qui gardent leur réfringence sous microscope en contraste de phase. Après 48 h de traitement avec le C22:0 et les AGTLCs (C24:0 et C26:0) utilisés à différentes concentrations, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été collectées, colorées au bleu trypan et un comptage des cellules totales (vivantes et mortes) a été effectué. Une représentation du nombre des cellules viables est montrée dans la **Figure 23.**

Dans les conditions de traitement des cellules SK-N-BE avec C22:0, C24:0 et C26:0 (0,1-20 µM), une réduction marquée et dose dépendante du nombre total de cellules viables après 48 h de traitement est observée. La diminution du nombre total de cellules viables déterminée en présence de bleu Trypan est significative à partir de la concentration 0,1 µM pour C22:0 et de 5 µM pour C24:0 et C26:0. En effet, le nombre de cellules viables passe de 9.6 E^{+05} suite au traitement avec le véhicule à 4.8 E^{+05}, 7.4 E^{+05} et 4.6 E^{+05} suite aux traitements respectifs par C22:0 (0,1 µM), C24:0 et C26:0 (5 µM). Le traitement par l'α-cyclodextrine, réalisé afin d'évaluer la toxicité du véhicule utilisé, ne montre pas d'effet significatif sur le nombre de cellules viables.

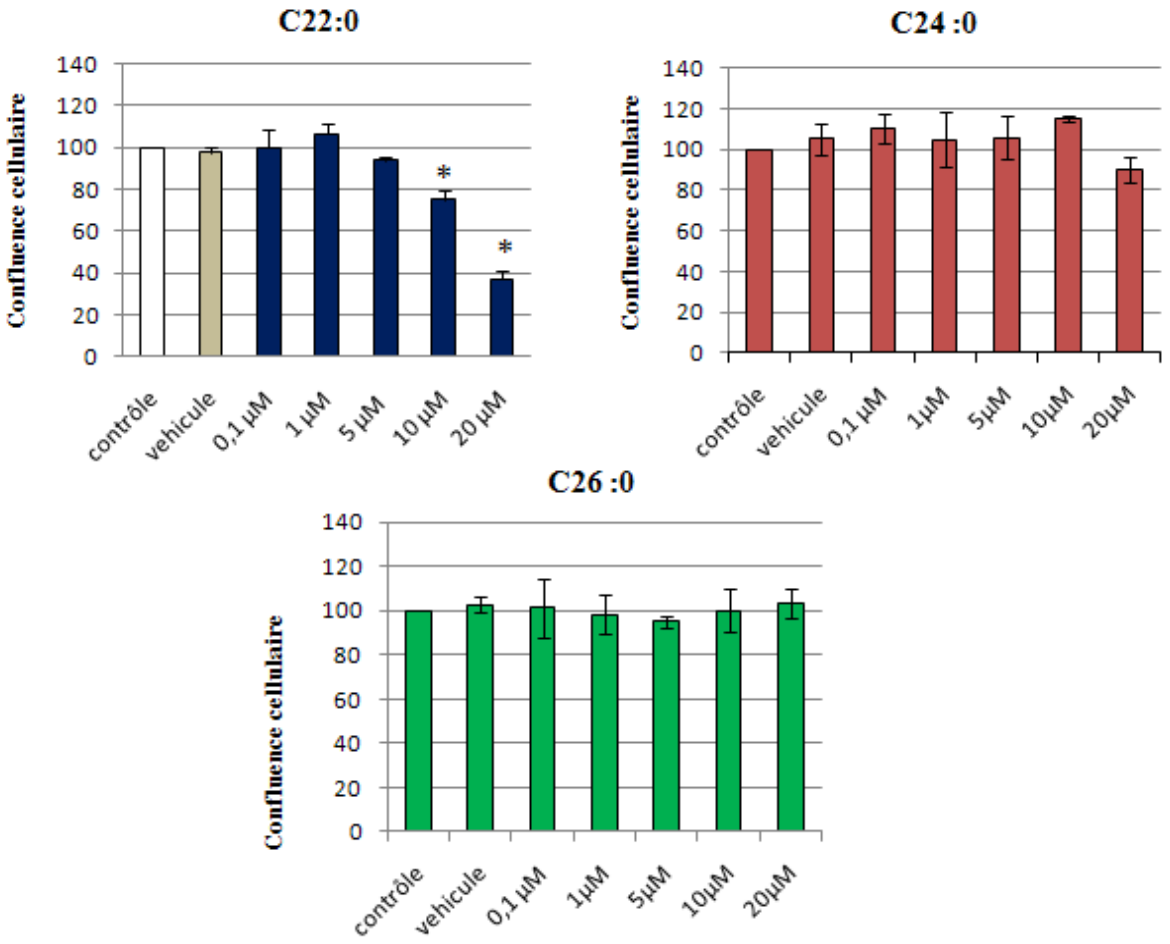
1.2 Evaluation de la confluence par coloration au Crystal Violet

L'effet de C22:0 et des AGTLCs (C24:0 et C26:0) sur la confluence et l'adhésion des cellules SK-N-BE a été mis en évidence en utilisant le Crystal violet. Ce dernier permet la visualisation des noyaux et l'évaluation de la confluence cellulaire. Ainsi, les cellules SK-N-BE ont été cultivées dans des plaques de 12 puits et traitées avec les acides gras (AGTLCs) aux concentrations allant de 0,1 à 20 µM. Après traitement durant 48 h, une coloration au Crystal violet a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 24**.

La confluence des cellules SK-N-BE diminue significativement suite à leur traitement par le C22:0 à 10 et 20 µM. Cette diminution est moins marquée suite au traitement avec le C24:0 à 20 µM. Aucun effet de C26:0 sur la confluence n'a été détectée quel que soit la concentration utilisée d'AGTLCs.



<u>Figure 23:</u> ***Numération des cellules SK-N-BE en présence de C22:0, C24:0 et C26:0*** **(Zarrouk *et al.*, 2012).** *Les cellules SK-N-BE ont été cultivées pendant 24 h puis incubées en absence (contrôle) ou en présence d'α-cyclodextrine (Véhicule à 1 mg/mL ; correspondant à AGs 20 µM)) ou d'acides gras utilisés à différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 µM) pendant 48 h Les résultats sont obtenus suite à la coloration au Crystal violet et présentés sous forme de moyenne ± SEM d'au moins trois expériences indépendantes conduites en duplicata. L'analyse des données a été faite par le test de Mann Whitney. La différence significative entre le véhicule et les cellules traitées aux AGs est indiquée par * P< 0,05. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine.*



<u>Figure 24</u>: *Analyse de la confluence cellulaire par coloration au Crystal violet*. *Les cellules SK-N-BE ont été cultivées pendant 24 h puis incubées en absence (contrôle) ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/mL) ou d'AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0) utilisés à différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20µM) pendant 48 h. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM de moins trois expériences indépendantes conduites en duplicata. L'analyse des données a été faite par le test de Mann Whitney. La différence significative entre le véhicule et les cellules traitées avec AGTLCs est indiquée par * P< 0,05.*

1.3 Evaluation des modifications de la morphologie cellulaire

Les cellules SK-N-BE ont été cultivées dans des plaques de 12 puits pendant 24 h et traitées avec les différents AGTLCs aux concentrations allant de 0,1 µM jusqu'à 20 µM.

Après 48 h de traitement, les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à contraste de phase et des images ont été prises pour chaque condition de traitement (**Figure 25**).

En comparant les cellules contrôle et les cellules traitées à l'α-cyclodextrine avec les cellules traitées avec les différents AGTLCs, une diminution du nombre des cellules viables

est remarquée dés 5 µM de traitement avec C22:0, C24:0 et C26:0. Cette diminution est associée à une augmentation dose dépendante du nombre des cellules rondes qui correspondent aux cellules les moins adhérentes et mourantes, particulièrement pour le traitement avec C22:0 à 20 µM. La morphologie des cellules contrôles et des cellules traitées avec la véhicule ne présente pas des changements marqués

Une indice de la forme des cellules, basée sur les observations faites par microscopie à contraste de phase, a été calculée en rapportant le nombre des cellules totales au nombre de cellules rondes par mm^2. Cet indice montre une augmentation dose dépendante de cellules rondes sous traitement avec les différent AGTLCs utilisés, particulièrement avec C22:0 (20 µM). Dans cette condition, les cellules se sont décollées en totalité en formant des amas de cellules rondes. Les différences entre cellules traitées et non traitées sont significatives à partir de 1 µM de traitement avec n'importe quel AG utilisé (**Figure 26**).

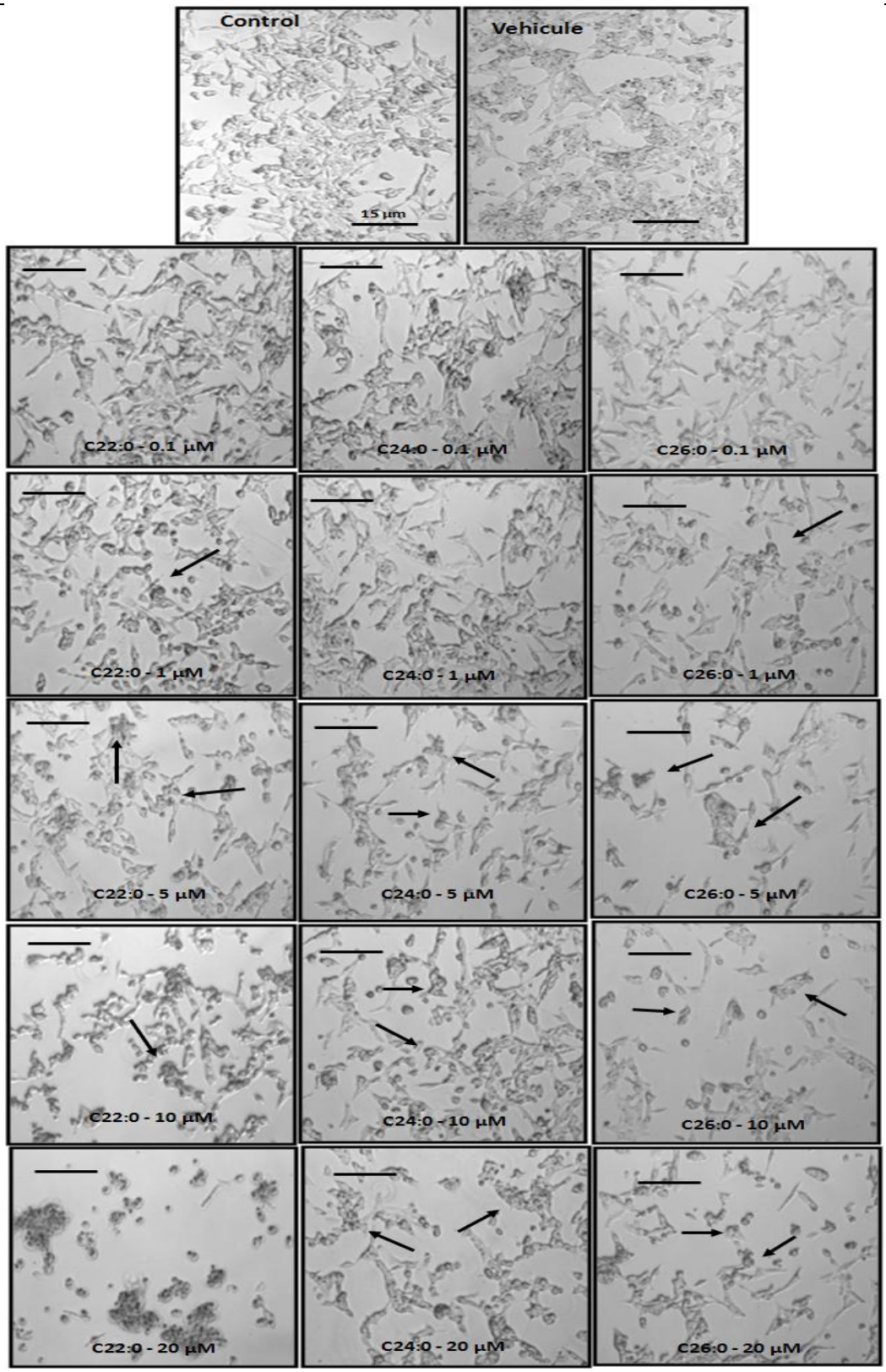


Figure 25 : ***Observation des cellules par microscopie en contraste de phase*** **(Zarrouk *et al.*, 2012).** *Les cellules SK-N-BE cultivées dans des plaques de 12 puits puis traitées avec les AGs (C22:0, C26:0 et C26:0) ont été observées en microscopie en contraste de phase, les flèches indiquent les cellules rondes et mourantes.*

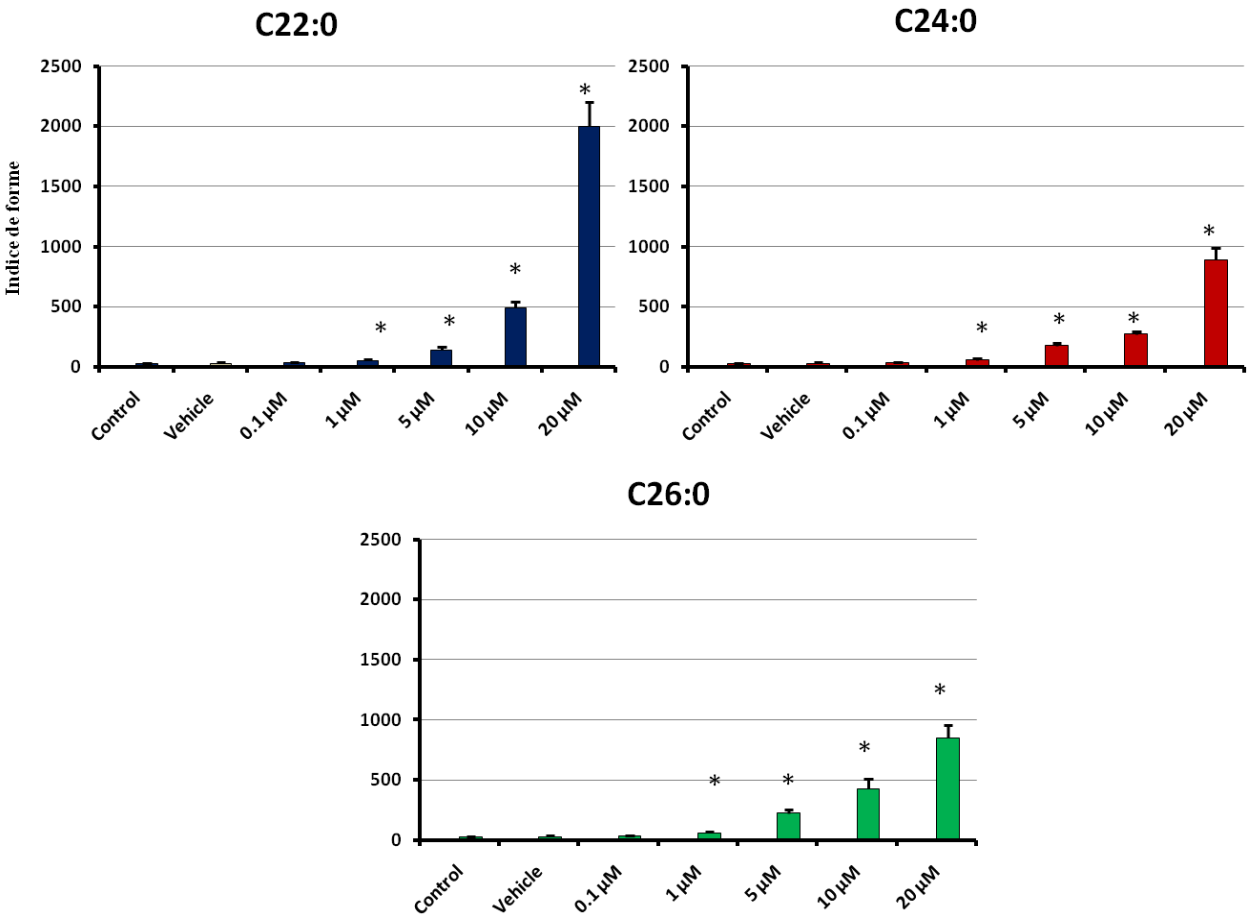
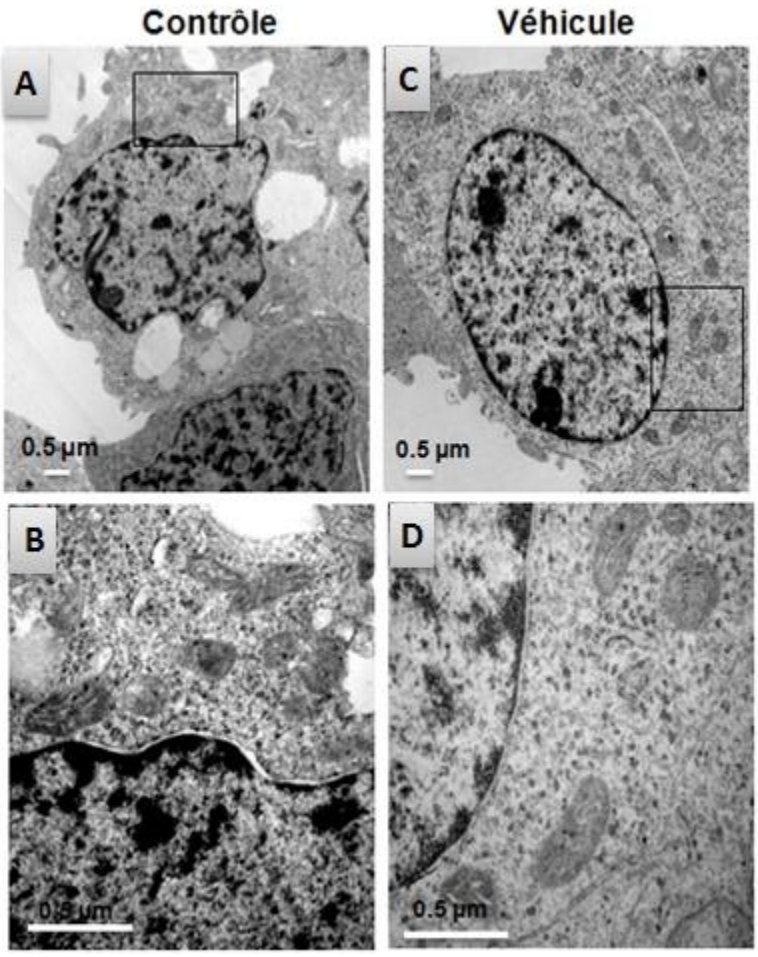


Figure 26: ***Quantification des changements morphologiques par le calcul de l'indice de forme*** **(Zarrouk *et al.*, 2012)**. *Les cellules SK-N-BE ont été cultivées en absence (contrôle) ou en présence d'α-cyclodextrine (1mg/mL) (véhicule), ou avec l'un des AGTLCs (C22:0, C24:0, ou C26:0) utilisé à 0,1–20 µM. L'induction des changements morphologiques associés à la présence de cellules rondes observées suite au traitement avec les AGTLCs a été quantifiée par le calcul de l'indice de forme suite à leur observation en contraste de phase. L'analyse des données a été faite par le test de Mann Whitney. La différence significative entre le véhicule et les cellules traitées avec AGTLCs est indiquée par * P< 0,05. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine.*

1.4. Evaluation des modifications de l'ultrastructure cellulaire

Les modifications de la morphologie des cellules traitées avec les AGTLCs et révélées par microscopie en contraste de phase peuvent refléter des modifications intracellulaires affectant les organites, le cytosquelette…

La microscopie électronique à transmission a été utilisée pour visualiser les modifications ultrastructurales induites par les AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0 utilisés à 10 µM). L'observation des cellules contrôle (**Figure 27 A, B**) et traitées par le véhicule (**Figure 27 C, D**) n'a pas montré des changements morphologiques entre les deux conditions. Des changements majeurs de la distribution et de l'aspect (taille et forme) des mitochondries ont été observés dans les cellules traitées avec les AGTLCs. Ainsi, un regroupement des mitochondries dans des zones diverses du cytoplasme a été remarqué (**Figure 27 E, G, I**). De plus, certains de ces mitochondries présentent des tailles et des formes différentes par rapport à celles trouvées dans le contrôle et le véhicule : elles présentent des formes allongées (**Figure 27 F, H**) ou rondes (**Figure 27 J**).



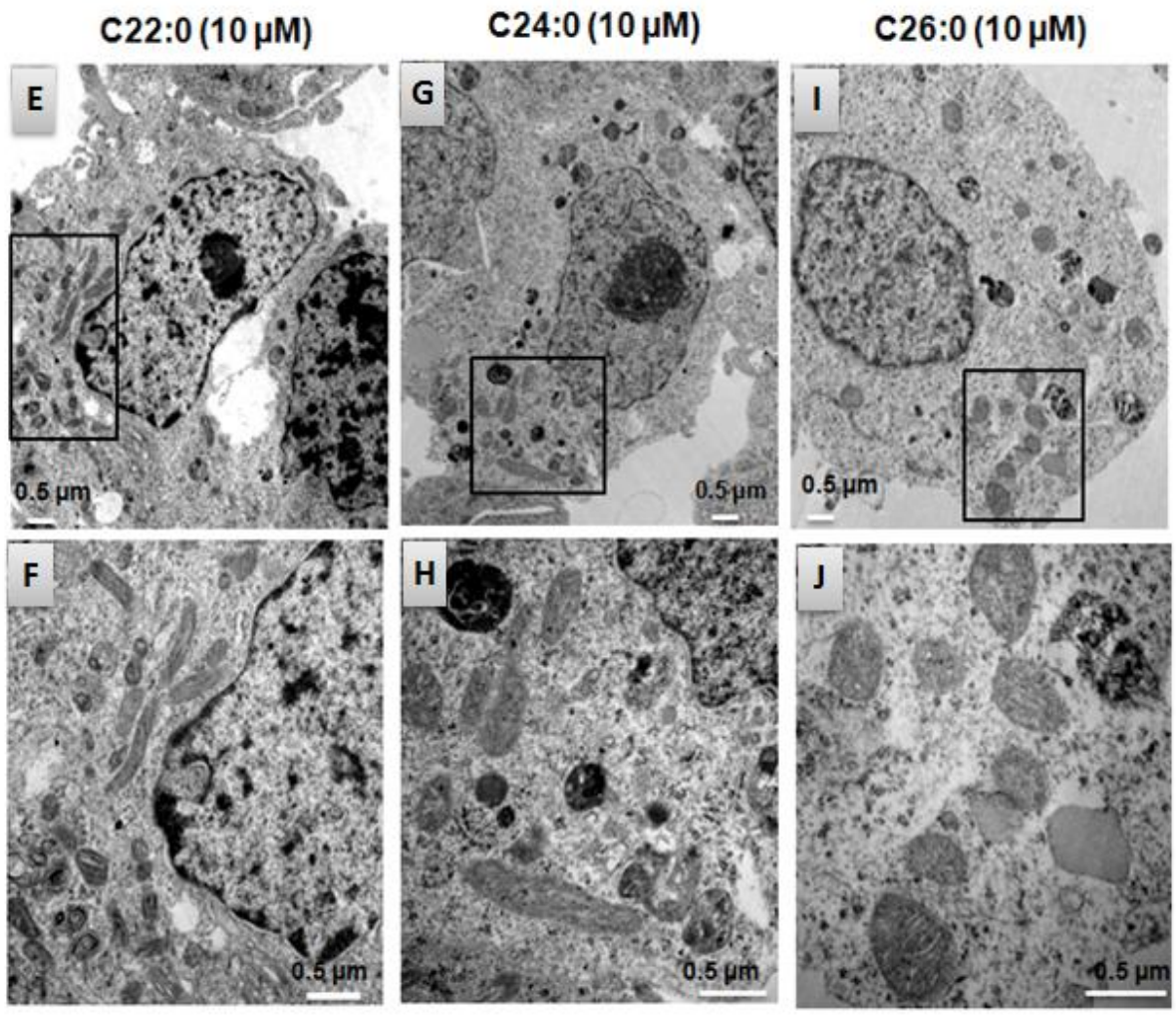


Figure 27 : ***Evaluation par microscopie électronique à transmission des caractéristiques ultrastructurales des mitochondries dans les cellules humaines neuronales (SK-N-BE) traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0*** **(Zarrouk *et al.*, 2012)**. *L'observation par microscopie électronique à transmission des cellules SK-N-BE cultivées pendant 48 h en l'absence (cellules contrôle) (**A, B**), ou la présence d'α-cyclodextrine (1 mg / mL) (véhicule) (**C, D**), C22:0 (10 µM) (**E, F**), C24:0 (10 µM) (**G, H**), ou C26:0 (20 µM) (**I, J**). Les inserts dans les figures **A, B, C, D et E** correspondent respectivement aux figures, **G, H, I et J**.*

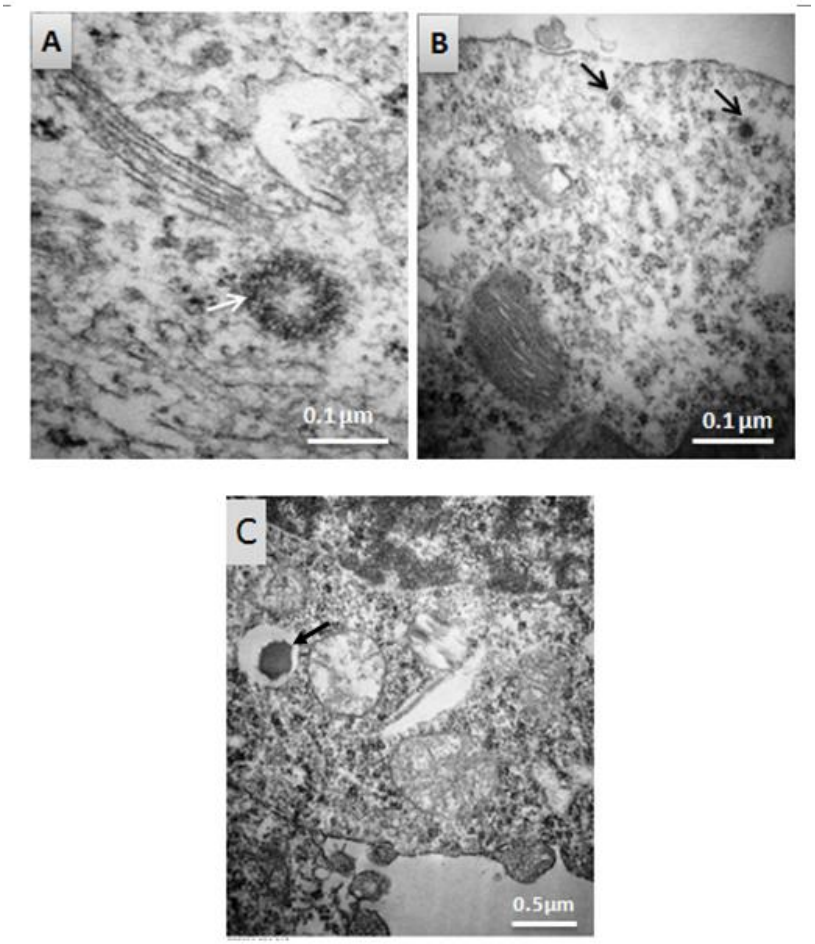


Figure 28: *Evaluation par microscopie électronique à transmission de microtubules, de peroxysomes et de vacuoles.* ***A*** *: microtubules (flèche blanche) ;* ***B*** *: peroxysomes (flèches noires) ;* ***C*** *: vacuoles de pexophagie (flèche noire)*

L'observation des cellules SK-N-BE nous a permis de mettre en évidence des constituants cellulaires essentiels à savoir les microtubules (**Figure 28 A**) qui apparaissent sous forme de cylindres dont la paroi est formée de protofilaments constitués chacun par des dimères de tubuline α et β. Les dimères α-β sont décalés les uns par rapport aux autres ce qui confère l'aspect hélicoïdal à la paroi des microtubules. Les observations ont aussi montré la présence de peroxysomes révélés par coloration à la diaminobenzidine (**Figure 28 B**) et de vacuoles de pexophagie (autophagosome) au niveau du cytoplasme cellulaire (un peroxysome est à l'intérieur d'une vacuole (**Figure 28 C**).

2. Effet de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur les mitochondries

2.1 Evaluation de l'activité mitochondriale et de la densité cellulaire

La cytotoxicité des AGTLCs a été testée, par la réalisation d'un test MTT sur des cellules neuronales exposées à des concentrations d'AGTLCs allant de 0,1 µM à 20 µM pendant 48 h (**Figure 29**)**.** Les résultats de ce test ont montré une nette diminution du pourcentage des cellules MTT positives proportionnellement à l'augmentation de la concentration d'AGTLCs. Cette diminution est donc dose dépendante. Le pourcentage des cellules MTT positives reflète la proportion des cellules capables de réduire le MTT en formazan de couleur bleu sous l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Cela fournit à la fois des informations sur la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial.

L'incubation des cellules SK-N-BE pendant 48 h avec les AGTLCs (0,1-20 µM) a induit une diminution dose dépendante de cellules MTT positives. Cette diminution est significative dés 0,1 µM de traitement avec C22:0 et 5 µM de C24:0 et C26:0. Des pourcentages de cellules MTT positives semblables ont été obtenus pour les cellules contrôle et traitées avec l'α-cyclodextrine. Dans le but de définir si la diminution de l'activité de la succinate déshydrogénase est due à un dysfonctionnement des mitochondries ou à une altération de leur masse, une évaluation du potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi m$) et de la masse mitochondriales a été effectuée.

2.2. Effet sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

La mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial est utilisée pour caractériser un désordre de l'activité métabolique mitochondriale et la mort cellulaire à un stade précoce. Le $\Delta\Psi m$ a été mesuré par coloration au $DiOC_6(3)$. L'accumulation de ce fluorochrome dans la mitochondrie dépend du $\Delta\Psi m$; l'intensité de fluorescence est donc fonction de $\Delta\Psi m$. La perte de la capacité des mitochondries à accumuler cette sonde cationique témoigne de la transition de la perméabilité membranaire mitochondriale.

L'incubation de cellules SK-N-BE avec l'un des AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0) aux concentrations allant de 0.1 à 20 µM pendant 48 h et leur analyse par cytométrie en flux après coloration avec le DiOC6 (3) a abouti à une augmentation marquée et dose dépendante du pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées ayant un $\Delta\Psi m$ diminué L'augmentation de cellules avec mitochondries dépolarisées est statistiquement significative à partir de 1 µM de traitement avec C22:0 et C24:0 et dés 0,1 µM avec C26:0. Aucune

différence significative des pourcentages de cellules avec mitochondries dépolarisées n'a été observé entre les cellules contrôle et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine (**Figure 30**).

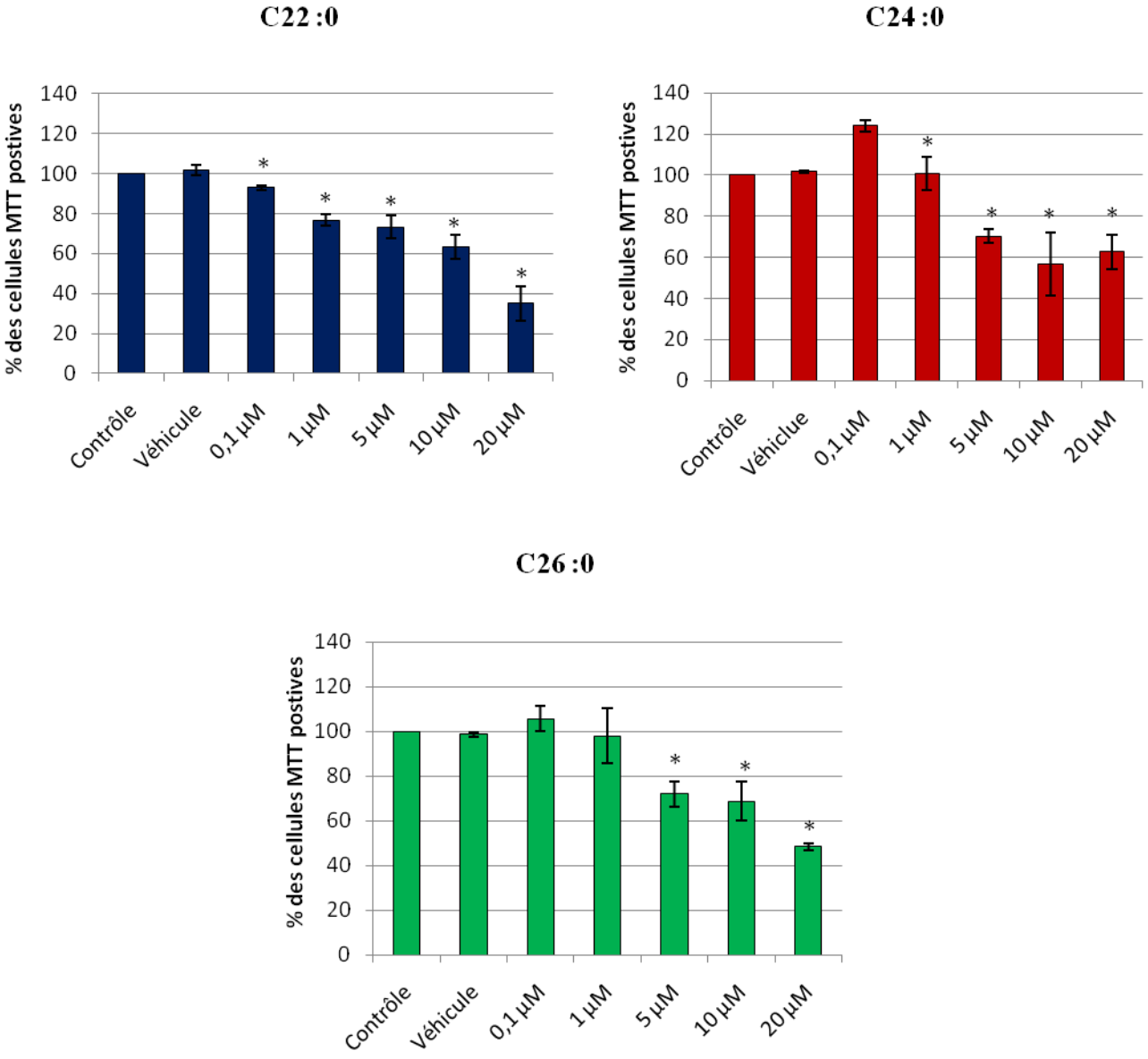
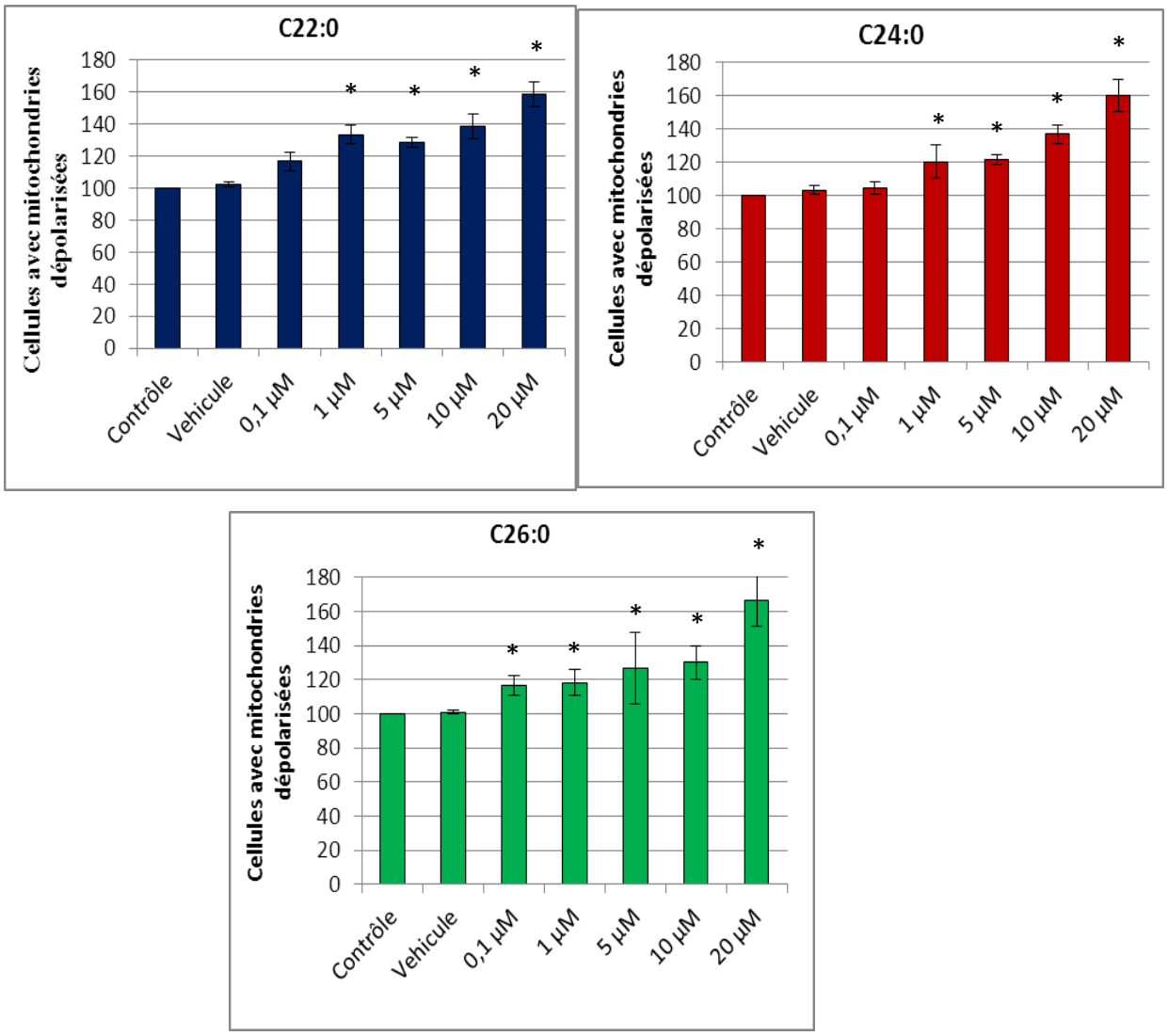


Figure 29: ***Évaluation des effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial avec le Test MTT*** **(Zarrouk *et al.*, 2012).** *Les cellules SK-NB-E ont été cultivées pendant 48h en absence (contrôle) ou en présence de l'a-cyclodextrine (1mg/mL) (véhicule), ou avec un AG utilisé à 0,1-20 µM. L'analyse des données a été faite par le test de Mann Whitney. La différence significative entre le véhicule et les cellules traitées avec AGs est indiquée par * P< 0,05. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine.*



<u>Figure 30:</u> ***Évaluation des effets des AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) sur le potentiel transmembranaire mitochondrial*** **(Zarrouk *et al.*, 2012).** *Les cellules SK-N-BE ont été cultivées (48 h) en absence (contrôle) ou en présence de l'α-cyclodextrine (1mg/mL) (véhicule), ou avec un AG (C22:0, C24:0, ou C26:0) utilisé à 0,1-20 µM. Le potentiel transmembranaire mitochondrial a été déterminé après coloration avec le $DiOC_6$ (3) pour quantifier les cellules avec mitochondries dépolarisées.*

2.3. Effet sur la masse et la distribution des mitochondries

Pour évaluer la distribution des mitochondries (topographie mitochondriale) dans le cytoplasme cellulaire, les cellules SK-N-BE, ensemencées sur des lamelles en verre et traitées avec différentes concentrations d'AGTLCs (5, 10 et 20 µM) pendant 48 h ont été incubées avec la solution de MitoTracker Red qui a la capacité de traverser la membrane plasmique par diffusion passive et de s'accumuler de façon spécifique dans les mitochondries métaboliquement actives.

L'observation des cellules contrôles et traitées avec l'α-cyclodextrine colorées au microscope à fluorescence a montré la présence de multiples points fluorescents répartis de façon régulière dans le cytoplasme cellulaire ce qui reflète une répartition uniforme des mitochondries. Au contraire, l'observation des cellules traitées avec les AGTLCs, a montré une distribution souvent diffuse et irrégulière des mitochondries suggérant une modification de la distribution de ces organites / ou des caractéristiques de leur membrane **Figure 31**.

Pour étudier la masse mitochondriale et/ou la quantité de mitochondries par cellules, les cellules SK-N-BE, ont été ensemencées dans des plaques de 12 puits et traitées avec différentes concentrations d'AGTLCs pendant 48 h. Une coloration au MitoTraker Red a été effectuée sur les cellules mises en suspension. Les résultats obtenus après analyse au cytomètre en flux sont présentés dans la **Figure 32.**

Le traitement des cellules avec les AGTLCs a induit une augmentation de l'intensité de la fluorescence proportionnellement à l'augmentation de la concentration en AGTLCs. Cette augmentation s'observe à partir de 5 µM de traitement tout en étant plus marquée avec le traitement au C22:0 avec 70 % d'augmentation par rapport au contrôle et au véhicule. Cette augmentation est de 9 et 35 % respectivement pour C24:0 et C26:0.

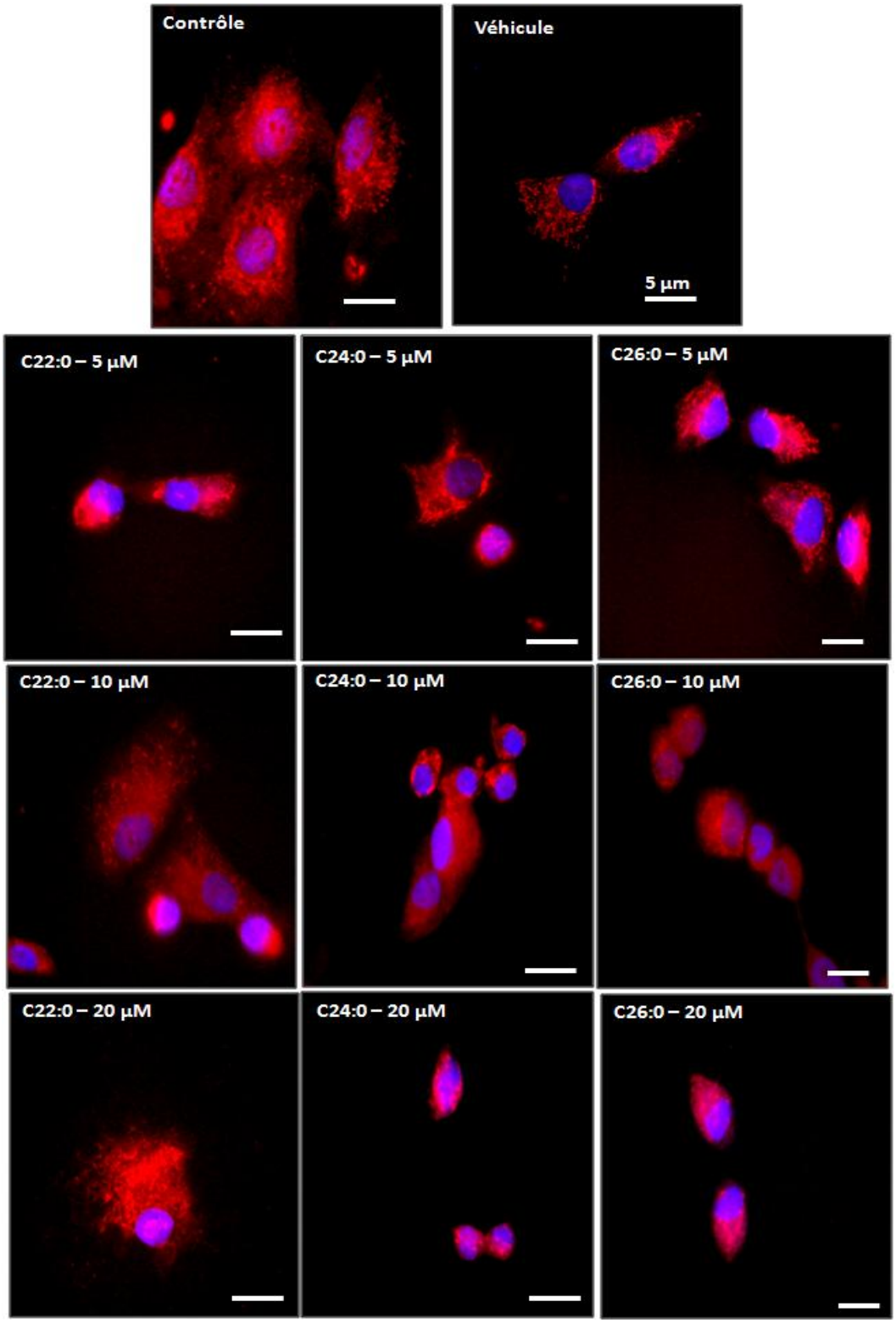
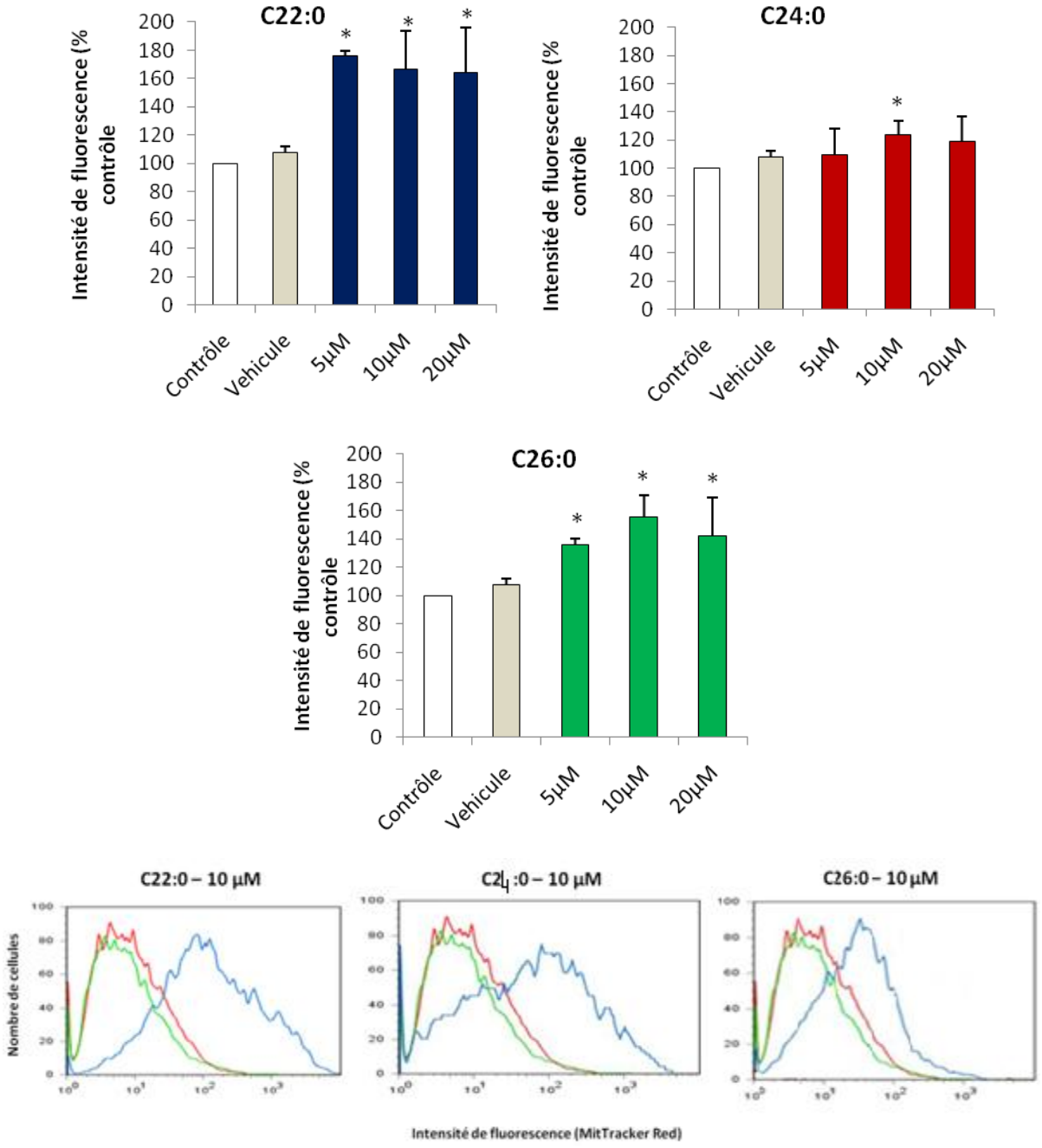


Figure 31: *Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la topographie mitochondriae.* *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (vehicule : 1 mg/mL) ou d'un AG (5, 10 et 20 µM). Les mitochondries ont été identifiées par coloration au MitoTracker Red* **(Zarrouk *et al.*, 2012)**



<u>Figure 32</u>: ***Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la masse mitochondriale.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/mL) ou d'un AG. Après coloration au MitoTracker Red, une analyse des cellules au cytomètre en flux a été effectuée* **(Zarrouk *et al.*, 2012)**

2.4. Effet sur le taux d'ATP

L'ATP est la source majeure d'énergie dans la cellule, il est synthétisé au niveau des crêtes de la membrane interne des mitochondries lors de la respiration cellulaire.

Afin d'évaluer l'effet des AGTLCs sur la mitochondrie, une étude de la production de l'ATP mitochondriale a été effectuée. Ainsi, les cellules SK-N-BE ont été traitées avec 5 et 10 µM de l'un des AGs (C22:0, C24:0 ou C26:0) pendant 48 h. Les résultats du dosage réalisé sur des lysats de cellules sont présentés dans la **Figure 33.**

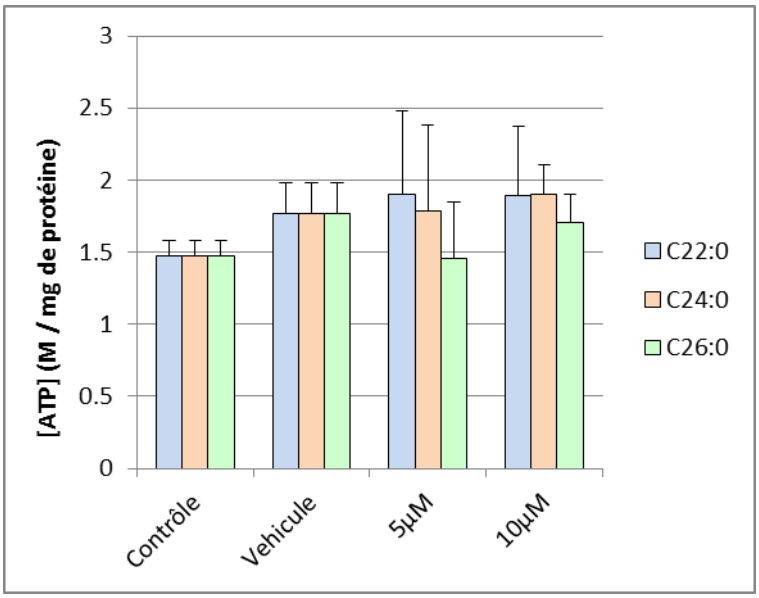


Figure 33: ***Evaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux d'ATP mitochondrial.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/mL) ou d'un AG (5-10 µM). Un dosage de l'ATP a été réalisé par mesure de la bioluminescence produite par la réaction enzymatique utilisant la luciférine, la luciférase de luciole et l'ATP.*

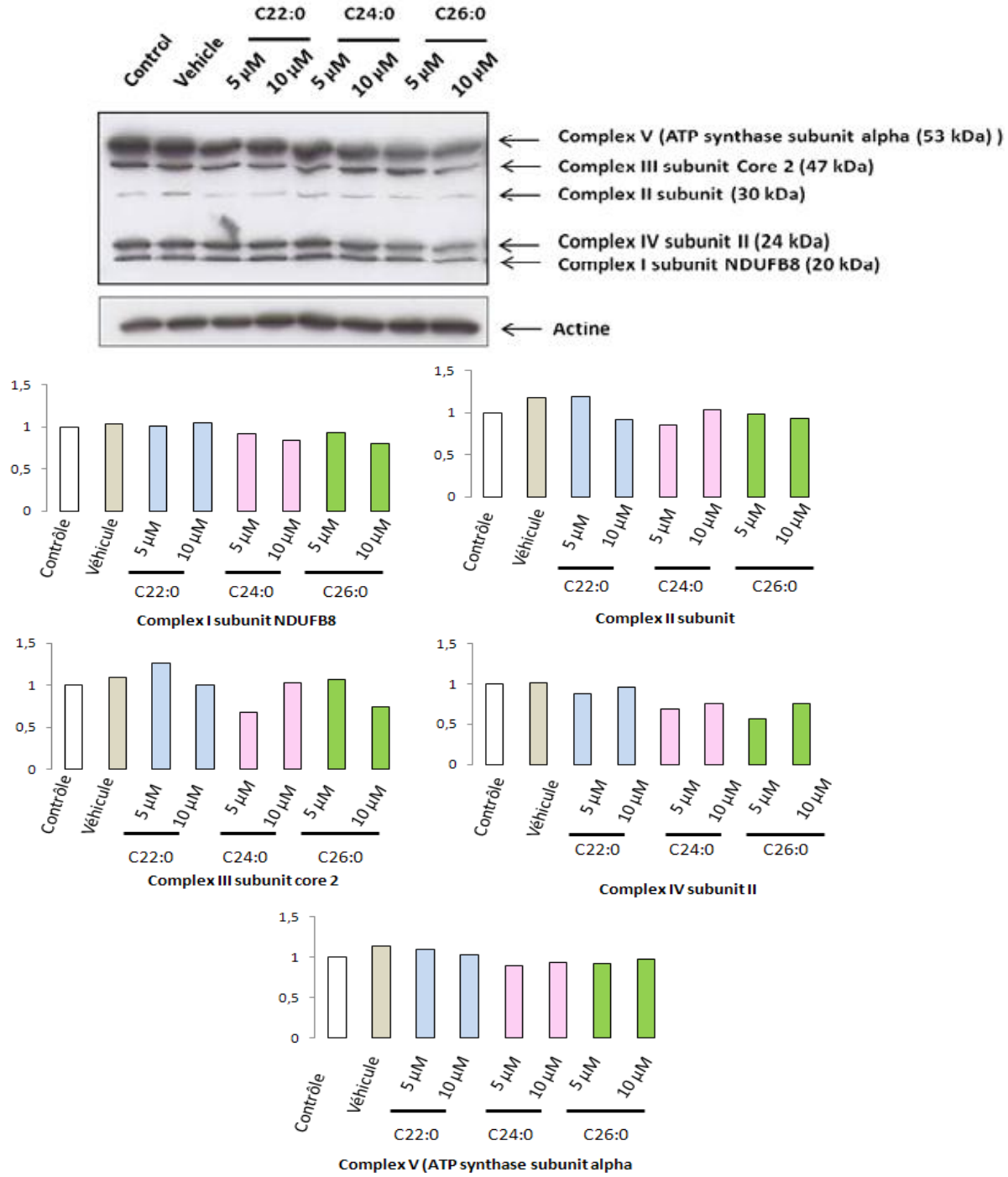
Le traitement des cellules SK-N-BE avec les AGTLCs montre une légère augmentation du taux de l'ATP mitochondrial dans les cellules traitées avec le C22:0 à 5 et 10 µM et avec C24:0 à 10 µM. Le traitement avec C26:0 induit une diminution du taux d'ATP avec 5 µM de traitement. Aucune différence significative n'est observée entre les cellules traitées avec les AGTLCs et celles traitées avec l'α-cyclodextrine.

2.5. Effet sur l'expression de sous-unités des complexes mitochondriaux

La synthèse de l'ATP fait intervenir des complexes associés aux crêtes de la membrane interne des mitochondries. En fait, il s'agit de 5 complexes enzymatiques dont chacun est formé de plusieurs sous unités protéiques à savoir NADH-ubiquinone-oxydoréductase (Complexe I), succinate-ubiquinone-oxydoréductase (Complexe II), cytochrome c- ubiquinone oxydoréductase (Complexe III), cytochrome c-oxydase (Complexe IV) et ATP synthase (Complexe V).

Dans le but d'évaluer un éventuel changement de l'expression des complexes de la mitochondrie suite à un traitement par les AGTLCs, un western blotting a été réalisé sur les extraits protéiques obtenus à partir des cellules SK-N-BE traitées par 5 et 10 µM d'AGTLCs. Pour cela, un cocktail d'anticorps dirigés spécifiquement contre les sous unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale a été utilisé. Les anticorps de ce cocktail sont choisis du fait de leur capacité à s'associer à une sous unité de chaque complexe enzymatique, une sous unité qui est labile quand son complexe n'est pas assemblé. Il s'agit de la sous unité NDUFB8 (20 kDa) du Complexe I, de la sous-unité (30 kDa) du Complexe II, de la sous-unité core 2 de (47 kDa) du Complexe III, de la sous-unité II (24 kDa) du Complexe IV et de la sous unité alpha (53 kDa) du complexe V (ATP synthase). Un western blotting utilisant l'anticorps spécifique de l'actine a été aussi réalisé sur les extraits de cellules traitées par les AGTLCs à 5 et 10 µM et ceci afin de normaliser les niveaux d'expression de chaque complexe. Les blots obtenus ainsi que la quantification effectuée à l'aide du logiciel Image J sont présentés dans la **Figure 34.** Chaque donnée a été déterminée selon la formule suivante : (Valeur normalisée de l'essai) / (valeur normalisée du contrôle).

Un niveau d'expression des différentes sous unités semblable est obtenu pour le contrôle et le véhicule. De légères variations sont remarquées pour les cellules traitées avec le C22:0 pour les sous unités des complexes II, III, et IV. Des différences plus marquées ont été observées suite aux traitements avec C24:0 et C26:0, particulièrement pour la sous-unité Core 2 du Complexe III et la sous-unité II du Complexe IV.



<u>Figure 34:</u> ***Analyse des effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'expression de sous-unités des complexes de la mitochondrie****. Les cellules SK-N-BE ont été cultivées pendant 48 h en absence ou en présence de l'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/mL) ou d'un AGTLC utilisé à 10 µM.* ***A*** *: Les blots obtenues suite à la réalisation du western blotting en utilisant les anticorps spécifiques des sous unités des complexes de la chaîne respiratoire (MitoProfile Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail, Abcam/Mitosciences) et de l'actine.* ***B*** *: Quantification par le logiciel image J de l'intensité de l'expression protéique. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'actine* **(Zarrouk *et al.*, 2012)**

3 Evaluation des effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur le lysosome

3.1. Effets sur l'intégrité des lysosomes

L'acridine orange a été utilisée afin d'évaluer l'intégrité des lysosomes dans des conditions de traitement avec les AGTLCs. L'acridine orange est une sonde métachromatique lipophile capable de traverser les membranes cellulaires. Elle émet de la fluorescence orange/rouge dans des conditions de pH acide. La quantité de fluorescence orange/rouge est donc proportionnelle au volume et à la quantité de compartiments acides dans la cellule. La perméabilisation de la membrane lysosomale et/ou la diminution de l'activité des pompes à protons se caractérise par une diminution de cette fluorescence du fait de la libération du contenu lysosomal dans le cytoplasme. Les cellules SK-N-BE cultivées dans des plaques de 12 puits ont été traitées avec 5, 10 ou 20 µM d'AGTLCs pendant 48 h. Ensuite, une coloration à l'acridine orange a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 35**.

L'analyse par cytométrie n'a révélé aucune différence significative entre le contrôle et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine. Par contre, une déstabilisation significative des lysosomes des cellules SK-N-BE traitées par le C22:0 à 20 µM et le C26:0 à 10 et 20 µM a été observée. Ainsi le pourcentage des cellules avec lysosome déstabilisés par rapport aux cellules traitées par l'α-cyclodextrine est respectivement de 211 %, pour le C22:0 et de 207 et 203 pour le C26:0. Par ailleurs le traitement avec C24:0 ne montre pas d'effet marqué sur les lysosomes. Seul un traitement avec les concentrations 10 et 20 µM de cet AGTLC montre une faible augmentation tout en restant statistiquement non significative.

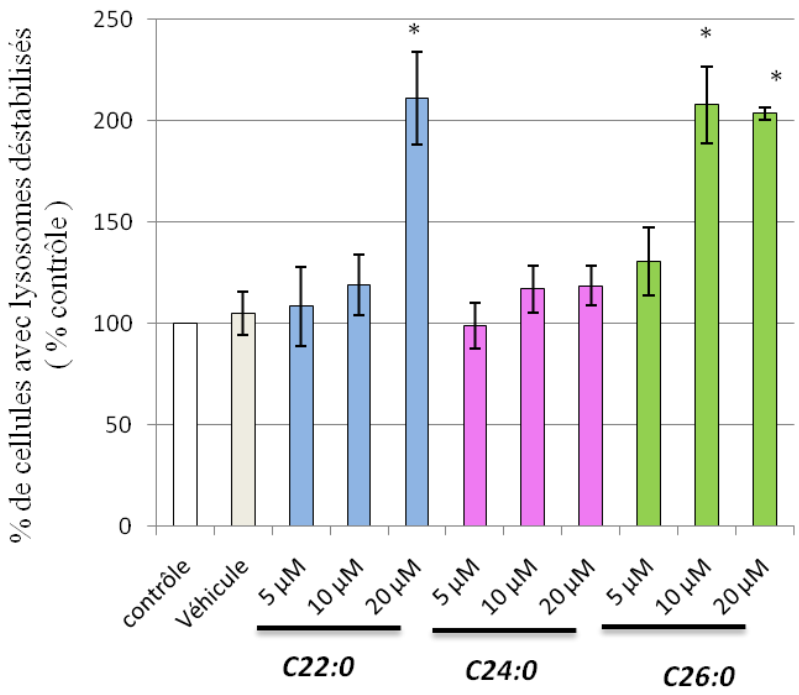


Figure 35: ***Evaluation de l'intégrité lysosomale des cellules SK-N-BE par coloration à l'acridine orange.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/mL) ou d'un AG (5-20 µM). Après coloration à l'acridine orange, une analyse au cytomètre en flux a été réalisée. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par le test de Mann Whitney. La différence significative entre le véhicule et les cellules traitées avec les AGs est indiquée par * P< 0,05.*

3.2. Effet de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur l'autophagie

La présence de vacuoles évoquant des vacuoles d'autophagie détectée par microscopie électronique à transmission dans les cellules traitées par les AGs ainsi que la déstabilisation des lysosomes révélé par coloration à l'acridine orange a conduit à préciser si les AGs pouvaient ou non activer un processus d'autophagie. Pour cela, une étude de la dégradation de la protéine LC3I en LC3II a été réalisée par western blotting sur des cellules SK-N-BE cultivées pendant 8, 12, 24 et 48 h en présence d'AGs à 10 µM. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour valider ou invalider l'intervention de l'autophagie dans la mort cellulaire induite par C22:0 et les AGTLCs (C24:0, C26:0).

4. Evaluation des effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur le peroxysome

Le peroxysome est un organite impliqué dans le métabolisme lipidique puisqu'il assure la β-oxydation des AGTLCs, l'α-oxydation de l'acide phytanique ainsi que la synthèse du DHA et des plasmalogènes. Une évaluation de l'effet de C22:0 et AGTLCs (C24:0 et C26:0) sur cet organite s'est révélée importante pour comprendre le mécanisme de toxicité de ces derniers. Pour cela, une évaluation des effets des AGTLCs sur l'expression de certains marqueurs peroxysomaux a été réalisée.

4.1 Incidence sur l'expression du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3/PMP70

Le transporteur ABCD3 est un constituant majeur de la membrane peroxysomale. La topographie (répartition cellulaire) et l'expression de ce transporteur ont été respectivement étudiées par microscopie à fluorescence conventionnelle et par cytométrie en flux. Les résultats de ces deux analyses sont présentés dans les **Figures 36 et 37**.

L'immunomarquage indirecte des cellules SK-N-BE a été réalisé en utilisant un anticorps primaire dirigé contre la protéine ABCD3 et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Cet immunomarquage a été effectué sur des cellules cultivées sur des lamelles en verre et traitées par les AGTLCs utilisés à 5 et 10 µM.

L'observation des cellules SK-N-BE par microcopie à fluorescence révèle une répartition homogène des peroxysomes et un aspect ponctué dans les cellules contrôle, les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine et avec les AGTLCs. Un nombre plus important de ponctuation semble apparaitre suite au traitement des cellules avec les AGTLCs à 5 et 10 µM. Ceci pourrait être expliqué par l'augmentation du nombre des peroxysomes dans ces cellules. Le traitement des cellules par l'α-cyclodextrine ne montre pas de différence avec le contrôle.

Afin de confirmer les résultats des observations de microscopie à fluorescence une analyse par cytométrie en flux a été réalisée. L'IMF est de l'ordre de 10 dans les contrôles (ainsi que dans le véhicules) alors qu'elle est d'environ 50 dans les cellules traitées. Aucune différence de l'expression n'est observée entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine.

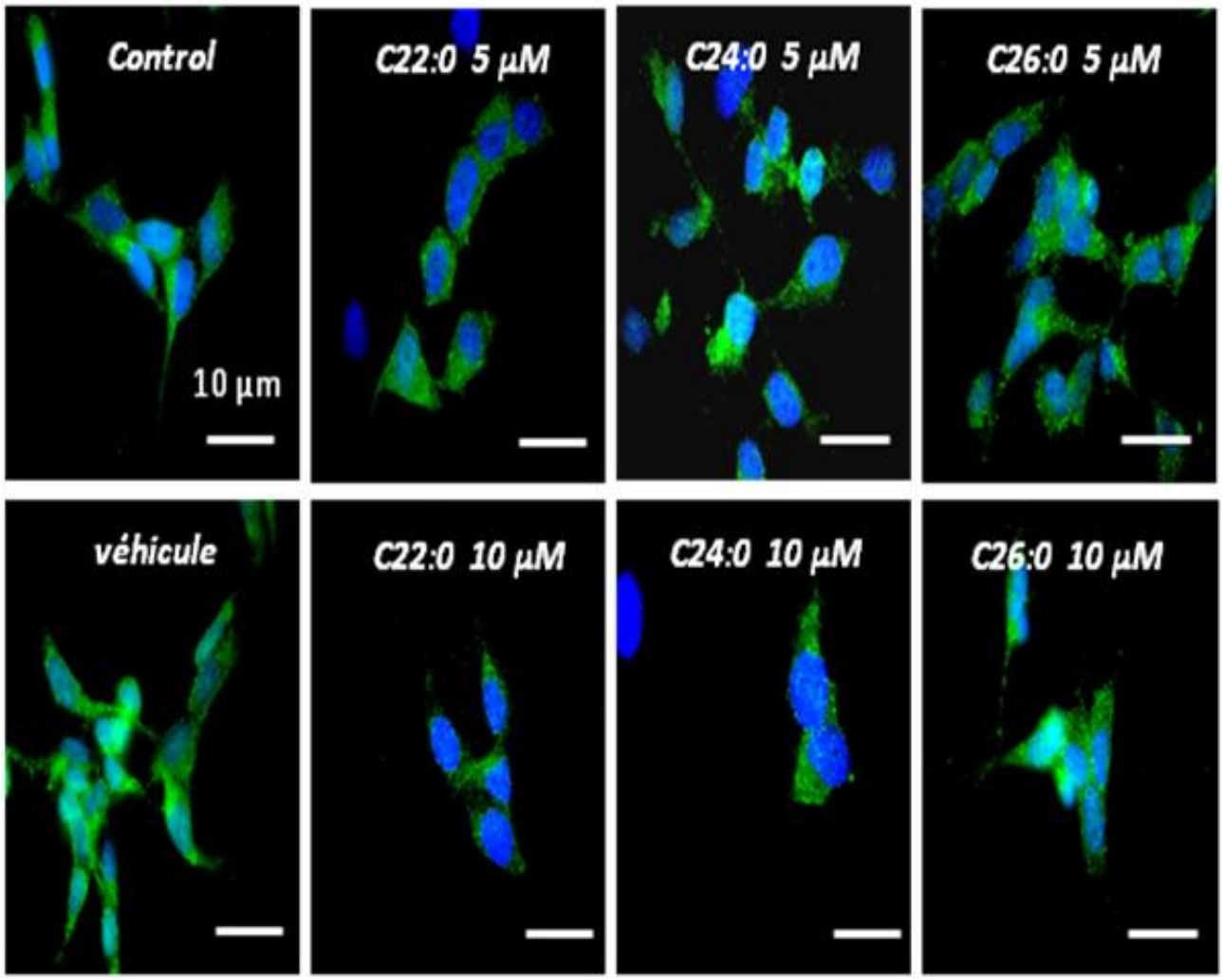


Figure 36 : ***Analyse par microscopie à fluorescence de l'expression et de la topographie de la protéine ABCD3 sur les cellules SK-N-BE.*** *Les cellules SK-NB-E ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule :1 mg/mL) ou d'un AG (C22:0, C24:0 ou C26:0 : 5-10 µM). Une observation des cellules au microscope à fluorescence a été réalisée après immunomarquage en utilisant un anticorps polyclonal anti-ABCD3. Une contre coloration des noyaux au Hoechst 33342 (1 µg/mL) a été réalisée.*

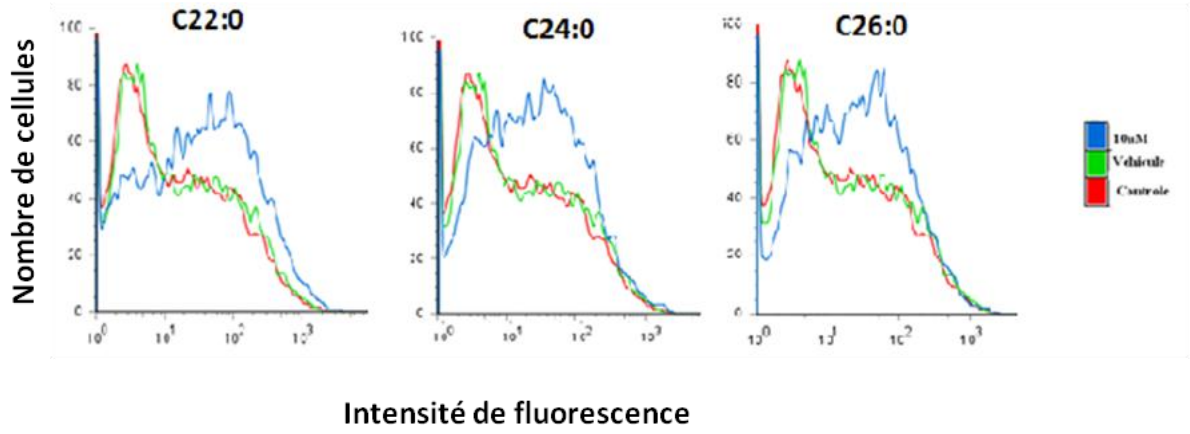


Figure 37: *Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la protéine peroxysomale ABCD3 dans les cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0.* *Les cellules SK-N-BE ont été traitées par 10 µM d'AGTLCs pendant 48 h ; une analyse par cytométrie en flux a été réalisée suite à l'immunomarquage utilisant un anticorps polyclonal anti-ABCD3.*

4.2 Incidence sur l'expression d'ACOX-1

La protéine ACOX-1 est la première enzyme de la voie de la β-oxydation des AGTLCs dans le peroxysome. La topographie et l'expression de cette enzyme ont été respectivement étudiées par microscopie à fluorescence conventionnelle et par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont présentés dans les **Figures 38** et **39.**

L'immunomarquage indirect de cette protéine a été effectué sur des cellules SK-N-BE cultivées sur des lamelles en verre et traitées par les AGTLCs (C22:0, C24:0 ou C26:0) utilisés à 5, 10 et 20 µM et ceci en utilisant un anticorps primaire dirigé contre la protéine ACOX-1 et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488.

L'observation des cellules SK-N-BE par microcopie à fluorescence révèle une répartition homogène de la fluorescence au sein des cellules contrôles et des cellules traitées avec l'α-cyclodextrine (véhicule) et avec les AGTLCs. Aucune modification marquée du niveau d'expression d'ACOX-1 n'est observée entre les cellules contrôles et les cellules traitées par les AGTLCs. L'immunomarquage de cette protéine et l'analyse par cytométrie en flux ont été réalisés pour évaluer les éventuels changements du niveau d'expression. Cette analyse montre qu'en présence des AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0) utilisés à 10 µM, aucune différence de l'expression d'ACOX-1 n'est révélée entre les cellules contrôles et traitées par α-cyclodextrine : les IMF sont identiques. Aucune différence de l'expression n'est donc observée aussi bien entre les cellules contrôles, les cellules traitées avec l'α-

cyclodextrine que dans les cellules traitées par les AGTLCs. Ces résultats sont en accord avec les observations faites par microscopie à fluorescence.

4.3 Incidence sur l'expression de la catalase

La catalase est la principale enzyme qui assure le rôle de détoxification au niveau du peroxysome. Elle est responsable de la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire. La catalase est une enzyme spécifique du peroxysome. La topographie et l'expression de cette enzyme ont été respectivement étudiées par microscopie confocale et par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont présentés dans les **Figures 40** et **41.**

Un immunomarquage a été réalisé sur des cellules SK-N-BE traitées par les AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0) utilisés à 10 µM. Après 48 h de traitement, les cellules ont été mises en suspension, incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre la catalase puis avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les cellules ont été déposées sur lame en verre par cytospine et observées en microscopie confocale. L'observation des lames révèle une absence de modification de la répartition de la fluorescence et donc des peroxysomes entre cellules contrôles et traitées par l'α-cyclodextrine. En revanche, cette répartition est modifiée dans les cellules traitées par les AGTLCs. Un aspect ponctué et une répartition homogène est remarquée dans les cellules contrôles tandis ce que dans les cellules traitées des amas de peroxysomes sont observées à la périphérie des cellules traitées en particulier avec le C22:0.

Pour évaluer l'incidence du traitement aux AGTLCs sur l'expression de la catalase, une analyse par cytométrie en flux a été réalisée avec les AGTLCs utilisés à 5, 10 et 20 µM. Cette analyse ne montre aucune différence de l'expression entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine. Une augmentation significative de l'expression de la catalase (25 à 30%) est observée en présence du C22:0 à 10 et 20 µM comparativement à l'expression dans les cellules traitées par l'α-cyclodextrine. En revanche, comparativement au véhicule, un traitement avec le C24:0 et le C26:0 induit dès 5 µM une diminution significative de l'expression de la catalase de 20 à 60%. En revanche, l'analyse des ARNm par RT-qPCR n'a pas révélé de différences des valeurs de Ct entre les cellules cultivées en absence (contrôle : Ct =24,5; α-cyclodextrine : Ct =24 ,6) ou en présence d'AGTLCs (C22:0 : Ct= 24,3; C24:0 : Ct= 24,2; C26:0 : Ct= 24,5). La modulation de l'expression de la catalase par les AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0) se ferait donc au niveau traductionnel.

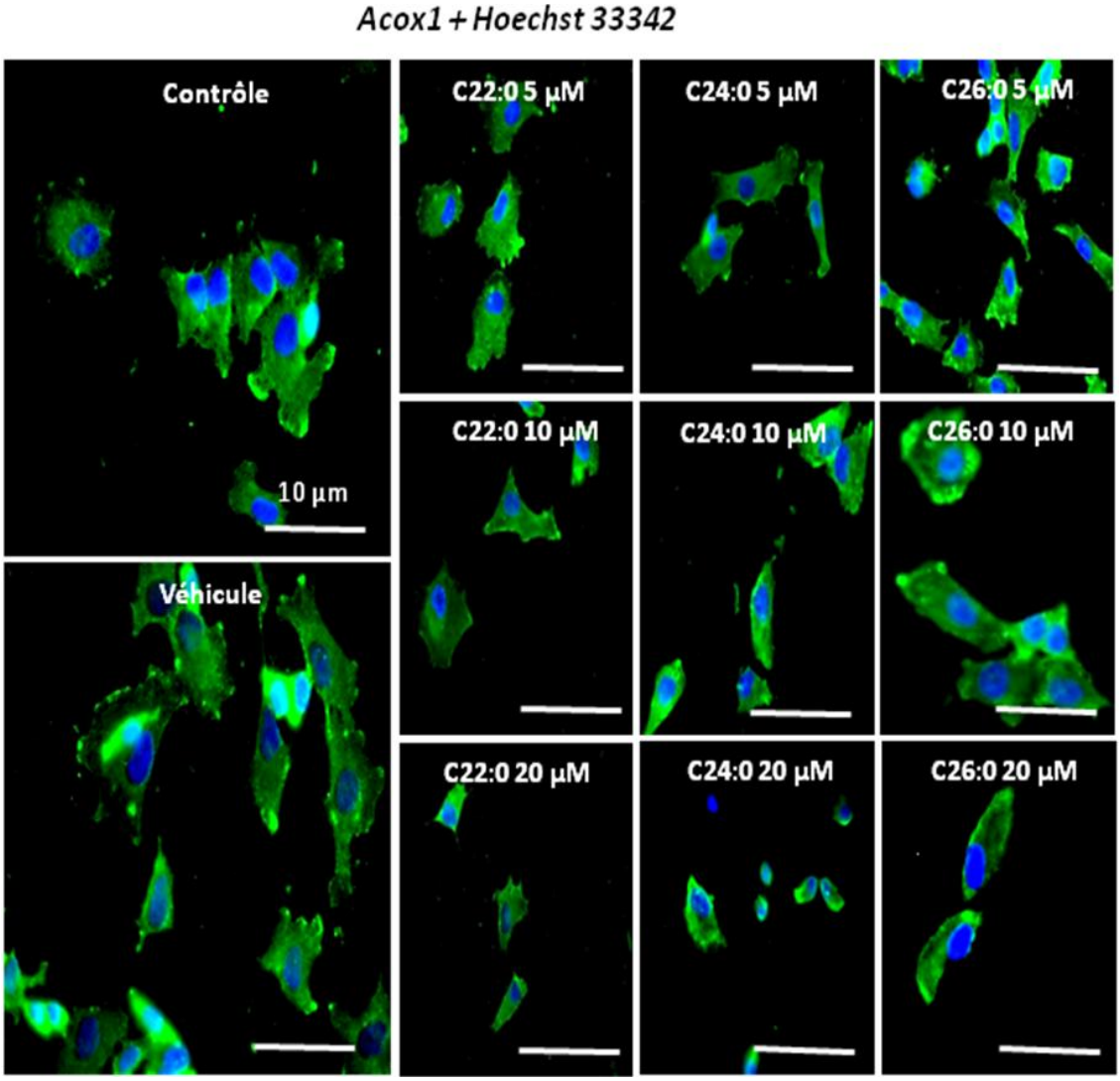


Figure 38 : ***Analyse par microscopie à fluorescence de l'expression et de la topographie de la protéine ACOX-1 dans les cellules SK-N-BE.*** *Les cellules SK-NB-E ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule :1 mg/mL) ou d'un AG (C22:0, C24:0 ou C26:0 : 5, 10 et 20 µM). Une observation des cellules au microscope à fluorescence a été réalisée après immunomarquage en utilisant un anticorps spécifique d'ACOX-1. Une contre coloration des noyaux au Hoechst 33342 (1 µg/mL) a été réalisée.*

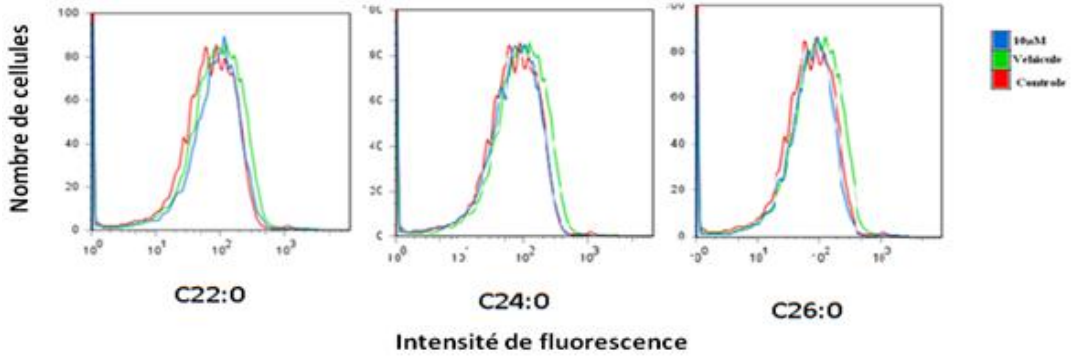


Figure 39 : *Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la protéine peroxysomale ACOX-1 dans les cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0.* *Les cellules SK-N-BE ont été traitées par 10 µM d'AG pendant 48 h. Une analyse par cytométrie en flux a été réalisée suite à l'immunomarquage utilisant un anticorps spécifique d'ACOX-1.*

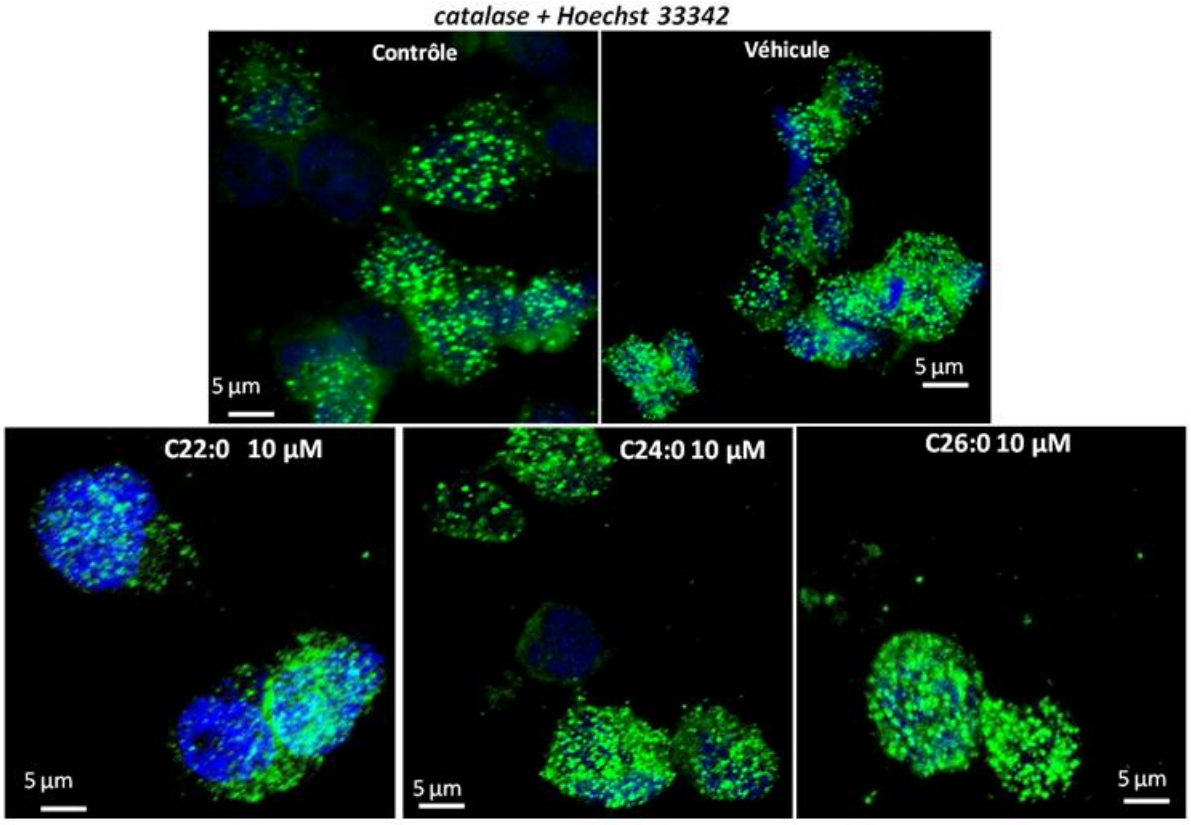


Figure 40: ***Analyse par microscopie confocale à fluorescence de l'expression et de la topographie de la catalase dans les cellules SK-N-BE.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule :1 mg/mL) ou d'un AG (C22:0, C24:0 ou C26:0 : 10 µM). Une observation des cellules en microscopie confocale a été réalisée après immunomarquage en utilisant un anticorps spécifique de la catalase et après contre coloration des noyaux au Hoechst 33342 (1 µg/mL) ; 19 à 33 sections ont été prises en compte. Les images présentées résultent de la superposition de ces sections.*

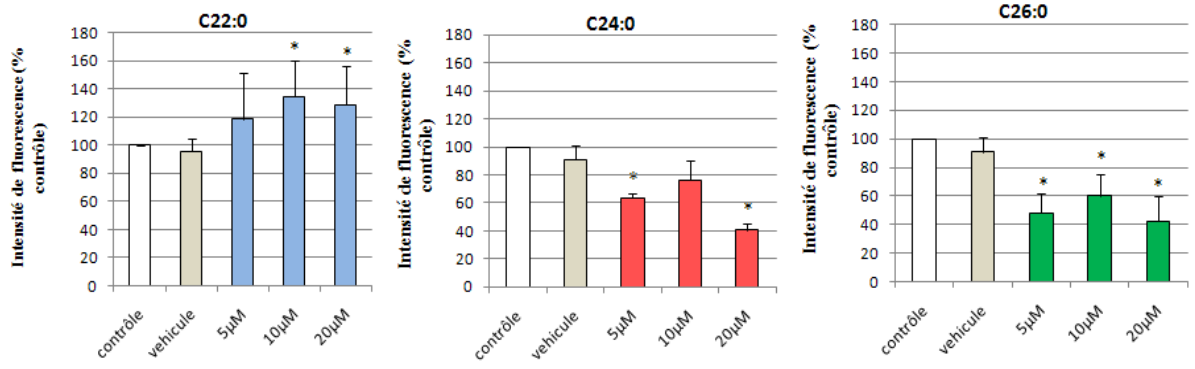


Figure 41: *Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la catalase sur les cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0.* *Les cellules SK-N-BE ont été traitées par 10 µM d'AG pendant 48 h. Une analyse par cytométrie en flux a été réalisée à la suite de l'immunomarquage en utilisant un anticorps spécifique de la catalase.*

4.4 Evaluation sur l'activité catalase

Les modifications du niveau d'expression de la catalase révélées par cytométrie en flux dans les cellules SK-N-BE traitées avec les AGTLCs nous ont incités à évaluer l'impact de ces traitements sur l'activité de cette enzyme. Ainsi, un dosage colorimétrique du produit de l'oxydation du H_2O_2, non éliminé par la catalase (la résorufine) a été réalisé sur les extraits protéique des cellules SK-N-BE incubées en absence ou en présence d'α-cyclodextrine ou d'un AGTLCs (C22:0, C24:0 ou C26:0) utilisés à 5, 10 et 20 µM pendant 48 h. l'activité de la catalase a été exprimée en mU /ml /mg de protéine et les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 42** .

Tandis ce que l'activité catalase dans les cellules traitées par l'α-cyclodextrine est semblable à celle des cellules contrôles, une légère augmentation de cette activité est observée dans les cellules traitées par les différentes concentrations d'AGTLCs. Cette augmentation, bien que faible, est significative avec le C22:0 (10 µM) et avec le C24:0 (20 µM).

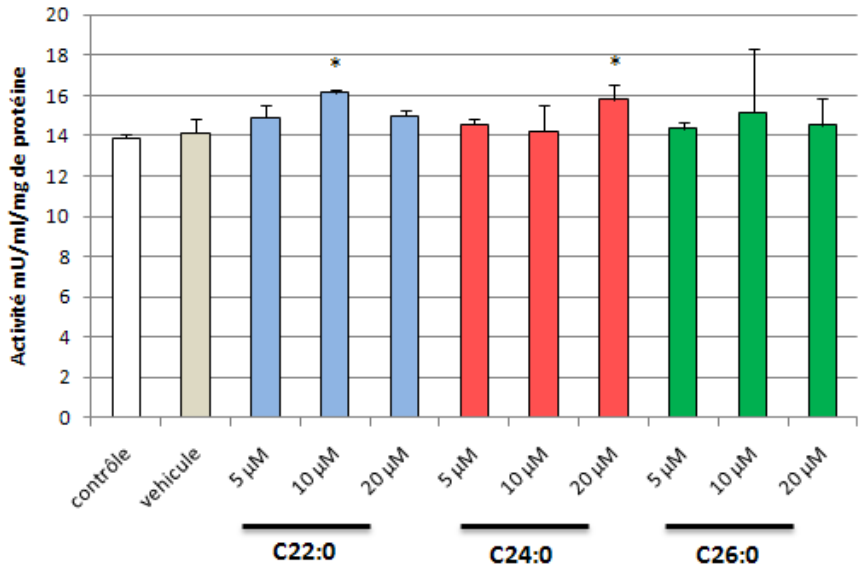


Figure 42 : ***Analyse de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'activité catalase.*** *Les cellules SK-N-BE ont été traitées par les AGTLCs (C22:0, C24:0, C26:0) à 5, 10 et 20 µM pendant 48 h. Une mesure de l'activité catalase a été effectuée par méthode colorimétrique et exprimée en mU /mL /mg de protéine. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données a été réalisée par le test Mann Whitney * p<0,05.*

4.5 Évaluation des effets de C22 :0 et des AGTLCs (C24 :0, C26 :0) sur le métabolisme lipidique peroxysomale

4.5.1 Effet sur la synthèse de plasmalogènes

Les plasmalogènes sont des phospholipides caractérisées par la présence d'une liaison (vinyle éther) d'un AGS ou un AGMI à la position sn-1 et d'une liaison ester d'un AGPI à la position sn-2. La génération de la liaison vinyle éther se fait uniquement dans le peroxysome. Ainsi leur synthèse nécessite un peroxysome intact.

Un dosage des plasmalogènes par CPG/SM a été effectué sur des cellules SK-N-BE traitées avec les AGTLCs à 10 µM pendant 48 h. Les résultats exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport au contrôle sont présentés dans la **Figure 43.** De légères modifications non significatives du taux des plasmalogènes totaux sont remarquées (**Figure 43**) avec les AGTLCs. Une diminution de 5 et 13 % des plasmalogènes totaux est observée en présence de C22:0 et C26:0 alors qu'une augmentation est remarquée avec le C24:0.

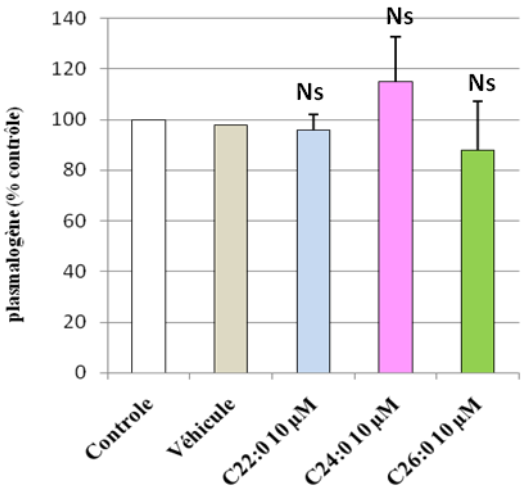


Figure 43: ***Evaluation de l'effet de C22 :0, C24 :0 et C26 :0 sur la composition des cellules en plasmalogènes.*** *Les cellules SK-N-BE ont été traitées en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/mL) ou d'un AG (C22:0, C24:0 ou C26:0) à 10 µM. Après 48 h de traitement, les cellules ont été mises en suspension et un dosage des plasmalogènes a été réalisé par CPG/SM. Les quantités de plasmalogènes totaux obtenues pour chaque traitement ont été rapportées à celles des cellules contrôles. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney. Ns :non signifiatif*

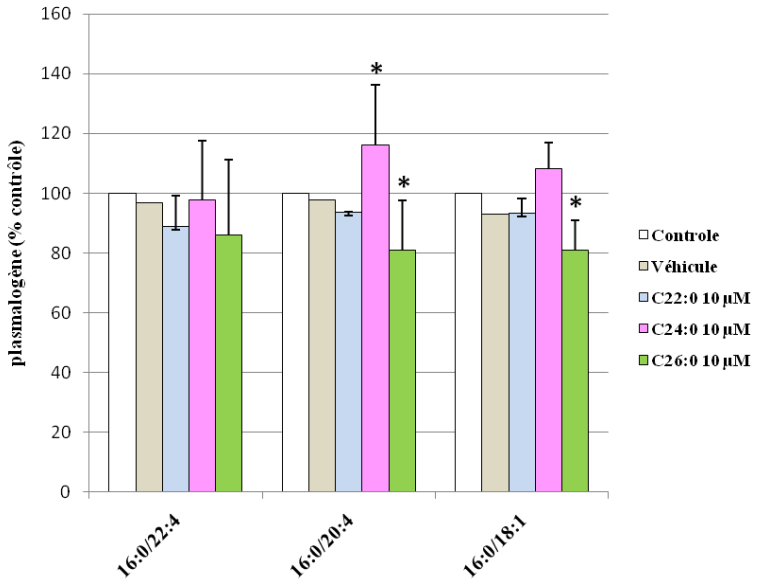
Des différences des taux de plasmalogènes individuels sont observées entre les cellules traitées avec les AGTLCs et celles traitées par l'α-cyclodextrine (**Figure 44 A-B**).

Avec C22:0 à 10 µM, une diminution non significatives est remarquée pour les différents plasmalogènes à C16:0 et à C18:0 sauf pour les plasmalogènes 18:1/22:4, 18:1/20:4, 18:1/18:1.

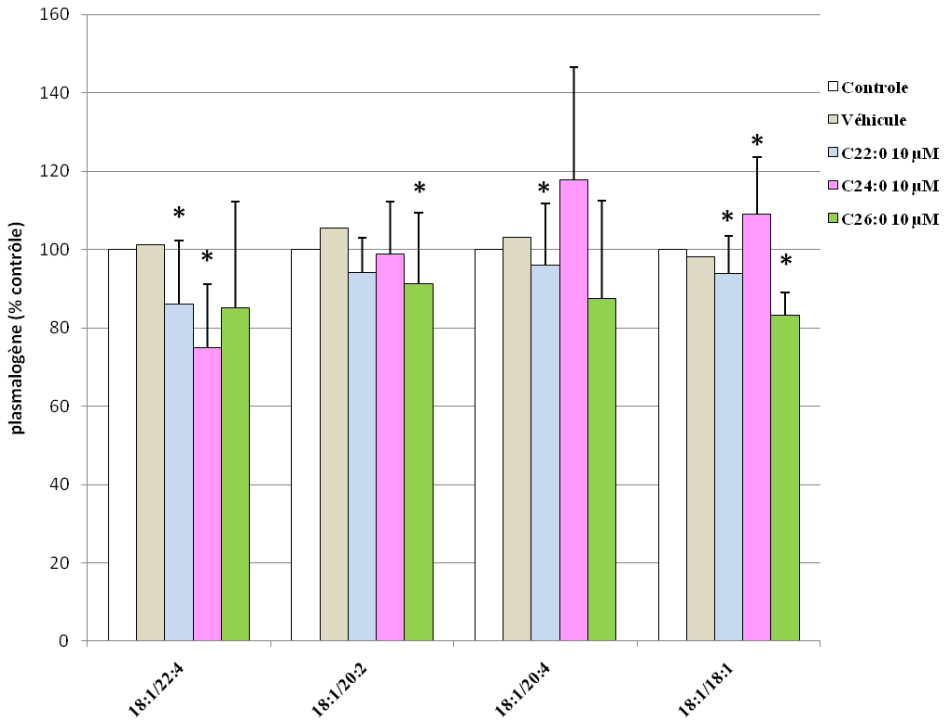
Avec C24:0 à 10 µM, une augmentation de plasmalogènes est observée. Cette augmentation est significative pour les plasmalogènes à C18:0 ainsi que pour les plasmalogènes 16:0/20:4, 16:0/18:1 et 18:1/18:1. Cette augmentation est associée à une diminution significative des plasmalogènes 18:1/22:4.

Avec C26:0 à 10 µM, une diminution du taux de plasmalogènes est observée. Cette diminution est significative pour les plasmalogènes à C16:0 ainsi que pour les plasmalogènes, 18:1/20:2, 18:1/18:1 et 18:0/18:1. De même, une diminution des plasmalogènes 18:0/22:6, 18:0/22:5, 18:0/20:3 et 18:0/20:4 est révélée bien que non significative.

A)


plasmalogène (% contrôle)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
16:0/22:4
16:0/20:4
16:0/18:1
Controle
Véhicule
C22:0 10 µM
C24:0 10 µM
C26:0 10 µM

B)


plasmalogène (% contrôle)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
18:1/22:4
18:1/20:2
18:1/20:4
18:1/18:1
Controle
Véhicule
C22:0 10 µM
C24:0 10 µM
C26:0 10 µM

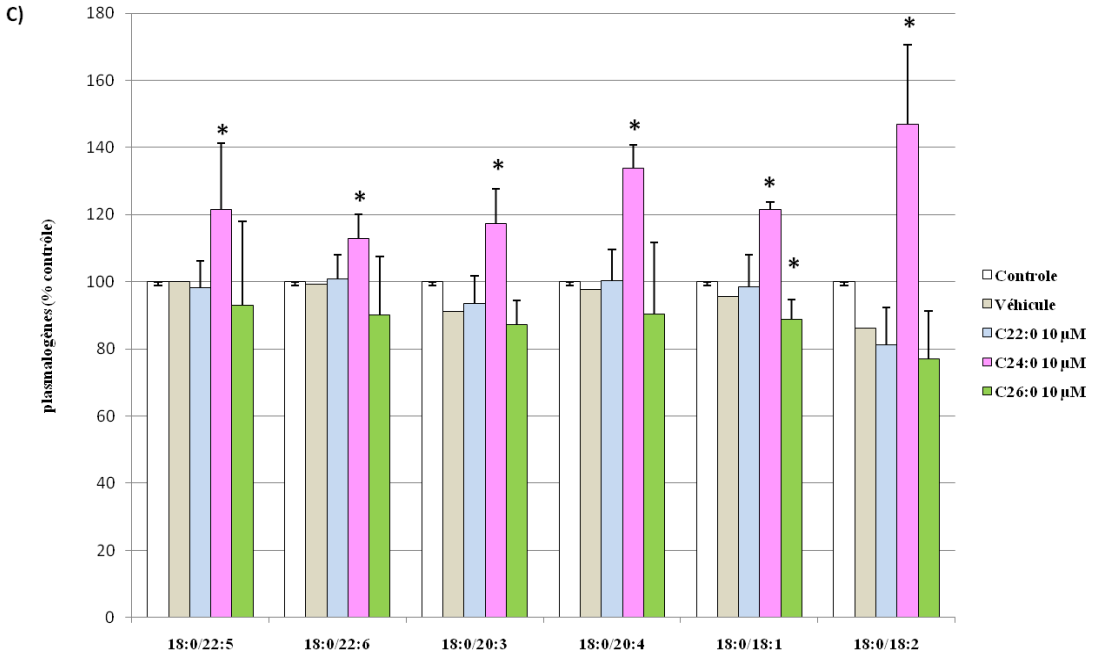
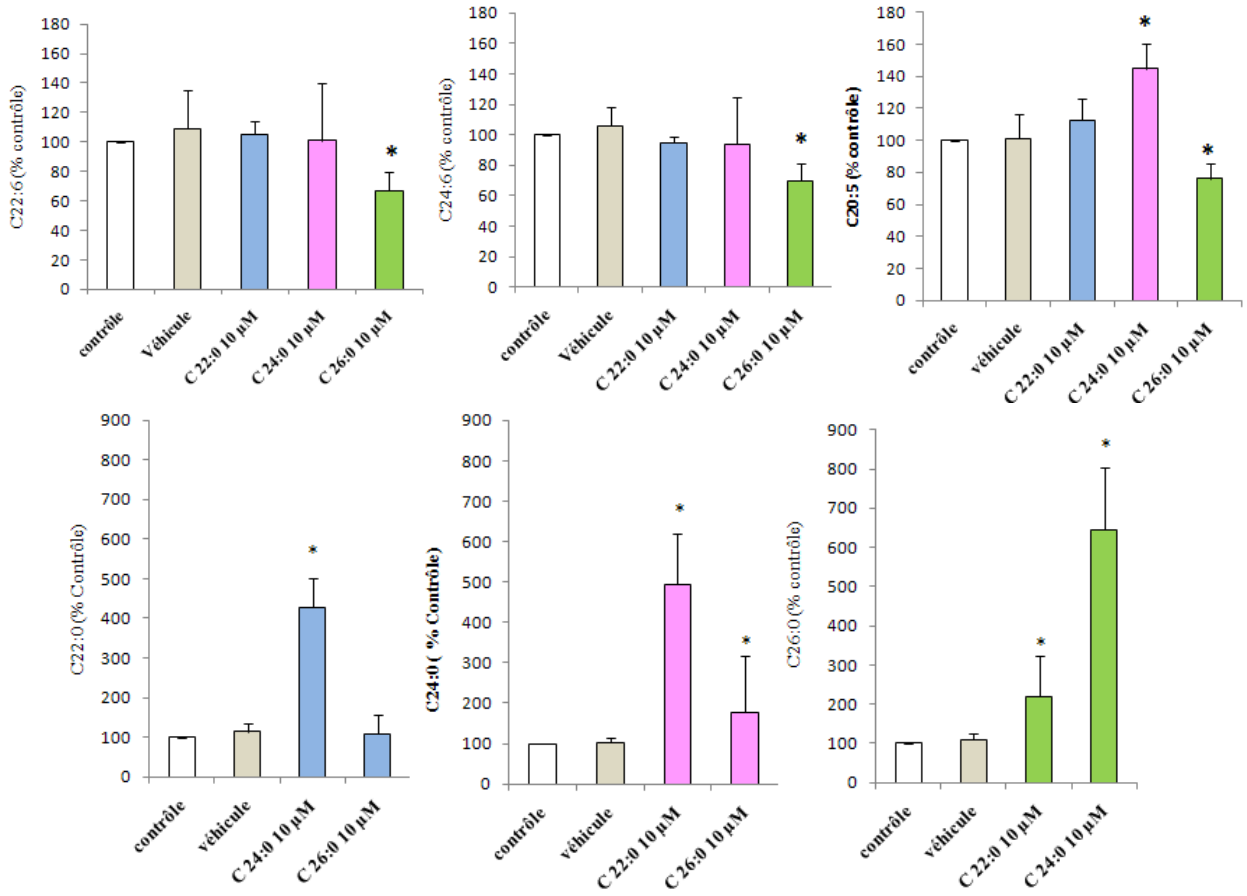


Figure 44: ***Evaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la composition des cellules en plasmalogènes.*** *Les cellules SK-N-BE ont été traitées en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/mL) ou d'un AG (C22:0, C24:0 ou C26:0) à 10 µM. Après 48 h de traitement, les cellules ont été mises en suspension et un dosage des plasmalogènes a été réalisé par CPG/SM. Les quantités obtenues pour chaque traitement ont été rapportées à celles des cellules contrôles.* ***A)*** *plasmalogènes à C16:0,* ***B)*** *plasmalogènes à C18:1,* ***C)*** *plasmalogènes à C18:0. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney * p<0,05.*

4.5.2. Effet sur le profil d'acide gras, la synthèse du DHA et de ses précurseurs

Le peroxysome joue un rôle primordial dans la β-oxydation des AGTLCs ainsi que dans la synthèse du DHA. En effet, la dernière étape de synthèse du DHA s'effectue dans le peroxysome suite à un cycle de β-oxydation de son précurseur le C24:6 n-3. Un dosage des acides gras (C22:6 n-3 (DHA) ; (C24:6 n-3) et C20:5 (EPA) précurseurs du DHA) ainsi que de C22:0, C24:0 et C26:0 par CPG/SM a été effectué sur des cellules SK-N-BE traitées avec C22:0, C24:0 et C26:0 à 10 µM pendant 48 h. Les résultats exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport au contrôle sont présentés dans la **Figure 45.**

La quantification par CPG/SM du DHA et de son précurseur dans les SK-N-BE traitées avec les AGTLCs (C22:0, C24:0 ou C26:0) à 10 µM pendant 48 h, ne montre pas de variations notables des quantités sauf après traitement avec le C26:0 où une diminution significative est révélée. De même, le traitement avec le C26:0 induit une diminution significative de la quantité de C20:5. La mesure du taux de C22:0, C24:0 et C26:0 montre une augmentation du C22:0 après traitement des cellules avec le C24:0 à 10 µM, du C24:0 après traitement avec le C22:0 et le C26:0 ainsi qu'une augmentation du C26:0 après traitement avec le C22:0 et le C26:0.



<u>Figure 45</u>: ***Evaluation du profil en acides gras (C22:6, C24:6, C20:5) et (C22:0, C24:0 et C26:0) dans les cellules SK-N-BE.*** *Les cellules SK-N-BE ont été traitées en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/ mL) ou de C22:0, C24:0 ou C26:0 à 10 µM. Après 48 h de traitement, les cellules ont été mises en suspension et un dosage des acides gras a été réalisé par CPG/SM. Les quantités obtenues pour chaque traitement ont été rapportées à celle des cellules contrôles. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney * p<0,05.*

5. Evaluation des effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur l'organisation du cytosquelette

Le cytosquelette est l'ensemble des réseaux de filaments protéiques qui confèrent à la cellule sa forme et assurent le transport des organites, des nutriments et de messagers nerveux; le cytosquelette est formé des filaments d'actine, des filaments intermédiaires et des microtubules qui s'étendent dans tout le cytoplasme. Une évaluation de l'impact des AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0) sur l'organisation de ce réseau de filament a été réalisée afin de comprendre leur éventuel rôle dans l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires au cours de la MA.

5.1. Effets sur l'organisation des filaments d'actine

L'organisation et la polymérisation des filaments d'actine ont été évaluées dans les cellules SK-N-BE par coloration à la Phalloïdine, couplée à la Rhodamine. Cette sonde est capable de se lier à l'actine et d'émettre de la fluorescence rouge lorsqu'elle est excitée dans le vert. Les cellules SK-N-BE mises en culture sur des lames en verre ont subit un traitement avec les AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0) à 5 et 10 µM pendant 48 h. Une coloration à la Rhodamine-phalloïdine a été réalisée. Les images obtenues par observations au microscope à fluorescence sont présentées dans la **Figure 46.**

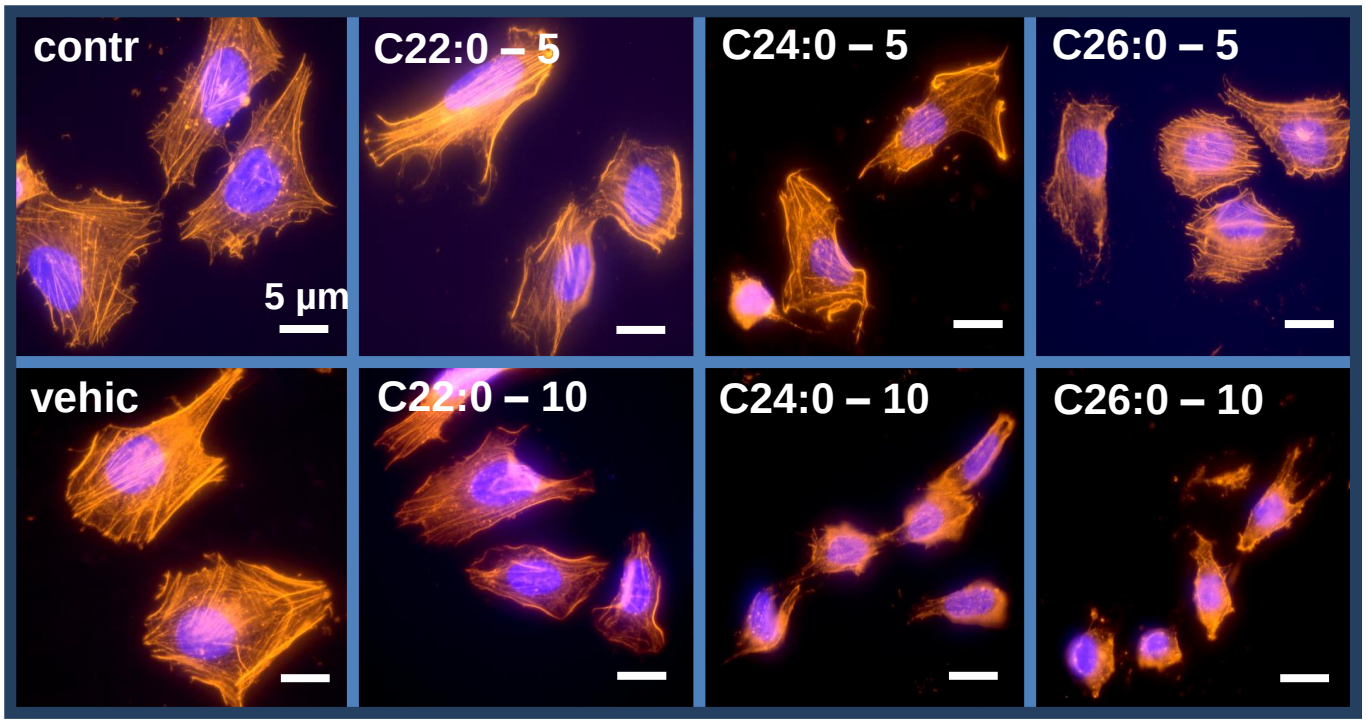


Figure 46: ***Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'organisation des filaments d'actine.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule :1 mg/mL) ou d'un AG (5 et 10 µM). Les filaments d'actine ont été identifiées par coloration avec la Rhodamine –Phalloïdine.*

L'observation des cellules SK-N-BE au microscope à fluorescence montre une perturbation du réseau de filaments d'actine dans les cellules traitées avec 10 µM d'AGTLCs particulièrement avec C24:0 et C26:0. En effet, les cellules contrôles et traitées avec l'α-cyclodextrine ont une forme étalées alors que les cellules traitées perdent leur morphologie, développent une forme ronde avec un cytoplasme plus rétrécit et des filaments d'actines plus compacts.

Afin de déterminer l'effet des AGTLCs sur la quantité d'actine-F par cellule. Les cellules SK-N-BE traitées avec les AGTLCs à 5, 10 et 20 µM pendant 48 h, ont été mises en suspension puis colorées avec la Rhodamine-Phalloïdine révélant l'actine F. L'analyse de la fluorescence émise par les cellules a été faite par cytométrie en flux et les résultats sont présentés dans la **Figure 47.**

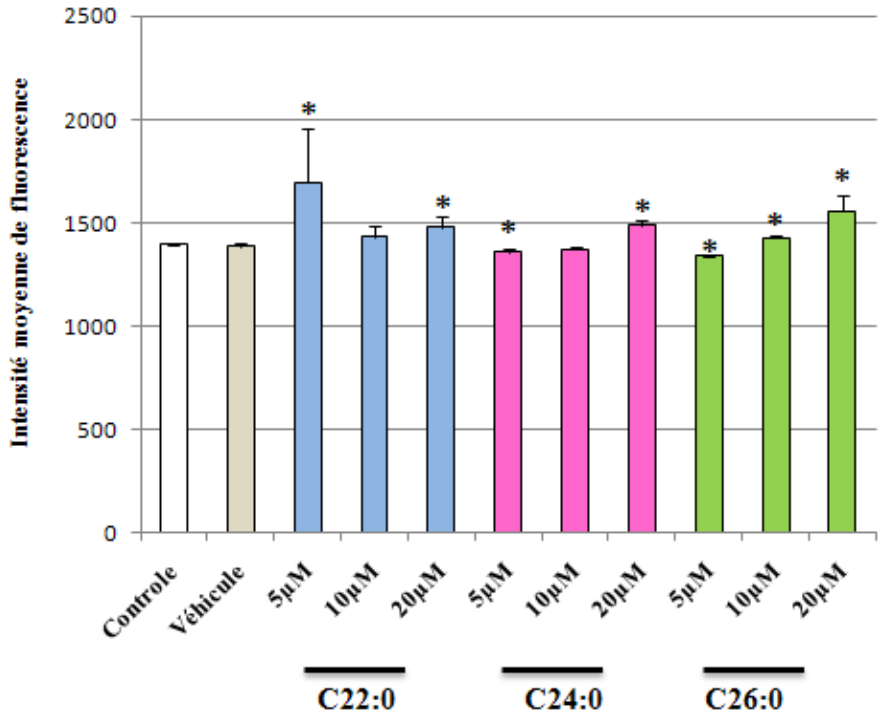


Figure 47 : *Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la quantité d'actine F par cellule.* *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule :1 mg/mL) ou d'un AG (5, 10 et 20 µM). La quantité d'actine F par cellule a été mesurée par coloration avec la Rhodamine –Phalloïdine et analyse par cytométrie en flux. L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney * p<0,05.*

L'analyse par cytométrie en flux montre une légère variation de l'intensité moyenne de fluorescence entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec les AGTLCs. Une augmentation significative de l'intensité de la fluorescence est remarquée avec le C22:0, le C24:0 et le C26:0 à 5 et 20 µM ainsi qu'avec le C26:0 à 10 µM. Aucune modification de l'intensité de la fluorescence n'est révélée entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine utilisée à 1 mg/mL.

5.2. Éffets sur l'organisation des microtubules

L'organisation et la polymérisation des microtubules a été évaluées dans les cellules SK-N-BE par immunomarquage indirecte en utilisant un anticorps spécifique des deux isomères de la tubuline α et β ou par coloration avec le Tubulin Tracker. Les cellules SK-N-BE mises en culture sur des lames en verre ont subi un traitement avec les AGTLCs à 5 et 10 µM pendant 48 h. Les microtubules révélés par immunofluorescence ont été étudiées par

microscopie et cytométrie en flux. Les images obtenues par observations au microscope à fluorescence sont présentées dans la **Figure 48.**

L'observation cellules SK-N-BE au microscope à fluorescence montre une perturbation du réseau de microtubules dans les cellules traitées avec les AGTLCs en particulier à 20 µM de traitement. En effet, les cellules traitées perdent progressivement leur forme initiale pour devenir ronde avec des microtubules plus ou moins absents et ou compactés.

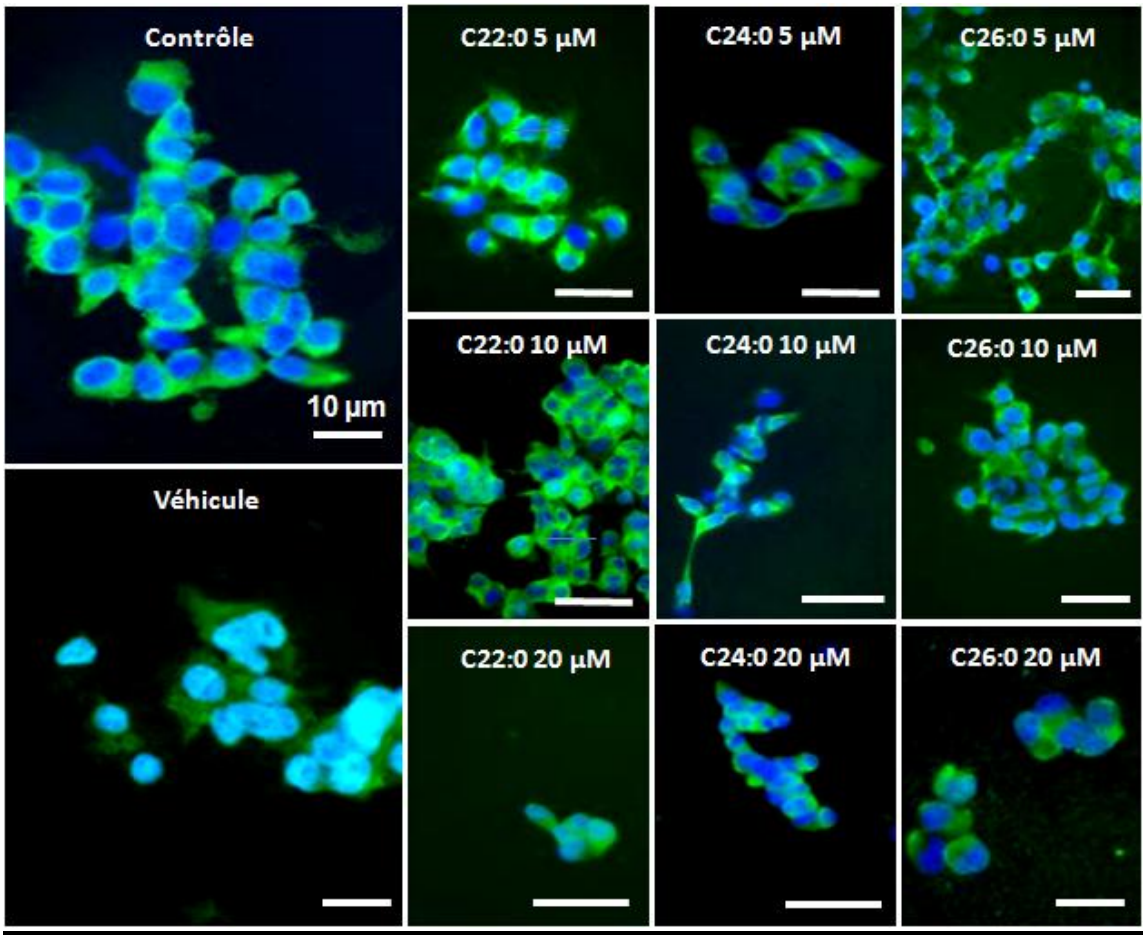


Figure 48: ***Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'organisation des microtubules.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule :1 mg/mL) ou d'un AG (5, 10 et 20 µM). La tubuline a été identifiées par immunofluorescence indirecte. Une contre coloration des noyaux au Hoechst 33342 a été réalisée.*

Pour évaluer l'incidence du traitement aux AGTLCs (C22:0, C24:0 ou C26:0) sur la quantité de microtubules, les cellules SK-N-BE, traitées avec les AGTLCs à 5, 10 et 20 µM pendant 48 h, ont été mises en suspension par trypsination puis un immunomarquage a été

réalisé. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre la tubuline (α et β) et avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. L'analyse de la fluorescence émise par les cellules par cytométrie en flux a permis de quantifier les microtubules. Les résultats sont présentés dans la **Figure 49**.

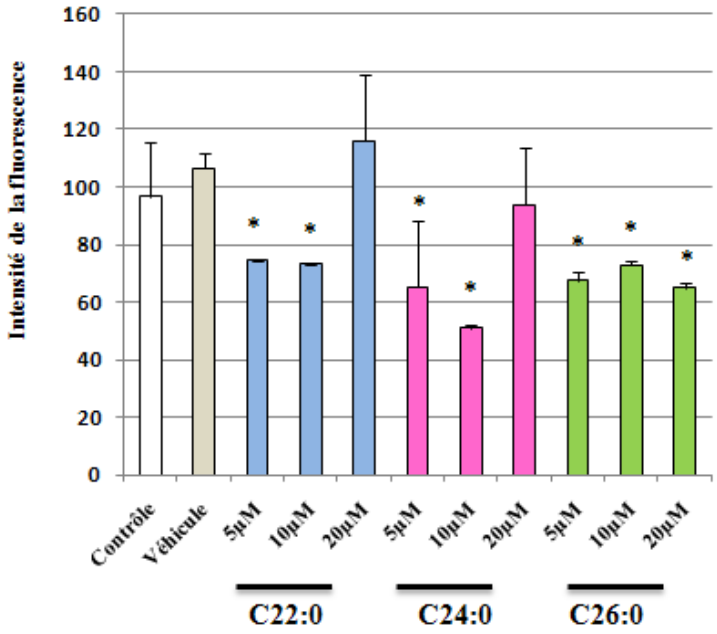


Figure 49 : ***Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la quantité de microtubules par cellule.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1mg/mL) ou d'un AGTLC (5, 10 et 20 µM). La quantité de microtubules par cellule a été mesurée par immunomarquage indirect en utilisant un anticorps primaire spécifique de la tubuline (α et β) et par analyse au cytomètre en flux. L'analyse des données a été réalisée par le test Mann Whitney * $p<0,05$*

L'analyse par cytométrie en flux ne montre pas de différence significative de l'intensité de fluorescence d'α et β tubuline (qui traduit leur expression) entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec l'α-cyclodextrine (véhicule). Une diminution significative de l'intensité moyenne de fluorescence est toujours observée en présence des trois AGTLCs à 5 µM comparativement à l'intensité dans les cellules traitées par l'α-cyclodextrine. L'intensité de 107 dans le véhicule est respectivement de 74, 65 et 67 en présence de C22:0, C24:0 et C26:0 à 5 µM. A 10 µM, une diminution de l'intensité de fluorescence est aussi détectée en présence des différents AGTLCs. Comparativement au véhicule, un traitement avec le C22:0 à 20 µM induit une légère augmentation de l'intensité de fluorescence qui passe de 107 à 116. Avec le C26:0 à 20 µM l'intensité de fluorescence

diminue par rapport au véhicule. En revanche, l'intensité de fluorescence est peu affectée en présence de C24:0 à 20 µM.

5.3 Effet sur les neurofilaments

Les neurofilaments sont les filaments intermédiaires spécifiques des neurones. Ils forment avec les microtubules et l'actine le cytosquelette.

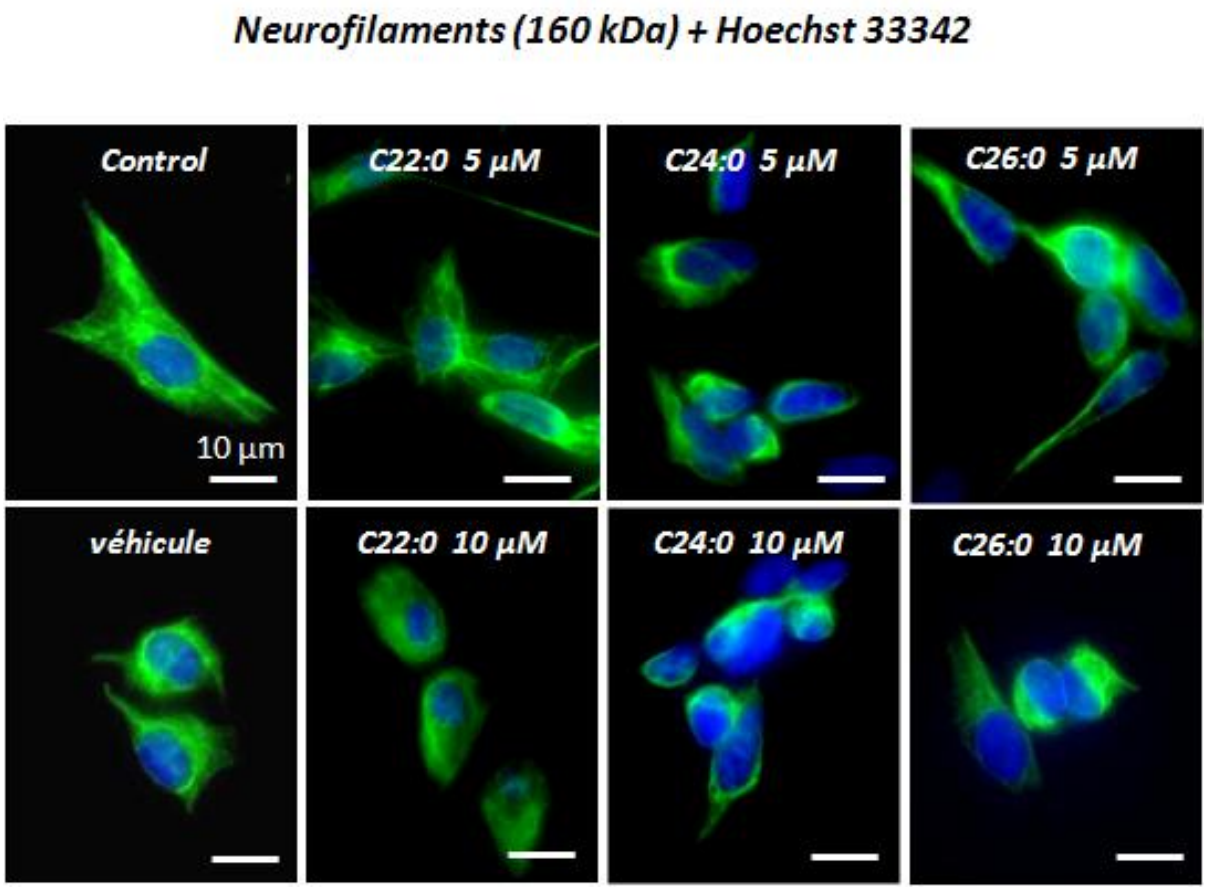
L'évaluation de l'impact des AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) sur le cytosquelette implique l'étude de leur effet sur les neurofilaments. Ainsi, les cellules SK-N-BE mises en culture sur des lames en verre ont subit un traitement avec les AGs à 5 et 10 µM pendant 48 h. Un immunomarquage indirect a été réalisé en incubant les cellules avec l'anticorps primaire dirigé contre les neurofilaments de tailles moyennes (160 KDa) et avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les images observées au microscope à fluorescence sont présentées dans la **Figure 50 .**

L'observation des cellules SK-N-BE au microscope à fluorescence montre une désorganisation du réseau des neurofilaments dans les cellules traitées dès 5 µM d'AGTLCs en particulier avec C24:0 et C26:0. En effet, les cellules contrôles et traitées avec l'α-cyclodextrine ont une forme étalées alors que les cellules traitées ont un aspect rétracté allant de paire avec leur capacité d'adhésion diminuée. Le C22:0 semble avoir moins d'effet sur l'organisation des neurofilaments.

5.4. Analyse de l'expression protéique de l'actine et de l'α-tubuline

Dans le but d'évaluer un éventuel changement de l'expression de la β-actine et de l'α-tubuline, suite au traitement par les AGTLCs, un western blotting a été réalisé sur les extraits protéiques obtenus à partir des cellules SK-N-BE traitées par 5 et 10 µM d'AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0).

Dans la **Figure 51**, les blots obtenus (**A**), la quantification effectuée à l'aide du logiciel Image J (**B**) ainsi que le rapport de l'expression de l'α-tubuline et de l'actine (**C**) sont présentés**.** Les données présentées (**B-C**) ont été déterminées de la façon suivante : (valeur de l'essai) / (valeur du contrôle).



<u>Figure 50</u> : ***Analyse par microscopie à fluorescence de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'organisation des neurofilaments dans les cellules SK-N-BE.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine ou d'un AG (10 µM). Une observation des cellules en microscope à fluorescence a été réalisée après immunomarquage en utilisant un anticorps spécifique des neurofilaments (160 KDa). Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (1 µg/mL).*

Les résultats obtenus par western blotting montrent un niveau d'expression de la β-actine semblable pour le contrôle, le véhicule et les cellules traitées par les AGTLCs. Par contre, une diminution de l'expression de l'α-tubuline est remarquée pour les cellules traitées avec le C22:0 et C24:0 à 5 et 10 µM. Cette diminution est de l'ordre de 0,4 – 0,7 par rapport au véhicule et elle est la plus marquée avec un traitement au C24:0 à 10 µM. Une légère diminution de l'expression de l'α-tubuline est révélée avec le C26:0 à 10 µM. Par ailleurs, le calcul du rapport entre le taux d'expression de l'α-tubuline et de la β-actine montre une diminution de ce rapport avec le traitement aux AGTLCs en particulier avec le C24:0 à 5 et 10 µM. Cette diminution est la moins marquée avec le C26:0.

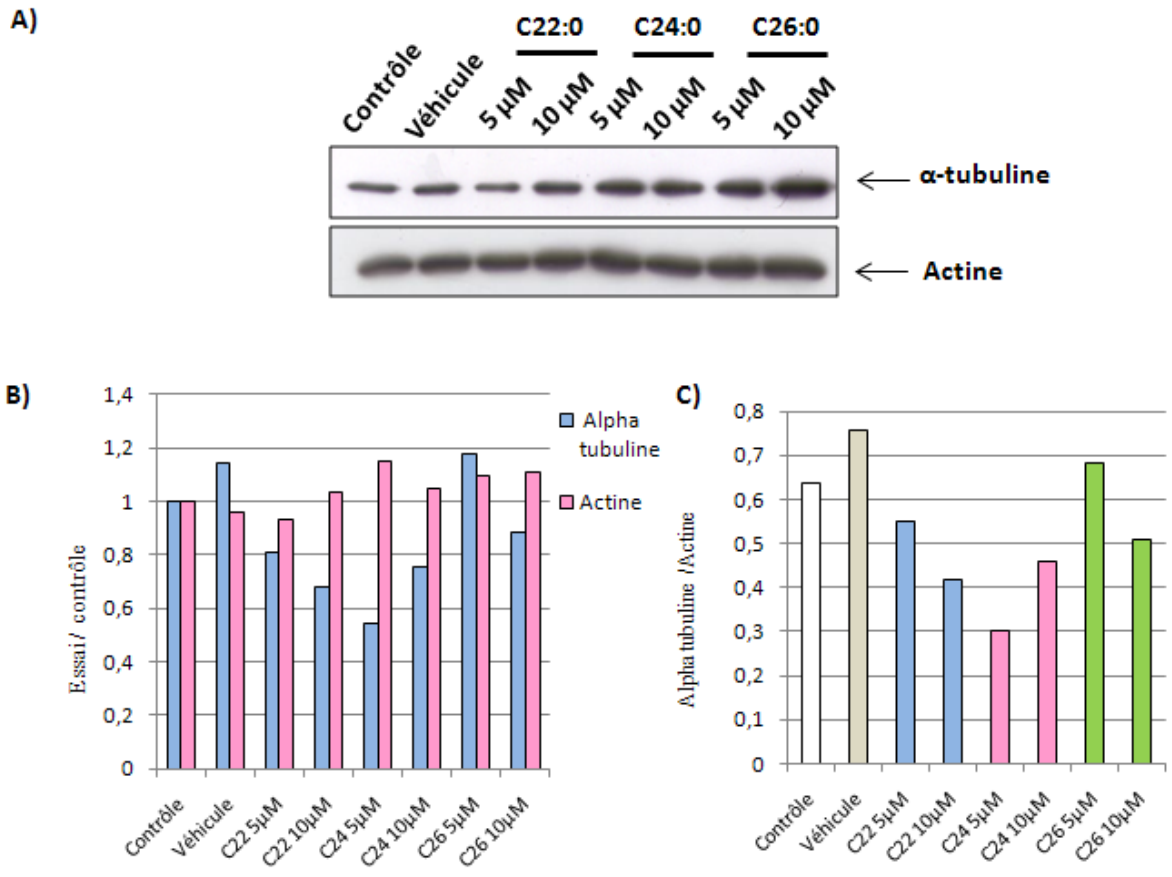


Figure 51: ***Analyse des effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'expression de l'α-tubuline et de la β-actine****. Les cellules SK-N-BE ont été cultivées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine, ou d'un AG utilisé à 5 et 10 µM.* ***A)*** *Les blots ont été obtenus en utilisant les anticorps spécifiques de l'α-tubuline et de la β-actine.* ***B)*** *Quantification par le logiciel image J de l'intensité de l'expression protéique de l'α-tubuline et de la β-actine.* ***C)*** *Le rapport α-tubuline / β-actine.* Les valeurs présentées ont été déterminées de la façon suivante : (valeur de l'essai) / (valeur du contrôle).

6. Caractérisation de la mort cellulaire induite par C22:0 et les AGTLCs (C24:0, C26:0)

6.1 Evaluation de l'intégrité de membrane cytoplasmique par coloration à l'iodure de propidium

L'iodure de propidium (IP) est un colorant qui ne pénètre que dans les cellules ayant des membranes lésées. L'IP permet d'évaluer les effets d'un traitement sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique. Seules les cellules mortes sont colorées par l'IP. La perméabilisation de la membrane cytoplasmique se caractérise par une augmentation de la fluorescence émise par les cellules qui ont accumulé l'IP. Les cellules SK-N-BE cultivées dans des plaques de 12 puits ont été traitées avec des concentrations croissantes d'AGTLCs (C22:0, C24:0 ou C26:0 : 0,1 ; 1 ; 5, 10 ou 20 µM) pendant 48 h. Ensuite, une coloration à l'IP a été réalisée sur les cellules mises en suspension et les cellules ont été analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 52**.

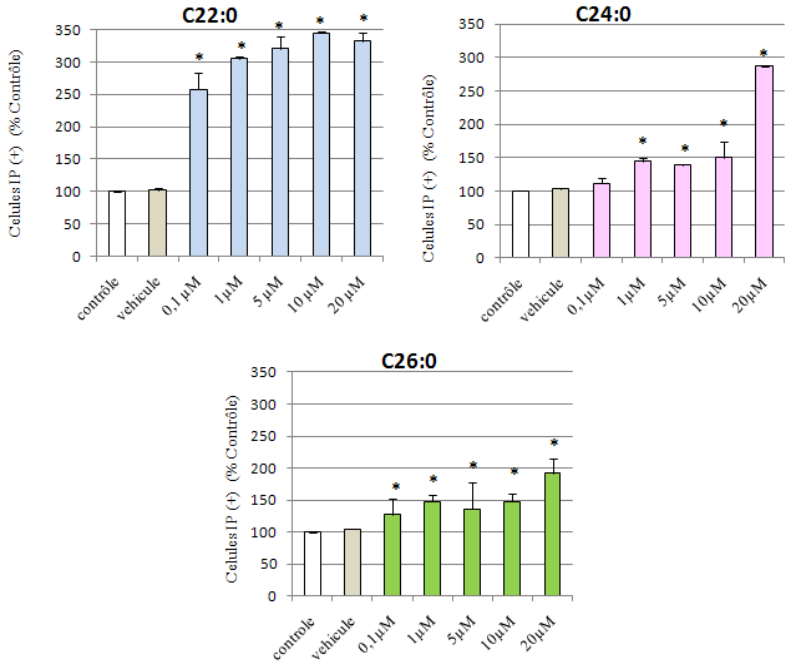


Figure 52 : ***Évaluation de l'effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique.*** *Les cellules SK-N-BE ont été incubées pendant 48 h en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (vehicule : 1 mg/mL) ou d'un AG (0,1 ; 1 ; 5, 10 et 20 µM).une analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur des cellules colorées à l'IP. Véhicule : α-cyclodextrine (1 mg/mL ; correspondant à AG 20 µM). L'analyse des données a été réalisée par le test Mann Whitney * p<0,05.*

L'incubation des cellules SK-N-BE pendant 48 h avec les AGTLCs (0,1-20 µM) a induit une augmentation dose dépendante des cellules IP positives. Cette augmentation est significative dès 0,1 µM de traitement avec C22:0 et C26:0 et dès 1 µM avec C24:0. L'augmentation du pourcentage de cellules IP positives est le plus marquée avec C22:0 : à 0,1 µM, le pourcentage d'augmentation par rapport au contrôle est de 250, il atteint 350 à 10 µM. Avec C24:0, ce pourcentage d'augmentation passe de 150 avec 1 µM, à 270 avec 20 µM. Pour le traitement avec le C26:0, l'effet dose est moins marquée comparativement au C22:0 et au C24:0. En présence d'α-cyclodextrine, le pourcentage de cellules IP positives est semblable à celui du contrôle.

6.2 Effet sur l'activité lactate déshydrogénase

La mort cellulaire peut se produire selon différents mécanismes : apoptotique, nécrotique (ou nécroptotique) ou autophagique. Lors d'un processus nécrotique ou nécroptotique, la membrane cytoplasmique est rompue libérant le contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire y compris la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme cytosolique. Dans le but d'évaluer le type de mort induit par les AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0), une mesure de l'activité de la LDH a été réalisée dans le milieu de culture. Cette mesure a été faite 48 h après le traitement des cellules SK-N-BE avec les AGTLCs à 10 µM. Les résultats présentés dans la **Figure 53** montrent une augmentation significative de l'activité LDH sous l'effet du traitement par les AGTLCs dans les milieux de culture comparativement aux cellules traitées avec l'α-cyclodextrine. Cette activité de 12 µU dans le véhicule passe à 20 µU avec le C22:0 et à 16 µU avec le C24:0 et C26:0. Une légère augmentation est observée dans le milieu de culture des cellules traitées avec l'α-cyclodextrine.

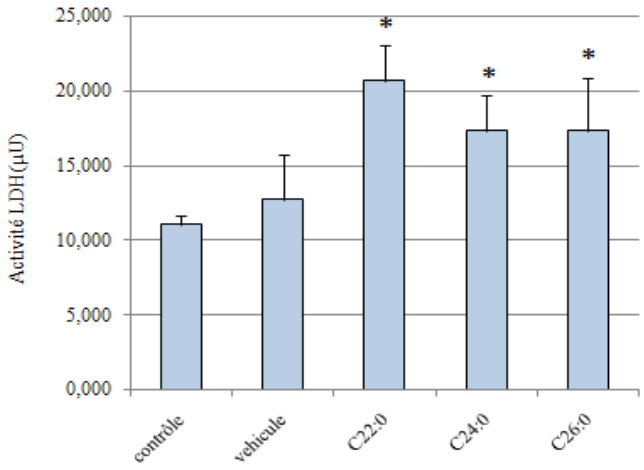


Figure 53 : Effet *des AGTLCs sur l'activité LDH dans le milieu de culture* *Les cellules SK-N-BE ont été traitées ou non par les AGTLCs pendant 48 h (10 µM). Le dosage de l'activité LDH a été effectué dans le milieu de culture. Véhicule : α-cyclodextrine (1 mg/mL). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM.*

6.3 Effet sur la fragmentation nucléaire

Le processus de mort par apoptose se caractérise par la condensation de la chromatine, la rupture de la membrane nucléaire et une fragmentation du noyau (caryorrhexis). Afin de déterminer le type de mort. Les noyaux des SK-N-BE traitées ou non par les AGs ont subi une coloration au Hoechst 33342 et ont été observés au microscope à fluorescence. Les images obtenues sont présentées dans la **Figure 54.** Les images des noyaux de cellules traitées avec 10 µM d'AGs ne montrent aucune modification comparativement aux cellules contrôles et aux cellules traitées par l'α-cyclodextrine. Les noyaux gardent leur forme ronde et ne présentent ni marginalisation de la chromatine, ni condensation, ni fragmentation caractéristiques de l'apoptose. Ces observations sont en accord avec celles faites par microscopie électronique à transmission qui n'ont pas révélés de noyaux évoquant des cellules apoptotiques.

6.4. Effet sur l'induction de cellules en Sub-G1

Les cellules en Sub-G1 sont des cellules apoptotique, caractérisées par une condensation et/ou une fragmentation nucléaire associée à une fragmentation internucléosomale de l'ADN. Les cellules SK-N-BE traitées ou non par les AGTLCs ont subi une coloration à l'IP et ont été analysées au cytomètre en flux. Le pourcentage des cellules en Sub-G1 a été déterminé et les résultats obtenus sont présentées dans le **Tableau 3.**

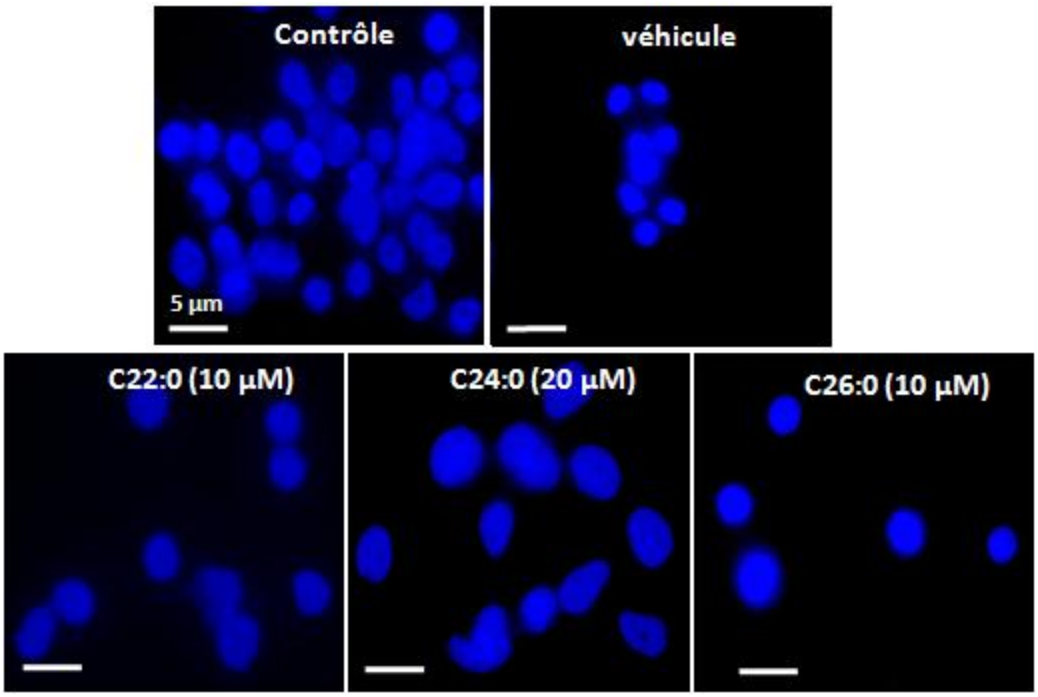


Figure ***54*****:** ***Caractérisation de la mort cellulaire induite par les AGTLCs par coloration nucléaire au Hoechst 33342.*** *Les cellules SK-N-BE ont été ont été traitées ou non par les AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) pendant 48 h (10 µM). Après coloration des noyaux par le Hoechst 33342, les cellules ont été observée par microscopie à fluorescence. Véhicule : α-cyclodextrine (1 mg/mL)*

Tableau 3 : ***Evaluation de l'effet des AGTLCs sur l'induction de l'apoptose.*** *Les pourcentages des cellules en Sub-G1 et des cellules apoptotiques ont été déterminés sur des cellules SK-N-BE traitées avec les AGs et colorées respectivement avec l'IP et le Hoechst 33342.*

	Contrôle / Véhicule	**C22:0**		**C24:0**		**C26:0**	
Concentrations en AGs		5 µM	10 µM	5 µM	10 µM	5 µM	10 µM
% de cellules apoptotiques	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
% de cellules en Sub-G1	2 ± 1 / 3 ± 1	8 ± 1	5 ± 1	5 ± 2	7 ± 3	9 ± 1	9 ± 4

Le traitement des cellules SK-N-BE avec les AGTLCs à 5 et 10 µM pendant 48 h révèle de légères variations du pourcentage des cellules en Sub-G1 indicatrices d'une mort par apoptose avec les différentes concentrations. Ceci est en accord avec l'observation des noyaux des cellules après coloration au Hoechst.

II Evaluation des effets de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur le stress oxydatif et l'inflammation

1 Effet sur le stress oxydatif

Le stress oxydatif est considéré comme un événement potentiellement déclencheur de la MA. Cela a conduit à préciser l'impact de C22:0 et des AGTLCs (C24:0 et C26:0) sur le stress oxydatif par l'intermédiaire de différents marqueurs.

1.1 Evaluation de la surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène

La production des ERO par les SK-N-BE a été mesurée après traitement ou non des cellules par les AGTLCs. La sonde H_2DCFDA a été utilisée compte tenu de sa capacité à pénétrer dans la cellule et à générer une molécule fluorescente après réaction avec les ERO (essentiellement radical hydroxyl et peroxynitrite). L'intensité moyenne de fluorescence (IMF) est proportionnelle à la quantité d'ERO par cellule. Les cellules SK-N-BE cultivées dans des plaques de 12 puits ont été traitées avec les AGTLCs à 10 ou 20 µM d'AGTLCs pendant 48 h. Ensuite, une coloration au H_2DCF-DA a été réalisée sur les cellules mises en suspension et celles-ci ont été analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 55**.

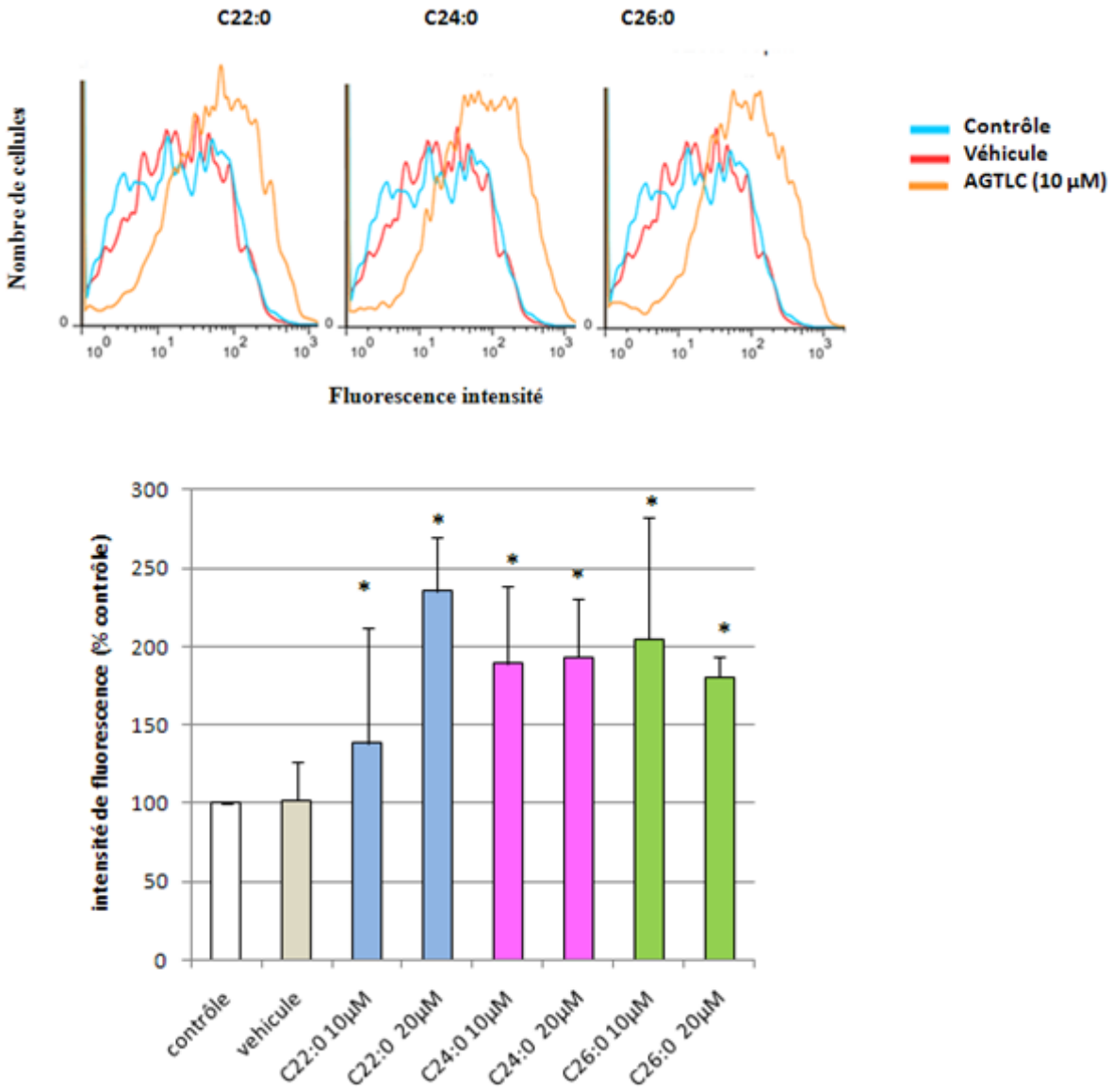


Figure 55: ***Mesure de la production des ERO par H_2DCFDA***. *Les SK-N-BE non traitées ou traitées avec l'α-cyclodextrine ou un AG pendant 48 h ont subi une coloration au H_2DCFDA et ont été analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage par rapport au contrôle. Véhicule : α-cyclodextrine (1 mg/mL). L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney * $p<0,05$.*

L'analyse par cytométrie en flux ne montre pas de différence significative de l'IMF entre cellules contrôles et cellules traitées avec l'α-cyclodextrine (véhicule). Comparativement à l'IMF dans les cellules traitées par l'α-cyclodextrine, une augmentation significative de cette dernière est observée en présence des trois AGTLCs à 10 et 20 µM. Le pourcentage d'augmentation de l'IMF par rapport au contrôle est respectivement de 140, 190 et 200 en présence de C22:0, C24:0 et C26:0 à 10 µM. A 20 µM, le pourcentage par rapport

au contrôle (240) est le plus important pour C22:0. Les effets de C24:0 et de C26:0 à 20 µM sont semblables à ceux observés à 10 µM.

1.2. Evaluation de la production de monoxyde d'azote

L'impact des AGTLCs sur la production du monoxyde d'azote (NO) dans les cellules SK-N-BE a été mesuré après coloration au DAF-FM diacétate. Cette sonde réagit avec le NO pour former un composé fluorescent dont l'intensité de fluorescence reflète la quantité de NO présente dans la cellule. Les cellules SK-N-BE cultivées dans des plaques de 12 puits ont été traitées ou non avec les AGTLCs à 5, 10 ou 20 µM pendant 48 h. Une analyse au cytomètre en flux des cellules mises en suspension et colorées avec la sonde a été réalisée. Les résultats sont présentés dans la **Figure 56**.

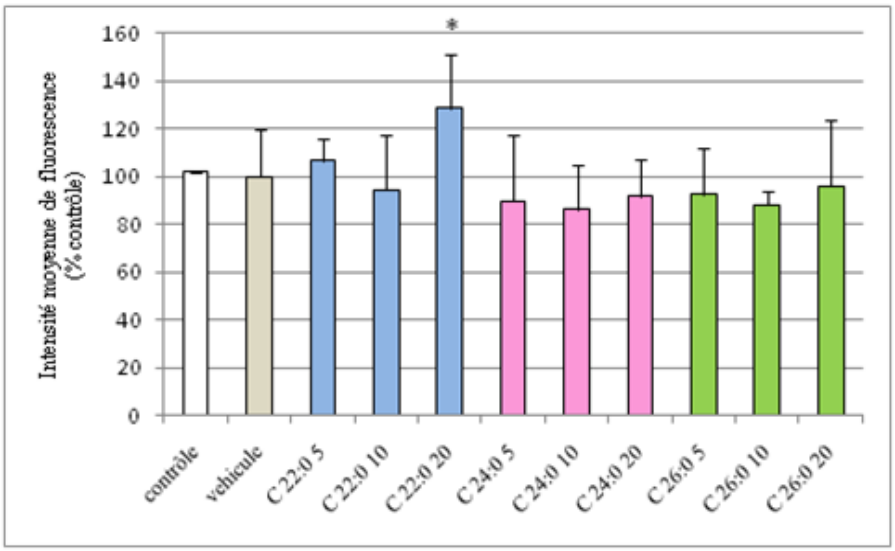


Figure 56 ***: Mesure de la production de NO.*** *Les SK-N-BE ont été traitées ou non avec l'α-cyclodextrine ou avec un AG. Après 48h de traitement, une coloration au DAF-FM diacétate et une analyse par cytométrie en flux ont été réalisées. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de l'IMF par rapport au contrôle. Véhicule : α-cyclodextrine (1 mg/mL). L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney * p<0,05.*

De légères variations du pourcentage de l'IMF par rapport au contrôle sont observées avec les AGs aux différentes concentrations. Une augmentation significative du pourcentage (125%) n'est révélée qu'avec le C22:0 à 20 µM.

1.3. Evaluation de la production du peroxyde d'hydrogène

La production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les cellules SK-N-BE traitées par les AGTLCs a été mesurée après coloration à la Dihydrorhodamine 123 (DHR123). Cette sonde pénètre facilement dans la cellule et les compartiments intracellulaires où elle est oxydée par H_2O_2 pour former un composé fortement fluorescent : la rhodamine 123. Les cellules SK-N-BE cultivées en plaques 12 puits ont été traitées avec les AGTLCs à 5, 10 ou 20 µM pendant 48 h. Une coloration à la DHR123 a été réalisée sur les cellules mises en suspension et ces dernières ont été analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 57**.

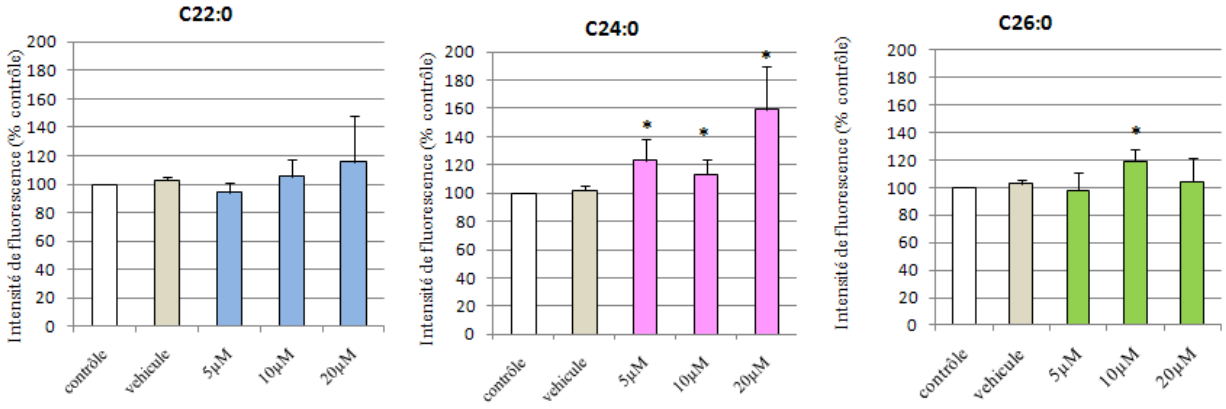


Figure 57 : ***Mesure de la production du peroxyde d'hydrogène.*** *Les SK-N-BE ont été traitées ou non avec l'α-cyclodextrine ou avec un AG. Après 48 h de traitement, une coloration à la DH123 et une analyse par cytométrie en flux ont été réalisées. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de l'IMF par rapport au contrôle. Véhicule : α-cyclodextrine (1 mg/mL). L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney * p<0,05.*

Le dosage du H_2O_2 révèle de légères augmentations suite au traitement avec le C22:0 et le C26:0 à l'exception du C26:0 à 10 µM où l'augmentation s'est révélée significative. En revanche, le C24:0 induit une surproduction de ce radical libre à partir de 5 µM d'AGTLC.

1.4. Evaluation de la production d'anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux

Les anions superoxydes produits par les cellules SK-N-BE traitées ou non par les AGTLCs ont été mesurés au niveau intracellulaire et mitochondriale après coloration respective avec la DHE et le MitoSOX. La DHE est un composé non-fluorescent qui après sa diffusion à travers la membrane cytoplasmique est oxydé en un composé fluorescent sous l'action d' $O_2^{\cdot-}$; le composé fluorescent généré permet de quantifier le pourcentage de cellules

fluorescentes par analyse au cytomètre en flux. Le MitoSOX est une sonde spécifique de la mitochondrie qui permet de détecter la production d'$O_2^{\cdot -}$ au niveau de cet organite.

Les cellules SK-N-BE cultivées en plaques 12 puits ont été traitées ou non avec les AGTLCs à 5, 10 ou 20 µM pendant 48 h. Une coloration DHE ou MitoSOX a été réalisée sur les cellules mises en suspension et celles-ci ont été analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 58**.

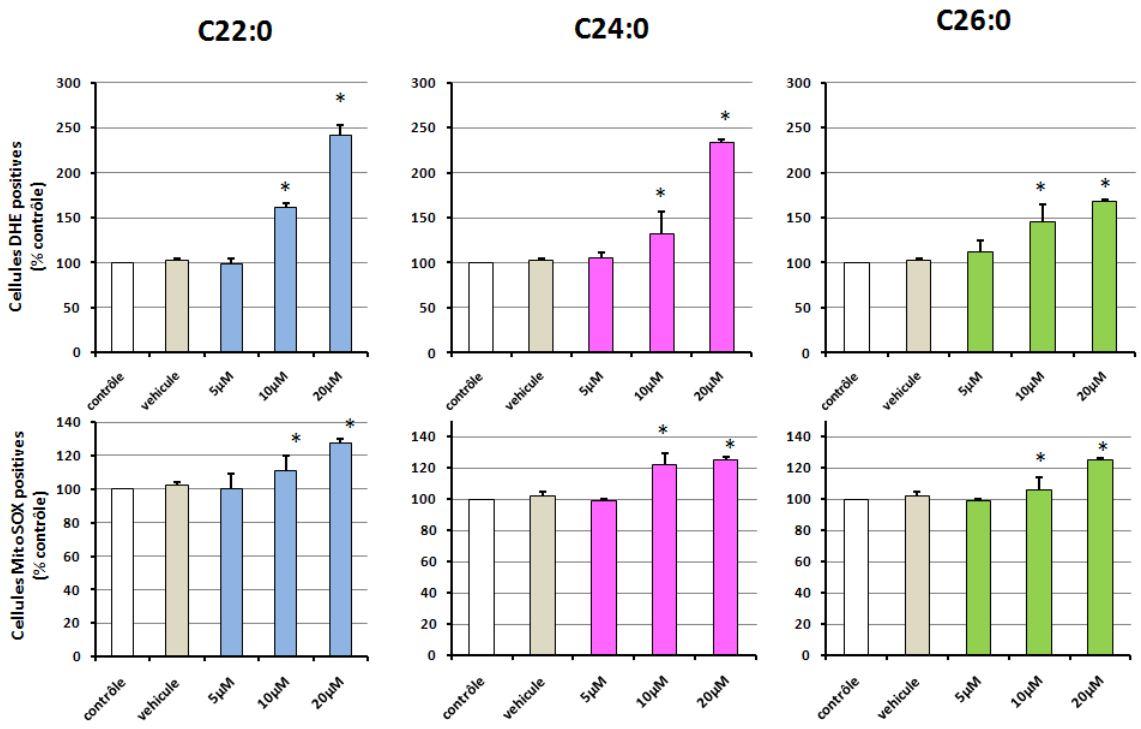


Figure 58 *: **Mesure de la production d'anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux.** Les SK-N-BE ont été traitées ou non avec l'α-cyclodextrine (1 mg/mL) ou un AG. Après 48 h, une coloration au DHE ou au MitoSOX et une analyse par cytométrie en flux ont été réalisées. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de cellules positives par rapport au contrôle. Véhicule : α-cyclodextrine (1 mg/mL). L'analyse des données a été réalisée par le test Mann Whitney * p<0,05.*

Les résultats de l'analyse par cytométrie en flux des cellules colorés au DHE montrent une augmentation significative du pourcentage des cellules DHE positives après traitement avec les différents AGTLCs à 10 et 20 µM. Ceci reflète essentiellement une surproduction intracellulaire des anions $O_2^{\cdot -}$. Le pourcentage de cellules positives par rapport au contrôle est de 160, 140 et 149 respectivement avec le C22:0, C24:0 et C26:0 à 10 µM; ce pourcentage passe à 245, 240 et 160 à 20 µM. A 5 µM, aucune augmentation n'est observée.

L'analyse des cellules colorées au MitoSOX montre une augmentation du pourcentage des cellules MitoSOX positives en présence d'AGTLCs. Comparativement au véhicule, cette

augmentation est significative à 10 et 20 µM de traitement avec les trois AGTLCs (C22:0, C24:0 et C26:0). Le pourcentage est de 110, 120 et 105 avec 10 µM de C22:0, C24:0 et C26:0 ; ce pourcentage passe à 127 avec C22:0 à 20 µM et à 125 avec C24:0 et C26:0 à 20 µM de traitement avec le C22:0 et le C24:0 et le C26:0. Aucune variation n'est observée pour les cellules traitées avec 5 µM d'AGTLCs.

1.5. Effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux de GSH intracellulaire

Puisque le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre de la balance antioxydant / pro-oxydant, soit par un déficit en anti-oxydants ou par une surproduction d'ERO et/ou ERN, il était important de préciser l'effet des AGTLCs sur le taux d'anti-oxydants intracellulaires et en particulier sur celui de GSH qui est l'anti-oxydant intracellulaire majoritaire. La mesure de la production de cet agent réducteur a été réalisé par coloration des cellules au monochlorobimane (MCB) ayant la caractéristique de se complexer à la fonction thiol (-SH) du résidu cystéine du GSH (tripeptide : glutamine-cystéine-glycine) conduisant à l'émission d'une fluorescence bleue sous excitation UV. Les cellules SK-N-BE cultivées en plaques 12 puits ont été traitées ou non avec les AGTLCs à 5, 10 ou 20 µM pendant 48 h. Une coloration au MCB a été réalisée sur les cellules mises en suspension qui ont été déposées sur lame de microscope par cytocentrifugation. Les lames ont été observées au microscope à fluorescence et les cellules MCB positives et négatives ont été comptées. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 4**

Tableau 4 ***: Mesure du GSH intracellulaire par coloration au MCB.*** *Les cellules MCB positives ont été quantifiées par microscopie à fluorescence après 48 h de culture avec ou sans AGTLCs (5, 10 et 20 µM). L'analyse statistique a été faite par le Test Mann Whitney. * P<0,05 (La différence entre essai et véhicule est significative). Véhicule : α-cyclodextrine.*

Paramètres			***C22:0***			***C24:0***			***C26:0***		
	Contrôle	***Véhicule 1 mg/mL***	***5 µM***	***10µM***	***20µM***	***5 µM***	***10µM***	***20µM***	***5 µM***	***10µM***	***20µM***
% de cellules MCB positives	88 ± 5	90 ± 10	82 ± 10	62 ± 8 *	40 ± 10 *	55 ± 9 *	50 ± 7 *	30 ± 10 *	65 ± 10 *	70 ± 5 *	45 ± 8 *

L'analyse des cellules positives au MCB montre une diminution du pourcentage des cellules MCB positives en présence d'AGTLCs. Comparativement au véhicule, cette diminution est significative dès 5 µM de traitement avec le C24:0 et le C26:0 et à partir de 10 µM avec le C22:0. Le pourcentage de cellules MCB positives est de 90% dans le véhicule ; il est de 82, 55 et 65% avec 5 µM de C22:0, C24:0 et C26:0; ce pourcentage passe à 62, 50 et 70% avec les AGTLCs à 10 µM. A 20 µM de traitement, avec le C22:0 et le C24:0 et le C26:0 ces pourcentages sont respectivement de 40, 30 et 45. Aucune variation significative n'est observée pour les cellules traitées avec le véhicule par rapport au contrôle.

1.6. Effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la production de marqueurs de la peroxydation lipidique

1.6.1. Effet sur la production d'oxystérols

L'auto-oxydation du cholestérol par des espèces radicalaires est à l'origine de la production des dérivés oxydés du cholestérol aussi appelés oxystérols. Les dérivés issus de l'auto-oxydation sont ceux oxydés sur le carbone 7 du cholestérol. L'évaluation de l'effet pro-oxydant des AGTLCs et leur capacité à induire une peroxydation des lipides a été évaluée par CPG/SM après traitement des cellules SK-N-BE avec 10 µM d'AGTLCs pendant 48 h. Les résultats de l'analyse sont présentés dans le **Tableau 5**.

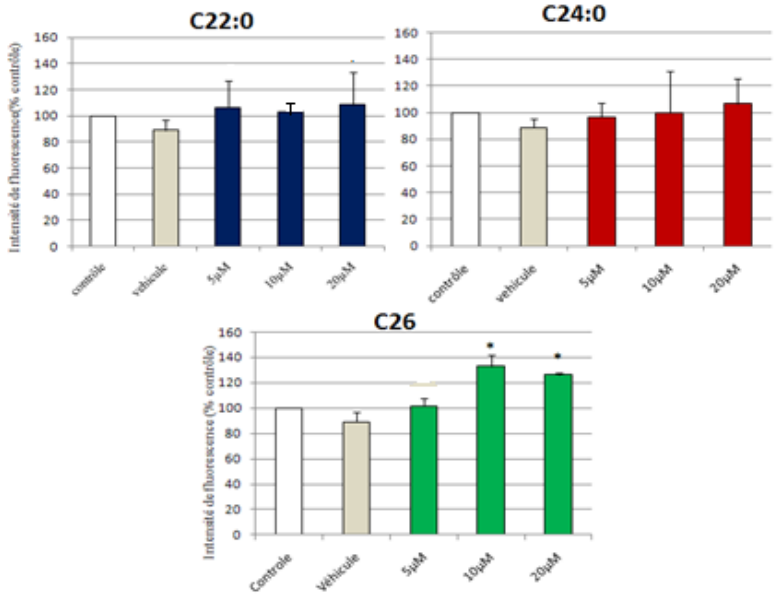
Tableau 5: ***Effet des AGTLCs sur les taux d'oxystérols pour appréhender la peroxydation lipidique.*** *Les taux d'oxystérols en C7 ont été quantifiées par CPG/SM après 48 h de culture avec ou sans AGTLCs à 10 µM. L'analyse statistique est faite par le Test de Mann Whitney (*P<0,05 : la différence entre essai et véhicule est significative).Véhicule : α-cyclodextrine.*

	7αOH pmoles/cellule	7βOH pmoles/cellule	7-cétocholésterol pmoles/cellule	Peroxydation lipidique (x 1000)
contrôle	23,50 ± 4,22	25,04 ± 1,90	83,33 ± 4,25	3,04 ± 0,41
Véhicule (1 mg/mL)	26,07 ± 6,60	25,45 ± 2,08	113,21 ± 19,77	2,98 ± 0,15
C 22:0 10 µM	28,75 ± 4,14	26,71 ± 0,59	135,33 ± 46,28	3,53 ± 0,08 *
C 24:0 10 µM	31,20 ± 4,14	26,71 ± 2,39	175,09 ± 80,18	3,80 ± 0,20 *
C 26:0 10 µM	27,68 ± 7,11	26,29 ± 4,01	122,04 ± 14,92	4,19 ± 0,88 *

Le traitement par les AGTLCs montre une augmentation du taux d'oxystérols dans les cellules ainsi que du rapport entre le taux des dérivées oxydés du cholestérol en C7 dans les cellules traitées et le taux du cholestérol dans ces cellules (l'augmentation de ce rapport est significative). Ce rapport de 2,98 dans le véhicule passe à 3,53 ; 3,8 et 4,19 dans les cellules traitées avec C22:0, C24:0 et C26:0.

1.6.2. Effet sur la production de 4-hydroxynonénal (4-HNE)

L'oxydation des acides gras peuvent conduire à la formation d'aldéhydes parmi lesquels on peut citer le 4-HNE. Pour évaluer l'incidence du traitement aux AGTLCs sur la production de 4-HNE, les cellules SK-N-BE, traitées avec les AGTLCs à 5, 10 et 20 µM pendant 48 h, ont été mises en suspension par trypsination puis un immunomarquage a été réalisé. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre le 4-HNE et avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. L'analyse de la fluorescence émise par les cellules par cytométrie en flux a permis de quantifier le 4-HNE et ses adduits. Les résultats sont présentés dans la **Figure 59**.



<u>Figure 59</u>*: Mesure du taux de 4-HNE dans des cellules SK-N-BE traitées par les AGTLCs.* *Les SK-N-BE ont été traitées en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (1 mg/mL) ou d'un AG à 5, 10 ou 20 µM. Après 48 h de traitement, un dosage du 4-HNE par cytométrie en flux dans les cellules a été réalisé après immunomarquage indirect. L'analyse statistique est faite par le Test de Mann Whitney. (* P<0,05 : la différence entre essai et véhicule est significative).*

Les résultats de l'analyse par cytométrie en flux des cellules montrent de légères augmentations du pourcentage de l'intensité moyenne de fluorescence après traitement des cellules avec le C22:0 et le C24:0, comparativement au véhicule. Cette augmentation est significative quand les cellules sont traitées avec le C26:0 à 10 et 20 µM. Ceci reflète une surproduction et une accumulation intracellulaire du 4-HNE. Ces résultats indiquent une peroxydation lipidique des acides gras avec le C26:0.

2. Evaluation de l'effet de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur les marqueurs de l'inflammation

2.1. Effet sur la production de cytokines quantifiée par analyse multiplexe par cytométrie en flux

Les cytokines IL6, IL8, IL1β, IL10, TNF-α, IL12 p70 ont été quantifiées dans le milieu de culture des cellules SK-N-BE traitées ou non par l'α-cyclodextrine ou avec les AGTLCs à 5 et 10 µM pendant 48 h. Dans ces conditions, par rapport aux cellules non traitées, aucune augmentation de sécrétion de ces cytokines n'a été observée avec l'α-cyclodextrine. Par ailleurs, en comparant les cellules traitées aux AGTLCs par rapport à l'α-cyclodextrine, aucune sécrétion de cytokines n'a été mise en évidence (résul

2.2. Effet sur la production de LTB-4 et de 15-(S)-HETE

Les leucotriènes sont des intermédiaires époxydes instables issus de la transformation de l'acide arachidonique. Le leucotriène B4 (LTB-4) est l'un de ces leucotriènes. Il est formé via la voie de la 15-lipooxygénase et il a des actions pro-inflammatoires multiples. De même, l'acide 15-hydroxyeicosatetraénoïque ou 15 (S)-HETE est le dérivé hydroxy majeur de l'acide arachidonique suite à l'action de la 15-lipooxygénase. C'est aussi l'acide monohydroxy principal synthétisé par l'activité lipooxygénase de la Cyclooxygénase-1. Il stimule l'immunodépression, régule les lymphocytes T et stimule la néo-vascularisation et la migration de cellules endothéliales. Pour évaluer l'incidence du traitement aux AGTLCs sur la production de LTB-4 et de 15-(S)-HETE par les cellules SK-N-BE, traitées avec le C24:0 et le C26:0 à 5, 10 et 20 µM pendant 48 h, un dosage colorimétrique a été réalisé. Les résultats sont présentés dans la **Figure 60**.

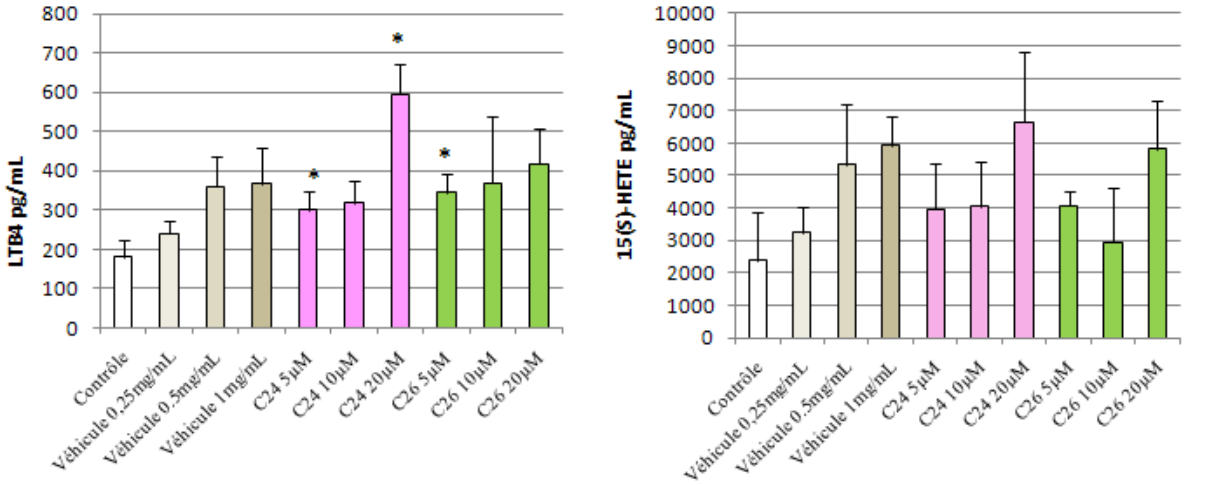


Figure 60*: Mesure des taux de LTB-4 et de 15(s)-HETE dans des cellules SK-N-BE traitées par les AGTLCs. Les SK-N-BE ont été traitées en absence ou en présence d'α-cyclodextrine ou d'un AGTLCs à 5, 10 ou 20 µM. Après 48h de traitement, un dosage du LTB-4 et du 15(s)-HETE dans les milieux de culture a été réalisé. L'analyse est faite par le Test de Mann Whitney. (* P<0,05 : la différence entre essai et véhicule est significative).*

Le traitement par les AGTLCs montre une augmentation significative du taux du LTB-4 dans les cellules traitées avec le C24:0 à 5 µM et avec le C26:0 à 5µM comparativement à la concentration de véhicule correspondant (0,25 mg/mL). Le taux de LTB-4 de 240 pg/mL dans le véhicule passe à 300 et 344 pg/mL respectivement avec le C24:0 et le C26:0 à 5 µM. Le traitement avec les AGTLCs à 10 et 20 µM révèle de légère surproduction de ce leucotriène en comparaison avec le véhicule correspondant (0,5 et 1 mg/mL).

Le dosage du 15(S-) HETE montre de légères variations de sa sécrétion, suite au traitement avec les AGTLCs. A 5 µM de traitement avec le C24:0 et le C26:0, une augmentation est observée alors qu'une diminution du taux du 15 (S) –HETE est révélée à 10 µM comparativement au véhicule correspondant (0,5 mg/mL). Ainsi, Le taux de 3245 pg/mL dans le véhicule passe à 3965 et 4069 avec les AGTLCs à 5 µM et à 4058 et 2952 pg/mL avec 10 µM en comparaison avec le taux dans le véhicule (0,5 mg/mL) qui est de 5324 pg/mL. A 20 µM d'AGTLCs, le taux du 15 (S) –HETE est peu varié par rapport au véhicule (1 mg/mL).

III Incidence de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) sur les marqueurs de la maladie d'Alzheimer

1. Effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux de la protéine Tau totale et phosphorylée

Les cellules SK-N-BE cultivées en plaques 12 puits ont été traitées ou non avec les AGTLCs à 10 µM pendant 48 h. Un dosage colorimétrique de la protéine Tau totale et phosphorylée a été réalisée sur les extraits protéiques. Les résultats normalisés par rapport à la quantité de protéine totale sont présentés dans la **Figure 61**. Le dosage des taux de la protéine Tau totale et phosphorylée dans des cellules SK-N-BE traitées par les AGTLCs montre une augmentation du taux de la protéine Tau phosphorylée dans les cellules traitées avec le C24:0 et le C26:0 à 10µM comparativement au véhicule.

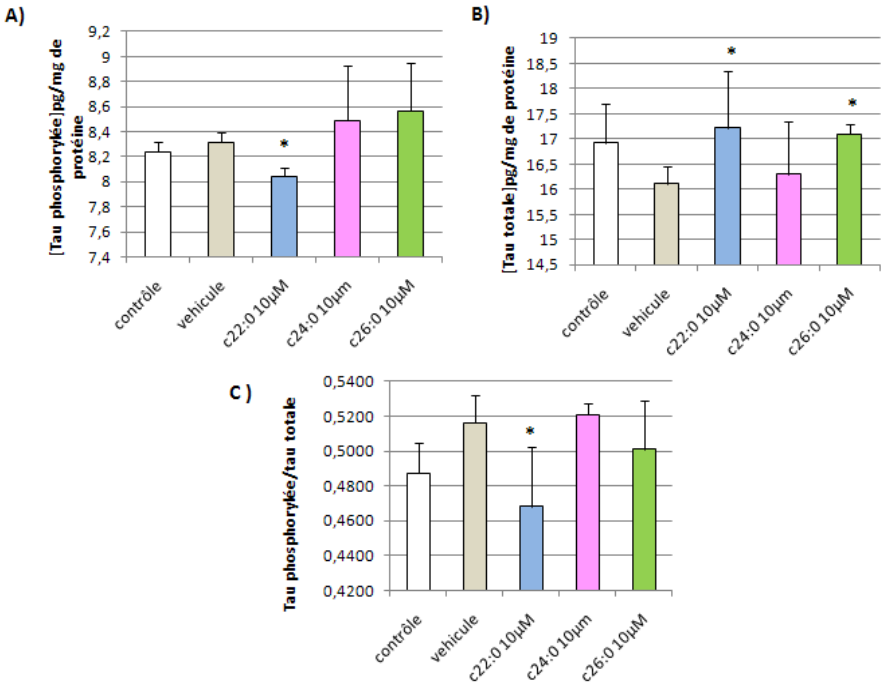


Figure 61 ***: Quantification de la protéine Tau totale et phosphorylée dans des cellules SK-N-BE traitées par*** C22:0, C24:0 ou C26:0**.** *Les SK-N-BE ont été traitées en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (véhicule : 1 mg/mL) ou d'un AG à 10 µM. Après 48 h de traitement, un dosage de la protéine Tau totale et phosphorylée sur des extraits protéiques a été réalisé.* ***A)*** *concentration de la protéine phosphorylée.* ***B)*** *concentration de la protéine Tau totale.* ***C)*** *rapport entre Tau phosphorylée et totale. L'analyse statistique est faite par le Test de Mann Whitney. (* P<0,05 : la différence entre essai et véhicule est significative).*

2. Effet de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le taux d'Aβ1-42

Les cellules SK-N-BE cultivées en plaques 12 puits ont été traitées ou non avec les AGTLCs à 10 µM pendant 48 h. Un dosage colorimétrique d'$A\beta_{1-42}$ a été réalisé dans le milieu de culture. Les résultats sont présentés dans la **Figure 62**.

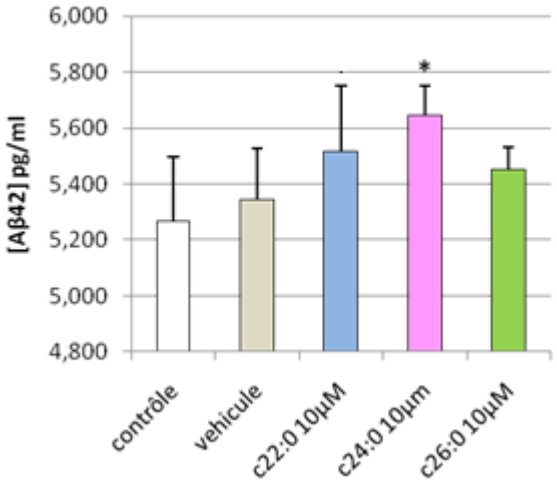


Figure 62 ***: Mesure du taux d'$A\beta_{1-42}$ dans des cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 et C26:0.*** *Les SK-N-BE ont été traitées en absence ou en présence d'α-cyclodextrine (1 mg/mL) ou d'un AG à 10 µM. Après 48 h de traitement, un dosage de l'$A\beta_{1-42}$ dans le milieu de culture a été réalisé. L'analyse statistique est faite par le Test de Mann Whitney. (* P<0,05 : la différence entre essai et véhicule est significative).*

Le traitement par les AGTLCs montre une augmentation significative du taux d'$A\beta_{1-42}$ avec le C24:0 à 10 µM, comparativement au véhicule. Le taux d'$A\beta_{1-42}$ est de 5,3 pg/ml dans le véhicule ; il passe à 5,65 pg/mL avec le C24:0 à 10 µM. Les traitements avec C22:0 et C26:0 à 10 µM révèlent de légères surproductions d'$A\beta_{1-42}$ qui sont non significatives.

3. Effet de C22:0, C24:0 et du C26:0 sur le taux de 24S-hydroxycholestérol et l'expression de CYP46

Puisque l'excès de cholestérol au niveau des neurones est converti en 24S-hydroxycholesterol (24OHC) via CYP46 et que le taux de ce dérivé du cholestérol est diminué chez les malades atteints de MA, un dosage de 24OHC a été réalisé par CPG/SM sur les cellules SK-N-BE traitées ou non avec les AGTLCs à 10 µM pendant 48 h. Les résultats sont présentés dans la **Figure 63**. Le dosage du 24OHC montre de légères variations non significatives à 10 µM de traitement avec les différents AGTLCs.

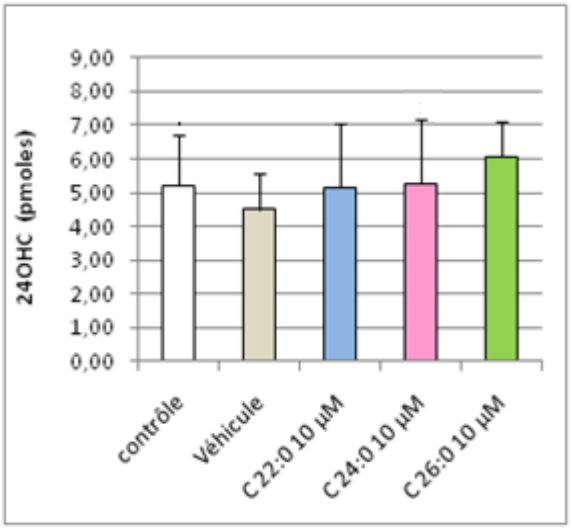


Figure 63 : *Mesure du taux du 24OHC dans les cellules SK-N-BE.* *Le taux du* 24OHC *a été quantifié par CPG/SM après 48 h de culture avec ou sans AGTLCs à 10 µM. L'analyse statistique a été faite par le Test de Mann Whitney.*

Cette absence de différence de 24OHC entre cellules traitées ou non par les AGTLCs est en accord avec l'absence de différence d'expression de CYP46 dans les différentes conditions de culture.

4. Evaluation par RT-qPCR des effets de C22:0, C24:0 et C26:0 sur le niveau d'expression de gène associés à la maladie d'Alzheimer : APP, α-sécrétase et β-sécrétase.

La quantification de l'expression de certains gènes impliquée dans la physiologie de la MA et en particulier dans la voie de synthèse de l'amyloïde β (APP, α-sécrétase et β-sécrétase) a été réalisée par RT-qPCR sur des cellules SK-N-BE traitées avec les AGTLCs à 10 µM pendant 24 h. Comparativement aux cellules mises en présence d'α-cyclodextrine, l'analyse des résultats des cellules traitées par les AGTLCs ne révèle aucun effet significatif sur le niveau d'expression de ces gènes (résultats non montrés). Les Ct des cellules contrôles sont de 21,2 de 22,2 et de 22,4 respectivement pour l'APP, la β et α- sécrétase.

IV Evaluation de l'implication d'Aβ1-40 dans l'accumulation de C22:0 et d'AGTLCs (C24:0, C26:0)

1. Effet d'Aβ $_{1-40}$ sur la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial

Diverses études ont montré *in vitro* une toxicité de l'Aβ libre ou agrégé et d'autres protéines amyloidogéniques sur des neurones en culture. De plus, *in vivo*, chez la souris, des

injections intracérébrales de ces composés ont révélé des impacts sur le métabolisme cellulaire, le fonctionnement des synapses et l'organisation du cytosquelette.

Dans cette étude, une évaluation de la toxicité *d*'Aβ $_{1\text{-}40}$ oligomérisé a été réalisé sur les cellules SK-N-BE. L'influence de ce peptide a été précisée sur la prolifération, sur le métabolisme mitochondrial ainsi que sur l'accumulation intracellulaire d'AGTLCs et de dérivés oxydés du cholestérol.

La capacité d'Aβ$_{1\text{-}40}$ a induire une mortalité cellulaire a été évaluée par le test MTT qui reflète l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale et par le dosage de l'activité LDH libérée dans le milieu de culture. Les cellules SK-NB-E ont été cultivées pendant 24 et 48 h en présence d'Aβ$_{1\text{-}40}$ utilisé à 10, 20, 50 ou 100 µM pour réaliser le test MTT. Les cellules ont été cultivées pendant 24 et 48 h en présence d'Aβ$_{1\text{-}40}$ utilisé à 10 µM pour réaliser le test LDH. Les résultats de ces dosages sont présentés dans la **Figure 64 A et B**.

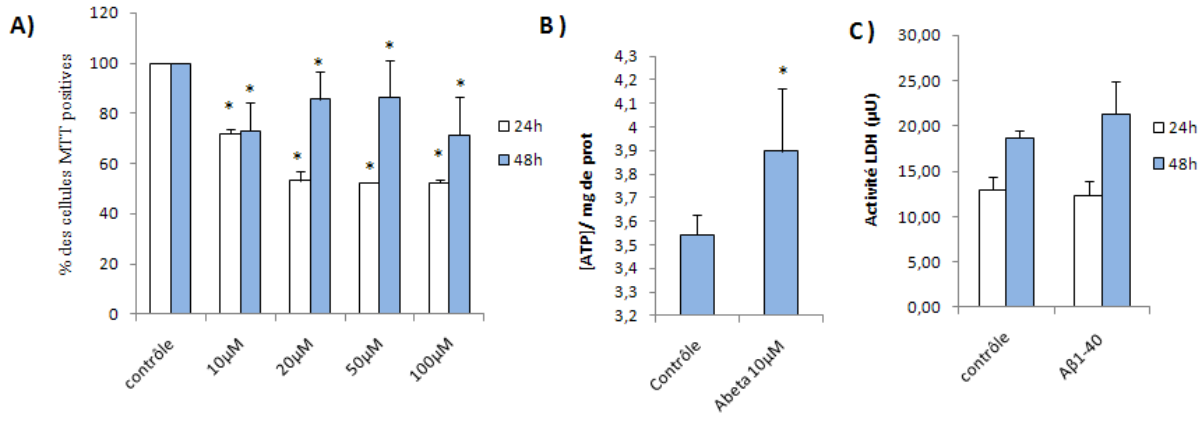


Figure 64 : ***Évaluation des effets d'Aβ$_{1\text{-}40}$ sur la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial (test MTT, dosage de l'ATP) et sur la mortalité cellulaire (activité LDH)****. Les cellules SK-N-BE ont été cultivées en absence (contrôle) ou en présence d'Aβ$_{1\text{-}40}$ utilisé à 10, 20, 50 et/ou 100 µM. Le test MTT, le dosage de l'ATP ainsi que de l'activité LDH ont été réalisés après 24 et/ou 48 h de traitement. L'analyse des données a été faite par le test de Mann Whitney. La différence significative entre contrôle et cellules traitées avec l'Aβ$_{1\text{-}40}$ est indiquée par * ; P< 0,05.*

Après traitement des SK-N-BE avec l'Aβ$_{1\text{-}40}$ à 10, 20, 50 et 100 µM à 24 et 48 h une diminution significative du pourcentage de cellules MTT positives (cellules ayant une activité succinate déshydrogénase diminuée) est observée par rapport au contrôle. Cette diminution est plus marquée à 24 h de traitement avec l'Aβ$_{1\text{-}40}$ et elle est stable à des concentrations

supérieure à 10 µM. Ainsi, à 24 h de traitement, le pourcentage passe de 100 à 70% à 10 µM, puis à 50% avec 20, 50 et 100 µM d'$A\beta_{1-40}$ (**Figure 64 A**).

Sur les extraits des cellules SK-N-BE traitées avec 10 µM d'$A\beta_{1-40}$ pendant 48 h, une mesure du taux d'ATP a été réalisée (**Figure 64 B**). Dans ces conditions, une augmentation significative du taux d'ATP a été révélée par rapport au contrôle.

Le dosage de l'activité LDH dans le milieu de culture collecté après traitement des SK-N-BE avec 10 µM d'$A\beta_{1-40}$ pendant 24 et 48 h montre une augmentation de cette activité après 48h de traitement alors qu'elle est inchangée après 24 h. Ainsi, l'activité de 19 µU dans le contrôle passe à 22 µU pour l'$A\beta_{1-40}$ à 10 µM (**Figure 64 C**).

2. Effet de l'Aβ1-40 sur l'accumulation de lipides : C22 :0, AGTLCs (C24:0, C26:0), cholestérol et oxystérols

Les effets d'$A\beta_{1-40}$ sur l'accumulation de lipides ont été mesurés en prenant en compte différents acides gras (en particulier C22 :0 et AGTLCs (C24:0 et C26:0)) et des oxystérols afin d'évaluer si l'activité d'$A\beta_{1-40}$ pouvait i) altérer le métabolisme peroxysomal et ii) impliquer le C22:0 et les AGTLCs (C24:0 et C26:0) ou les oxystérols comme seconds messagers. Ainsi, les cellules ont été incubées pendant 48 h avec l'$A\beta_{1-40}$ et une quantification des acides gras et des oxystérols par CPG/SM et a eu lieu. Les résultats de cette analyse sont présentés dans les **Tableau 6 A** et **B.**

Le traitement des SK-N-BE par l'$A\beta_{1-40}$ pendant 48 h montre une augmentation des quantités de tous les acides gras dosés. Cette augmentation n'est significative que pour le C20:4, le C22:0 et le C22:6 (DHA). En effet, les taux de C22:0, de C24:0 et de C26:0 qui sont de $1,57x10^{-8}$, $1,38x10^{-8}$ et de $7,63x10^{-9}$ nmoles/cellule dans les cellules contrôles passent à $2,04x10^{-8}$, $1,75x10^{-8}$ et $9,46x10^{-9}$ nmoles/cellule dans les cellules traitée avec l'$A\beta_{1-40}$ à 10 µM. L'augmentation la plus importante est observée pour l'acide arachidonique (C20:4).

De même, une augmentation de la quantité de DHA et de son précurseur (C24:6) a été révélée dans les cellules traitées. Les taux de ces deux acides gras respectivement de $2,55x10^{-7}$ et $2,74x10^{-8}$ nmoles/cellule dans les cellules contrôles passent à $3,6x10^{-7}$ et à $3,19x10^{-8}$ nmoles/cellule dans les cellules traitées.

Tableau 6: ***Évaluation des effets de l'Aβ$_{1-40}$ sur le profil d'acides gras et sur la production d'oxystérols.*** *Les cellules SK-NB-E ont été cultivées pendant 48h en absence (contrôle) ou en présence d'Aβ$_{1-40}$ (10 µM ; 48 h). Un dosage des acides gras et des oxystérols a été réalisé par CPG/SM.*

A)

	C20:4 nmoles/cellule	C22:0 nmoles/cellule	C22:6 nmoles/cellule	C24:0 nmoles/cellule	C24:6 nmoles/cellule	C26:0 nmoles/cellule
Contrôle	$1{,}53\text{x}10^{-06} \pm 1{,}77\text{x}10^{-07}$	$1{,}57\text{x}10^{-08} \pm 2{,}42\text{x}10^{-09}$	$2{,}55\text{x}10^{-07} \pm 4{,}42\text{x}10^{-08}$	$1{,}38\text{x}10^{-08} \pm 2{,}16\text{x}10^{-09}$	$2{,}74\text{x}10^{-08} \pm 4{,}89\text{x}10^{-09}$	$7{,}63\text{x}10^{-09} \pm 1{,}13\text{x}10^{-09}$
Abeta1-40 (10µM)	$8{,}11\text{x}10^{-06} \pm 1{,}79\text{x}10^{-07}$ *	$2{,}04\text{x}10^{-08} \pm 1{,}36\text{x}10^{-09}$ *	$3{,}67\text{x}10^{-07} \pm 7{,}02\text{x}10^{-08}$ *	$1{,}75\text{x}10^{-08} \pm 2{,}85\text{x}10^{-09}$	$3{,}19\text{x}10^{-08} \pm 3{,}04\text{x}10^{-09}$	$9{,}46\text{x}10^{-09} \pm 2{,}02\text{x}10^{-09}$

B)

	7α-OH pmoles/cellule	7β-OH pmoles/cellule	7cétocholestérol pmoles/cellule	24sOH pmoles/cellule	Oxystérols/ Cholestérol
Contrôle	$1{,}97\text{x}10^{-06} \pm 4{,}69\text{x}10^{-07}$	$2{,}50\text{x}10^{-06} \pm 3{,}46\text{x}10^{-07}$	$7{,}89\text{x}10^{-06} \pm 1{,}14\text{x}10^{-07}$	$6{,}64\text{x}10^{-07} \pm 1{,}38\text{x}10^{-07}$	$9{,}67\text{x}10^{-08} \pm 1{,}57\text{x}10^{-08}$
Abeta1-40 (10µM)	$2{,}08\text{x}10^{-06} \pm 3{,}84\text{x}10^{-07}$	$3{,}50\text{x}10^{-06} \pm 2{,}86\text{Ex}10^{-07}$	$8{,}93\text{Ex}10^{-06} \pm 1{,}37\text{x}10^{-06}$ *	$7{,}79\text{x}10^{-07} \pm 1{,}18\text{x}10^{-07}$	$1{,}52\text{x}10^{-07} \pm 3{,}74\text{x}10^{-08}$ *

*L'analyse des données a été faite par le test de Mann Whitney. La différence significative entre contrôle et cellules traitées avec Aβ$_{1-40}$ est indiquée par * P< 0,05*

Par ailleurs, comparativement aux cellules contrôle, le dosage de dérivées oxydées du cholestérol montre une augmentation de leur quantité dans les cellules traitées. Cette augmentation est significative pour le 7-cétocholestérol dont la quantité passe de $7{,}89\text{x}10^{-6}$ pmoles/cellule dans les cellules contrôles à $8{,}93\ \text{x}10^{-6}$ pmoles/cellule après traitement. De plus, le calcul du rapport entre le taux des oxystérols et le taux du cholestérol dans les deux conditions montre une augmentation significative de ce rapport témoignant d'une peroxydation plus importante des lipides après traitement avec l'Aβ$_{1-40}$. Ce rapport de $9{,}67\text{x}10^{-8}$ pmoles/cellule dans les cellules contrôles passe à $1{,}52\ \text{x}10^{-7}$ pmoles/cellule suite au traitement.

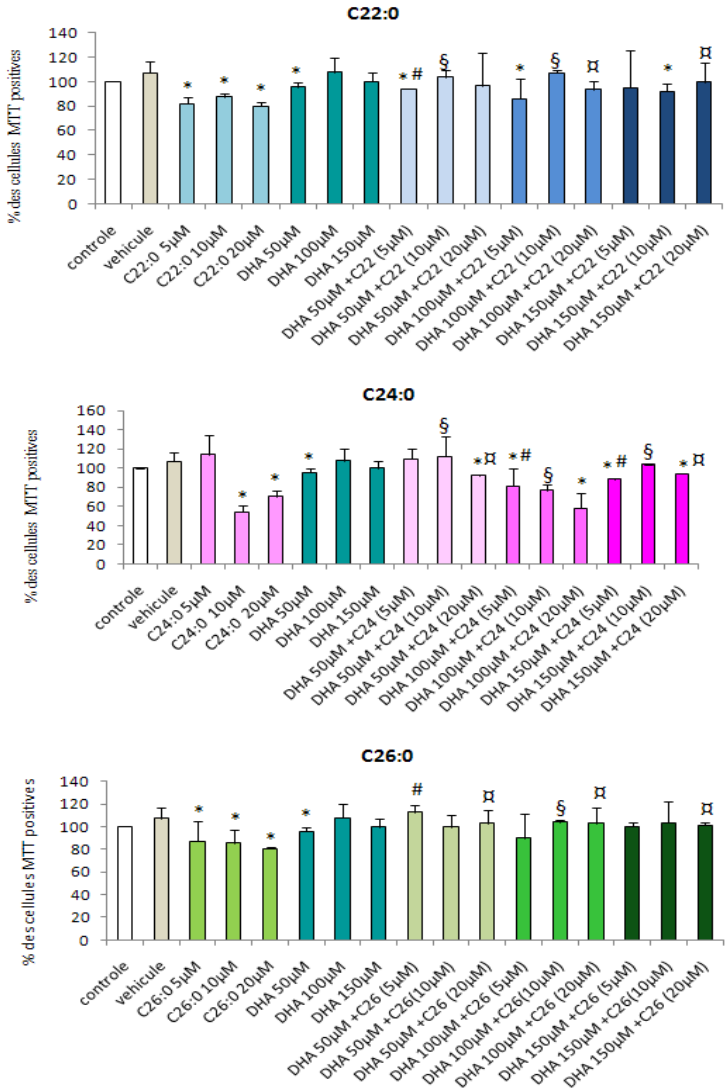
V. Effets du DHA sur la toxicité de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0)

1. Effets du DHA sur la prolifération cellulaire

Le DHA (C22:6, n-3) est un acide gras polyinsaturé appartenant à la famille des acides gras oméga 3. Le taux de cet acide gras est diminué dans le cerveau et le plasma des patients atteints de MA. Une évaluation de la capacité du DHA à s'opposer aux effets toxiques des AGTLCs a été réalisée l'utilisant à différentes concentrations sur cellules SK-N-BE traitées ou non par les AGTLCs. La capacité du DHA à rétablir la prolifération cellulaire a été évaluée par un test MTT sur les cellules traitées ou non avec l'α-cyclodextrine ou par un AGTLC (5, 10 ou 20 µM) combiné ou non avec le DHA (50, 100 et 150 µM) pendant 48 h. Les résultats sont présentés dans la **Figure 65**.

Le traitement des SK-N-BE avec les AGTLCs utilisés à 5, 10 et 20 µM montre une diminution du pourcentage des cellules MTT positives reflétant une diminution d'activité succinate déshydrogénase. Avec le DHA seul, une légère augmentation du pourcentage de cellules MTT positives est révélée à 100 µM de traitement. La combinaison du C22:0 à 5, 10 et 20 µM avec les différentes concentrations de DHA montre une augmentation du pourcentage des cellules MTT positives par rapport au traitement avec les AGTLCs seuls. Cette augmentation est significative pour le C22:0 (5 et 10 µM) combiné au DHA (50 µM), pour le C22:0 (10 et 20 µM) combiné au DHA à 100 µM ainsi que pour le C22:0 à 20 µM combiné au DHA utilisé à 150 µM.

Un traitement simultané des cellules avec le C24:0 à 10 et 20 µM et avec le DHA à 50 µM induit une augmentation significative de la viabilité cellulaire par rapport au traitement avec le C24:0 seul. Avec le C24:0 à 5 µM, aucun effet notable du DHA à 50 µM n'est observé. Le DHA utilisé à 100 µM en combinaison avec le C24:0 utilisé à 5 et 10 µM s'oppose à la cytotoxicité du C24:0. A 150 µM, le DHA utilisé avec le C24:0 à 5, 10 et 20 µM s'oppose aussi à la toxicité de cet acide gras. Le C26:0 utilisé en combinaison avec le DHA à différentes concentrations rétablit la viabilité cellulaire altérée par le C26:0. En effet, à 50 µM de DHA et en présence de C26:0 à 5 ou 20 µM, la viabilité augmente significativement par rapport au traitement par le C26:0 seul. Le DHA utilisé à 100 µM en combinaison avec le C26:0 utilisé à 10 et 20 µM s'oppose à la toxicité du C26:0. A 150 µM de DHA en présence de C24:0 à 20 µM, le pourcentage de viabilité augmente significativement comparativement au pourcentage observé avec les cellules traitées par le C26:0.



<u>Figure 65</u> : ***Evaluation de l'effet du DHA l'activité mitochondriale et/ou la prolifération des cellules traitées par les AGTLCs.*** *Les cellules SK-N-BE ont été cultivées en absence (contrôle) ou en présence d'α-cyclodextrine (1 mg/ mL) ou d'un AGTLC utilisé à 5, 10 ou 20 µM seul ou combiné au DHA (50, 100 et 150 µM). Après 48 h de traitement, un test MTT a été réalisé. L'analyse des données a été faite par le test de Mann Whitney. Des différences significatives (P< 0.05) entre véhicule et cellules traitées sont indiquées par * ; celles entre AGTLCs (5 µM) et AGTLCs (5µM) associé au DHA (50, 100 et 150 µM) sont indiquées par ŧ ; celles entre AGTLCs (10 µM) et AGTLCs (10 µM) associé au DHA (50, 100 et 150 µM) sont indiquées par ф ; celles entre AGTLCs (20 µM) et AGTLCs (20 µM) associé au DHA (50, 100 et 150 µM) sont indiquées par ƀ.*

2. Effet du DHA du DHA sur le stress oxydatif

Le pouvoir antioxydant du DHA a été mesuré par coloration au H_2DCFDA sur les cellules SK-N-BE traitées ou non avec l'α-cyclodextrine ou avec un AGTLC (5, 10 ou 20 µM) seul ou en combinaison avec le DHA (50, 100 et 150 µM) pendant 48 h. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentages par rapport au contrôle dans la **Figure 66**.

L'analyse par cytométrie en flux montre que comparativement aux cellules traitées par l'α-cyclodextrine, une augmentation significative de l'IMF est observée en présence des trois AGTLCs à 5, 10 µM. A 5 µM, le pourcentage de l'IMF par rapport au contrôle, qui était de 100 dans le véhicule, passe à 240 et 325 en présence respectivement de C22:0 et de C24:0 alors qu'il reste inchangé en présence de C26:0. Le pourcentage de l'IMF par rapport au contrôle est respectivement de 250, 200 et 300 en présence de C22:0, C24:0 et C26:0 à 10 µM. A 20 µM, ce pourcentage augmente après traitement au C22:0 alors qu'il diminue avec le C24:0 et le C26:0. Le traitement des SK-N-BE avec le DHA (50 et 100 µM) n'induit pas de modifications de l'IMF comparativement au véhicule. Par contre, à 150 µM de DHA, une augmentation significative du pourcentage de l'IMF par rapport au contrôle est révélée.

La combinaison du C22:0 (5 et 20 µM) avec le DHA (50, 100 et 150 µM) montre une diminution significative du pourcentage de l'IMF comparativement au pourcentage des cellules traitées avec C22 :0. De même, la combinaison C24:0 (5 et 10 µM) avec le DHA (50, 100 et 150 µM) révèle une diminution significative du pourcentage de l'IMF par rapport à celui trouvé dans les cellules traitées avec C24:0.

Le DHA utilisé avec le C26:0 révèle une diminution significative du pourcentage de l'IMF pour les conditions suivantes : C26:0 (5 µM) combiné au DHA (50 µM) ; C26:0 (5,10 et 20 µM) combiné au DHA (100 µM) et C26:0 (10 µM) combiné au DHA (150 µM).

L'effet antioxydant le plus marqué du DHA est observé vis-à-vis du C24:0.

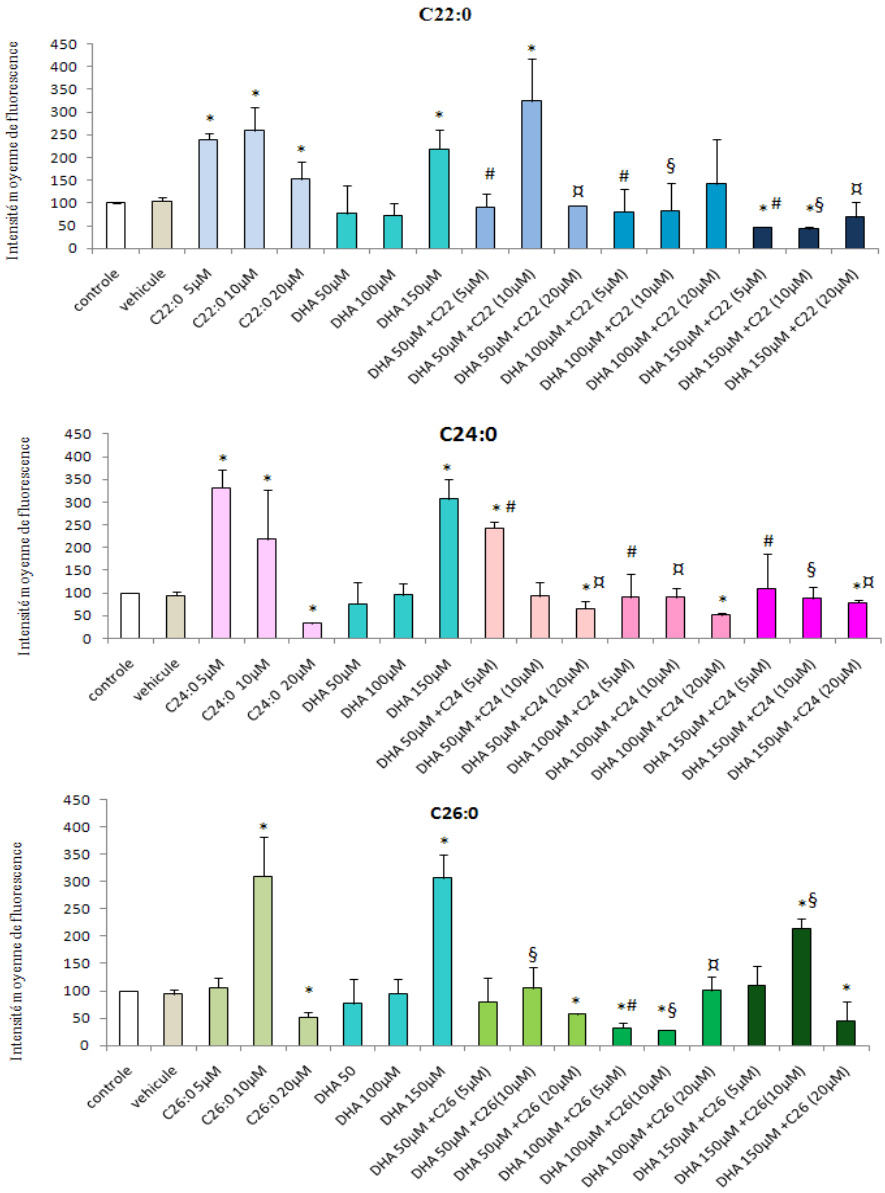


Figure 66: ***Evaluation de l'effet du DHA sur la production des ERO dans des cellules traitées par les AGTLCs.*** *Les cellules SK-N-BE ont été cultivées en absence (contrôle) ou en présence d'α-cyclodextrine (1 mg/ mL) ou d'un AGTLC utilisé à 5, 10 ou 20 µM seul ou en combinaison avec le DHA (50, 100 et 150 µM). Après 48 h de traitement, les cellules ont été colorées au H_2DCFDA et analysées au cytomètre en flux. L'analyse statistique des données a été faite par le test de Mann Whitney. Des différences significatives (P< 0,05) entre véhicule et cellules traitées sont indiquées par * ; celles entre AGTLCs (5 µM) et AGTLCs (5µM) associé au DHA (50, 100 et 150 µM) sont indiquées par ŧ ; celles entre AGTLCs (10 µM) et AGTLCs (10 µM) associé au DHA (50, 100 et 150 µM) sont indiquées par ф ; celles entre AGTLCs (20 µM) et AGTLCs (20 µM) associé au DHA (50, 100 et 150 µM) sont indiquées par ƀ.*

B Modèles animaux

La MA se caractérise au niveau du système nerveux central par la présence de plaques séniles constituées de protéines amyloïdes et de dégénérescence neurofibrillaire constituée de protéine tau hyperphosphorylée et de microtubules désorganisées. Ces structures sont actuellement des signes caractéristiques de la MA *in situ*. Actuellement, l'étiologie de la MA est encore mal connue et il serait souhaitable de disposer de marqueurs supplémentaires afin de mieux comprendre cette pathologie. Dans la MA, un rôle potentiel du peroxysome est envisagé sur la base de différents résultats obtenus tant chez l'homme (**Lizard *et al.*, 2012**) que sur des modèles murins (**Cimini *et al.*, 2009**). Cette hypothèse a été confortée par l'identification de taux élevés de C22 :0 et d'AGTLCs au niveau des lésions corticales chez des malades atteints de la MA (**Zou et al., 2011**) au stade V et VI selon la classification de Braak & Braak **(Braak & Braak, 1991).**

Les colorations histologiques classiques à l'hématoxyline/éosine/safran (HES) permettent difficilement de distinguer des différences entre des cerveaux atteints ou non de MA (**Figure 67**).

En utilisant des souris femelles normales et transgéniques (APP PS1 ΔE9) âgées de 11-12 mois, nous avons recherché sur des coupes sagittales de cerveaux **1)** des marqueurs conventionnels de la MA (plaques séniles révélées à l'aide d'anticorps (anti-amyloïdes β) ou de colorations spécifiques (Thioflavine T, Rouge Congo) et dégénérescence neurofibrillaire révélée à l'aide d'anticorps anti-tau hyper-phosphorylé) ainsi que **2)** des marqueurs peroxysomaux (ABCD3, ACOX1, catalase) **3)** des marqueurs du cytosquelette (neurofilaments, tubuline, actine), **4)** des marqueurs mitochondriaux (Mitotracker Red, Nonyl Acridine Orange, cytochrome c) et lysosomaux (Lysotracker, antigène LAMP1) et **5)** la composition en acides gras et en phospholipides à l'aide de fluorochromes appropriés (Bodipy et LipidTox).

Les résultats préliminaires obtenus sont présentés.

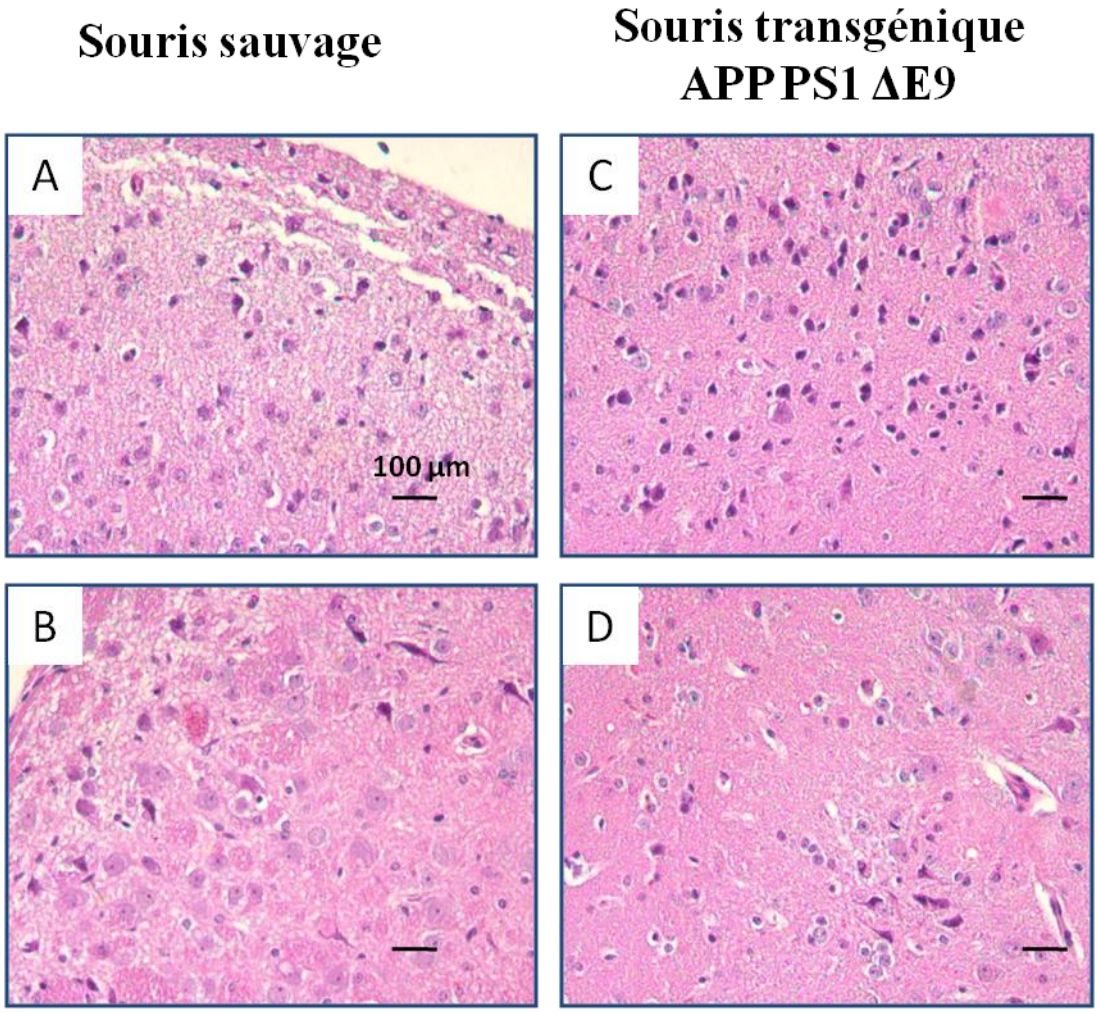


Figure 67: Coloration hématoxyline-éosine-safran (HES). Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A, B**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**C, D**) au niveau du cortex; femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
Coupes de 5 µm d'épaisseur.

Cette démarche avait pour objectifs :

* De préciser si la MA pouvait entrainer des modifications de la quantité de peroxysomes appréciée par l'expression d'ABCD3 (protéine majeure de la membrane peroxysomale) et/ou de l'expression de protéines peroxysomales intervenant dans la dégradation des AGTLCs par β-oxydation (ACOX1, catalase).
* D'évaluer si les perturbations du cytosquelette susceptibles de modifier le fonctionnement d'organites (mitochondries, peroxysomes) à même d'influencer le développement de la maladie pouvaient être détectées.
* D'appréhender l'impact de la MA sur les mitochondries et les lysosomes,
* De déterminer l'incidence de la MA sur les modifications en acides gras et en phospholipides en raison des altérations des profils d'acides gras et de certains phospholipides (plasmalogènes) rapportés au niveau de lésions (**Kou *et al*., 2011**).
* De définir s'il existe des zones du cerveau pouvant ou non être plus ou moins riches en perosysomes.

1. Etude de marqueurs conventionnels de la MA sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques

Les atteintes cérébrales conventionnelles associées à la MA ont été validées en identifiant la présence de protéines amyloïdes β et de protéine tau hyperphosphorylée à l'aide d'anticorps spécifiques (**Figures 68 et 69).** Ces structures sont aisément révélées grâce aux anticorps utilisés. Par ailleurs, les plaques séniles contenant des protéines amyloïdes ont aussi été mises en évidence grâce à l'utilisation de la Thioflavine T et du Rouge Congo (**Figures 70-1et 70-2**), deux molécules fluorescentes réagissant avec les protéines amyloïdes lorsque celles-ci sont dans leurs conformations β qui leur confère leurs propriétés cytotoxiques et pro-agrégantes. Alors que les anticorps monoclonaux reconnaissent des séquences peptidiques, ces deux fluorochromes apportent des informations complémentaires en ne réagissant qu'avec les amyloïdes organisés en feuillet β. A l'aide de ces différents marqueurs (anticorps et molécules fluorescentes) un nombre important de plaques séniles mais aussi de dégénérescences neurofibrillaires (non encore décrites et donc à confirmer) a été détecté chez les souris transgéniques. En revanche, ces structures sont en quantité très faibles, voire absentes, chez les souris sauvages du même âge. Ces marqueurs conventionnels sont donc bien appropriés pour révéler les souris atteintes de MA.

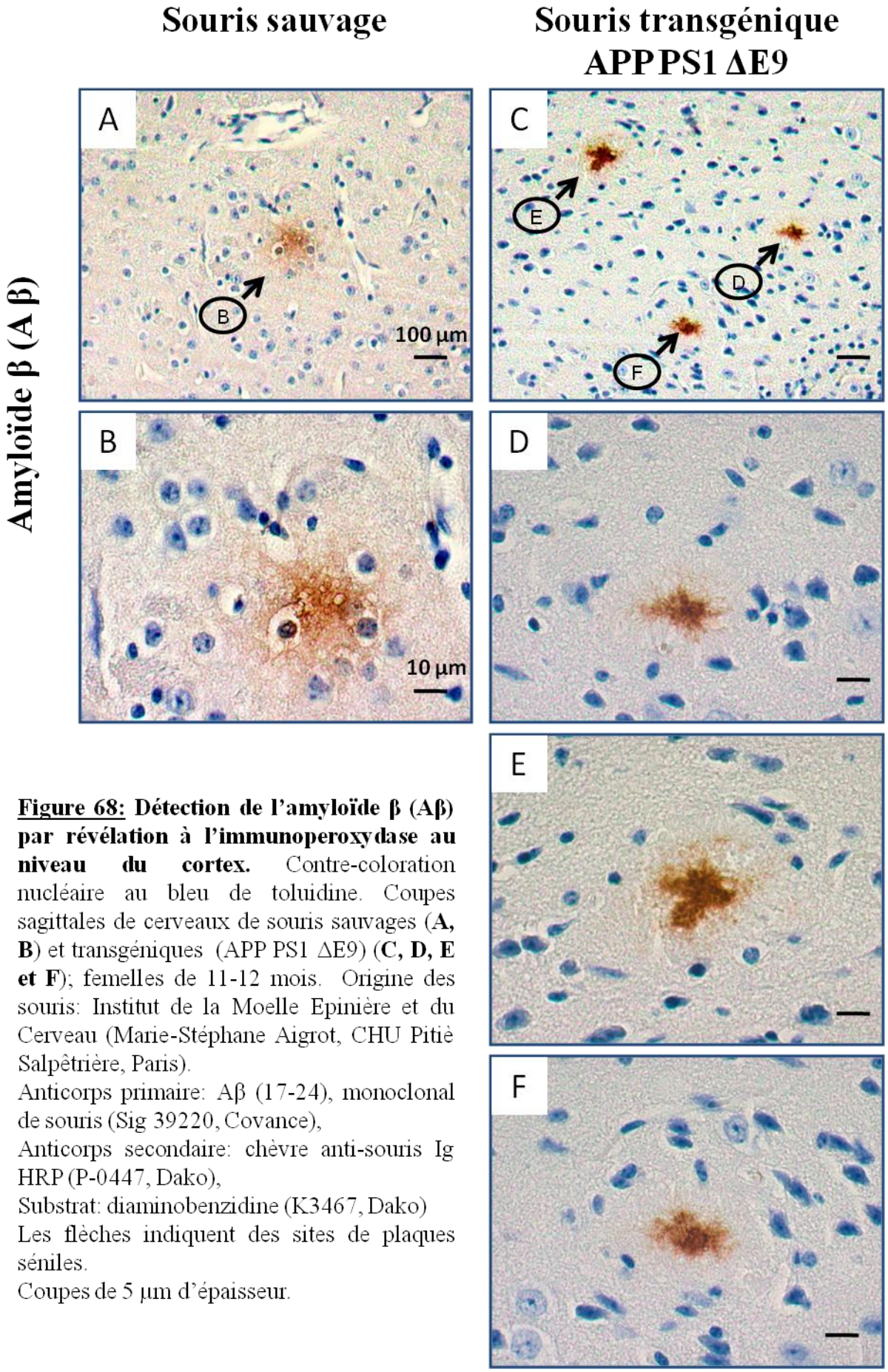
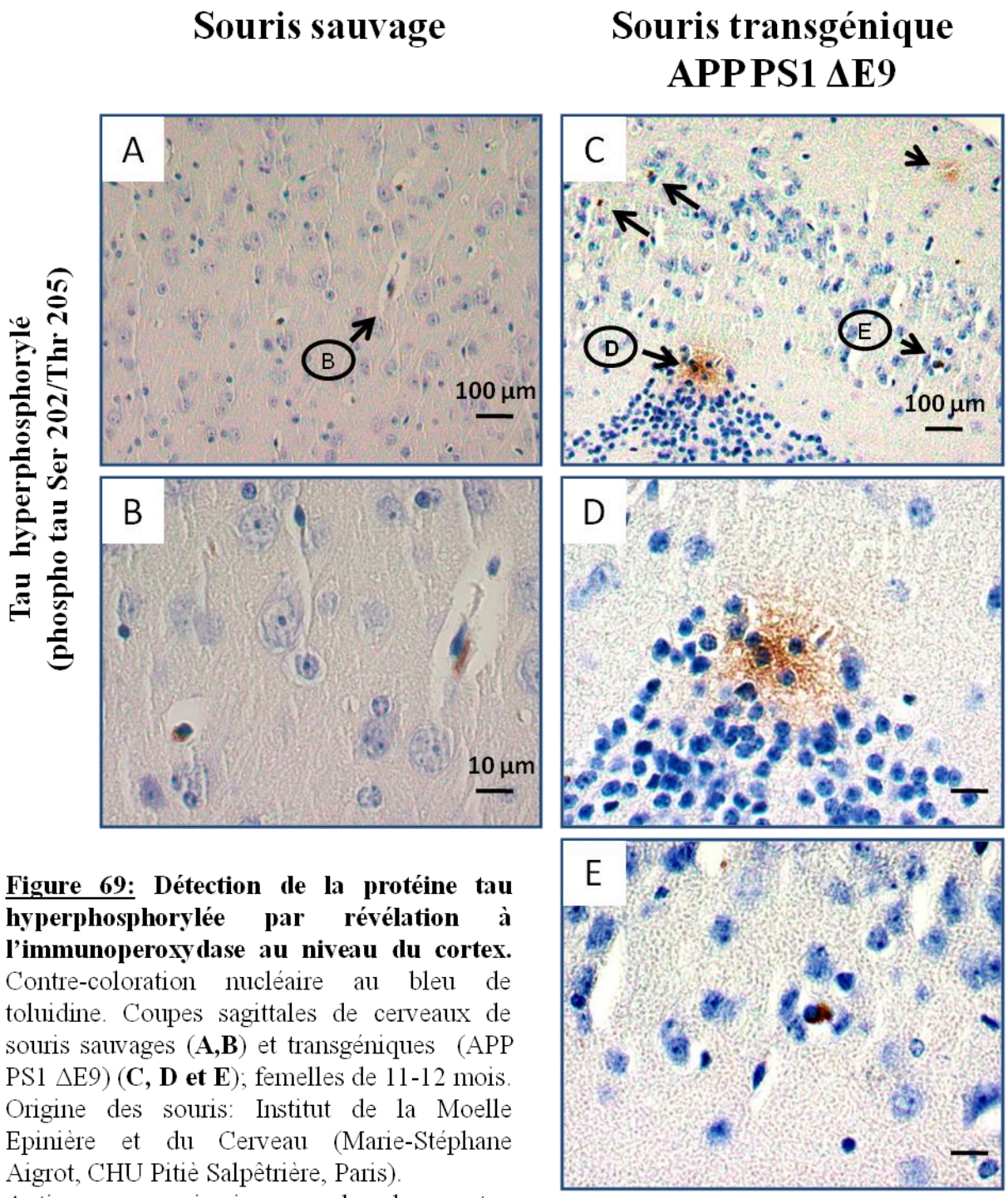


Figure 68: Détection de l'amyloïde β (Aβ) par révélation à l'immunoperoxydase au niveau du cortex. Contre-coloration nucléaire au bleu de toluidine. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A, B**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**C, D, E et F**); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
Anticorps primaire: Aβ (17-24), monoclonal de souris (Sig 39220, Covance),
Anticorps secondaire: chèvre anti-souris Ig HRP (P-0447, Dako),
Substrat: diaminobenzidine (K3467, Dako)
Les flèches indiquent des sites de plaques séniles.
Coupes de 5 µm d'épaisseur.



<u>Figure 69:</u> Détection de la protéine tau hyperphosphorylée par révélation à l'immunoperoxydase au niveau du cortex. Contre-coloration nucléaire au bleu de toluidine. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A,B**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**C, D et E**); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
Anticorps primaire: phospho tau Ser 202/Thr 205, monoclonal de souris (Thermo Scientific, MN1020)
Anticorps secondaire: chèvre anti-souris Ig HRP (P-0447, Dako)
Substrat: diaminobenzidine (K3467, Dako)
Les flèches indiquent les sites contenant de la protéine tau hyperphosphorylée.
Coupes de 5 µm d'épaisseur.

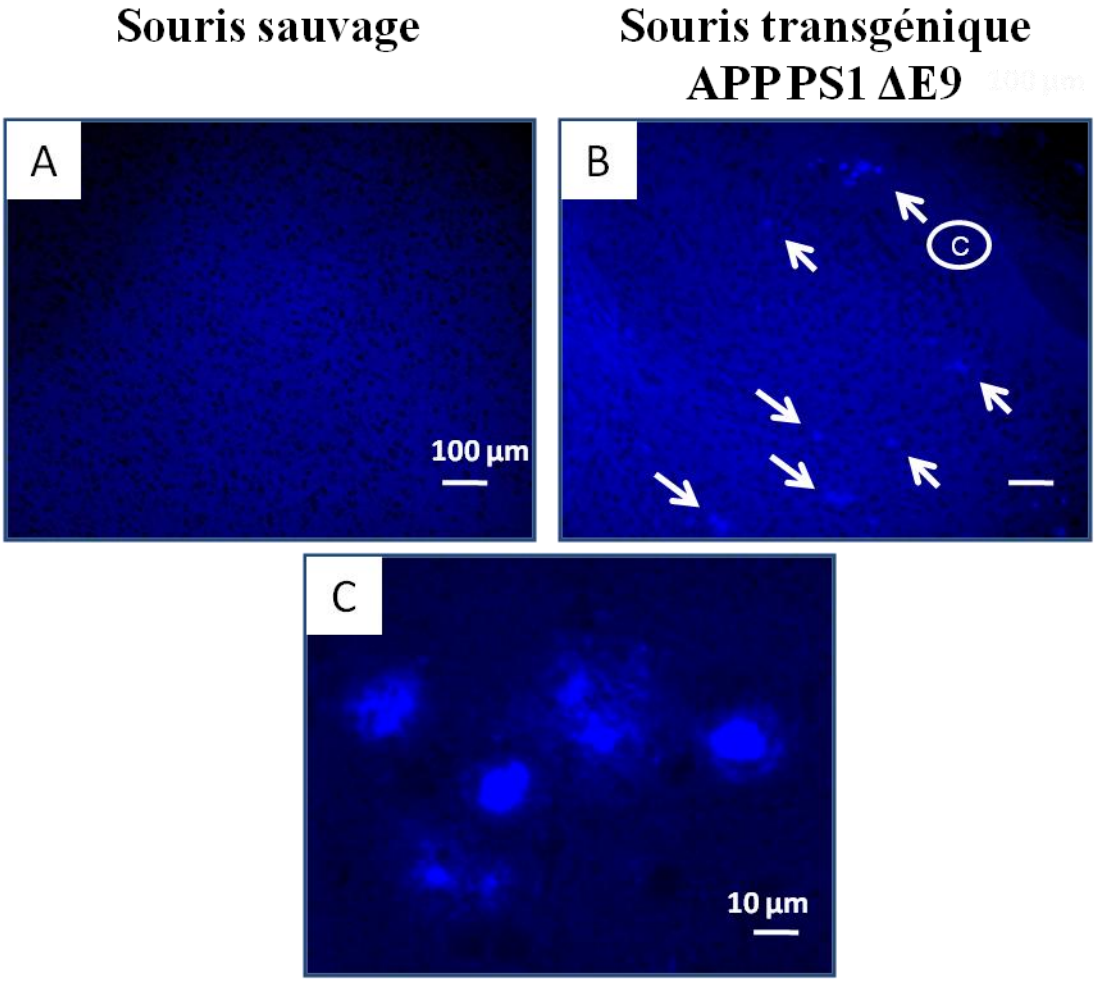
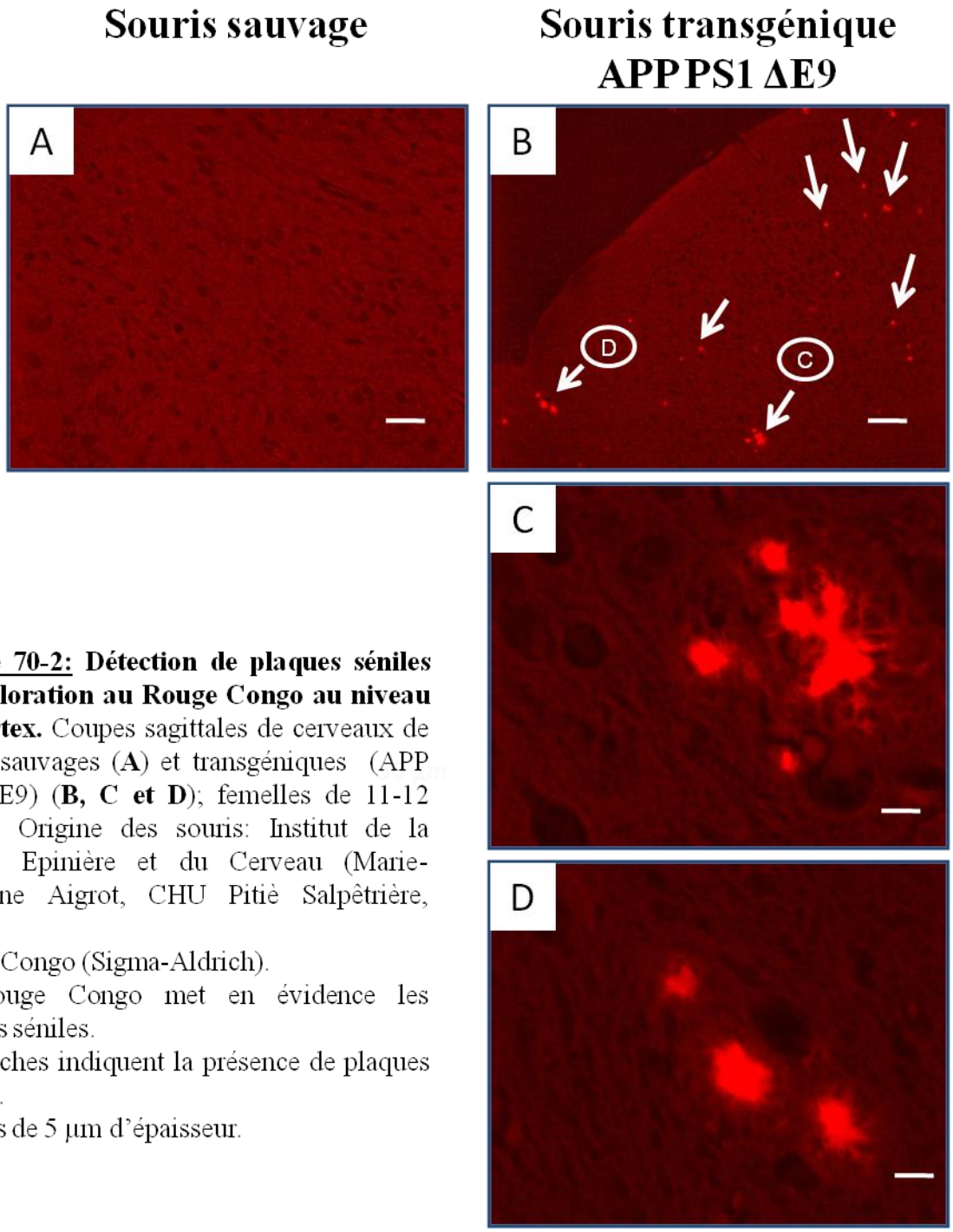


Figure 70-1: Détection de plaques séniles par coloration à la thioflavine T au niveau du cortex. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**B,C**); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
Thioflavine T (Sigma-Aldrich).
La Thioflavine T met en évidence les plaques séniles.
Les flèches indiquent la présence de plaques séniles.
Coupes de 5 µm d'épaisseur.



<u>Figure 70-2:</u> Détection de plaques séniles par coloration au Rouge Congo au niveau du cortex. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**B, C et D**); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
Rouge Congo (Sigma-Aldrich).
Le Rouge Congo met en évidence les plaques séniles.
Les flèches indiquent la présence de plaques séniles.
Coupes de 5 µm d'épaisseur.

2. Etude de marqueurs du peroxysome sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques

Des marqueurs associés à la quantité ou à la masse de peroxysomes (ABCD3) ainsi qu'à la β-oxydation peroxysomale (transporteur : ABCD1, ABCD2 ; enzymes : ACOX1, catalase) ont été recherchés sur coupes histologiques de cerveaux de souris. Au niveau des régions du cerveau (cortex, hippocampe), ABCD1 et ABCD2 ont la même distribution. Au niveau du cervelet, ABCD1 est essentiellement présent dans des cellules qui pourraient être des cellules de Purkinje alors qu'ABCD2 est surtout présent dans des cellules qui pourraient être des cellules de Bergmann (**Figures 71 et 72**). Il semblerait que l'expression d'ABCD3 et d'ACOX1 soit plus forte chez les souris sauvages comparativement aux souris transgéniques (**Figure 73**). Chez les souris transgéniques, ceci pourrait alors favoriser l'accumulation d'AGTLCs. En revanche, il semblerait que l'expression de catalase soit plus forte chez les souris transgéniques (**Figure 73**). Cette dernière pourrait être la résultante d'un stress oxydatif augmenté afin de s'opposer à une surproduction de peroxyde d'hydrogène. La distribution de l'expression de ses marqueurs peroxysomaux au niveau du cerveau de souris normales ou transgéniques a mis en évidence une expression importante dans le cervelet et en particulier au niveau de la zone granulaire riche en astrocytes et en cellules de Golgi et de la zone adjacente riche en cellules de Purkinje (**Tanaka et *al.*, 2008**). Par ailleurs, ces marqueurs peroxysomaux sont aussi très exprimés dans l'hippocampe ainsi que dans les zones adjacentes supérieures à ce dernier (corps calleux, gyrus cingulaire).

3. Etude de marqueurs des mitochondries sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques

Les mitochondries joueraient des rôles importants dans la MA (**Verri et *al.*, 2012**). Pour cette raison, ces organites ont été recherchés sur coupes histologiques sagittales. Le Mitotracker Red qui s'accumule dans des mitochondries fonctionnelles n'est pas adapté sur coupes histologiques et n'a pas permis de révéler ces organites. Comme alternative, la nonyl acridine orange colorant les cardiolipines (phospholipides spécifiques des membranes mitochondriales) a été utilisé. Avec ce fluorochrome, aucun signal n'a été détecté sur coupes histologiques déparaffinées. Pour identifier les mitochondries, le cytochrome c présent sur la face externe de la membrane interne de ces organites a donc été recherché par immunofluorescence indirecte (**Figure 74**). Dans ces conditions, par immunofluorescence

indirecte sur coupes histologiques de 5 µm, le cytochrome c a pu aisément être révélé. Aucune différence notable n'a été révélée entre souris normales et transgéniques.

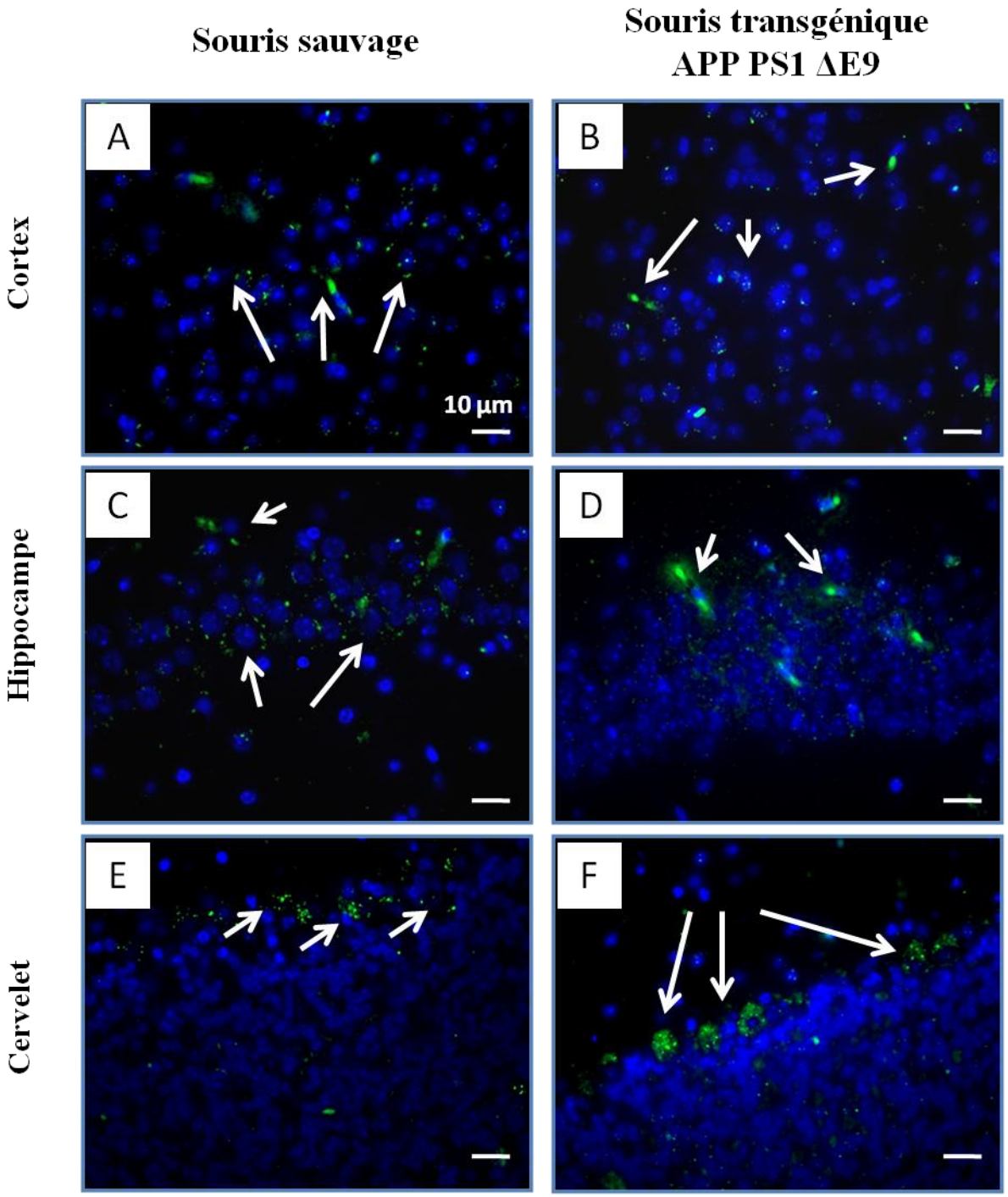


Figure 71: Expression de la protéine peroxysomale: ABCD1. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A, C et E**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**B, D et F**) ; femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
•Anticorps primaire: anticorps polyclonal de lapin anti-ABCD1 ;
(Drs Trompier/Savary/Lizard; #029);
•Anticorps secondaire: chèvre anti Ig de lapin couplée Alexa488 (A11034, Life Technologies).
Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342. Les flèches indiquent des cellules positives. Il pourrait s'agir de neurones, au niveau du cortex et de l'hippocampe et de cellules de Purkinje, au niveau du cervelet.
Coupes de 5 µm d'épaisseur.

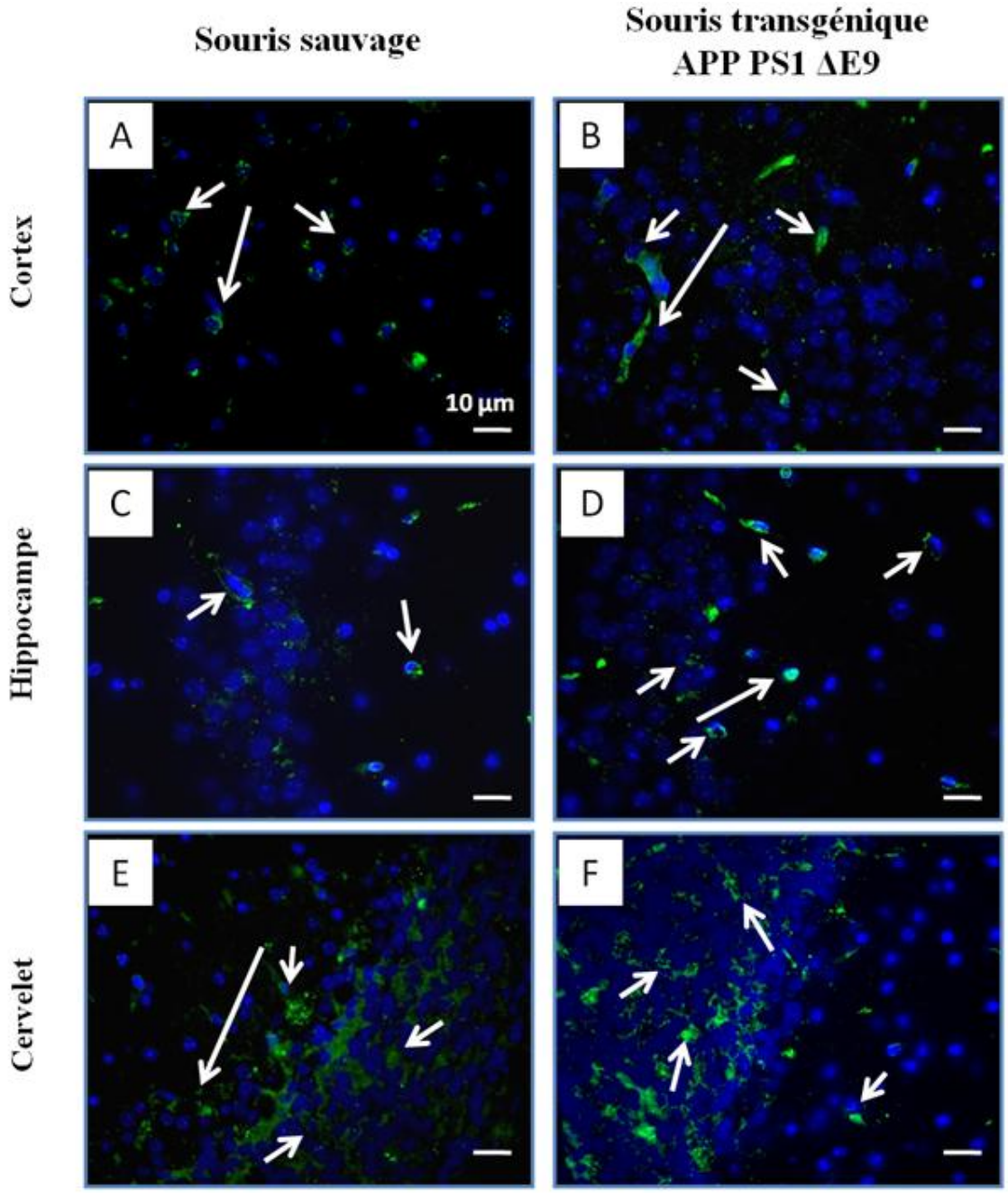


Figure 72: Expression de la protéine perxysomale: ABCD2. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A, C et E**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**B, D et F**); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
•Anticorps primaire: anticorps polyclonal de lapin anti-ABCD2 et IgG purifiées ; (thermofischer; PA4958);
•Anticorps secondaire: chèvre anti Ig de lapin couplée Alexa488 (A11034, Life Technologies).
Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342. Les flèches indiquent des cellules positives. Il pourrait s'agir de neurones, au niveau du cortex et de l'hippocampe et de cellules de Bergmann, au niveau du cervelet.
Coupes de 5 µm d'épaisseur.

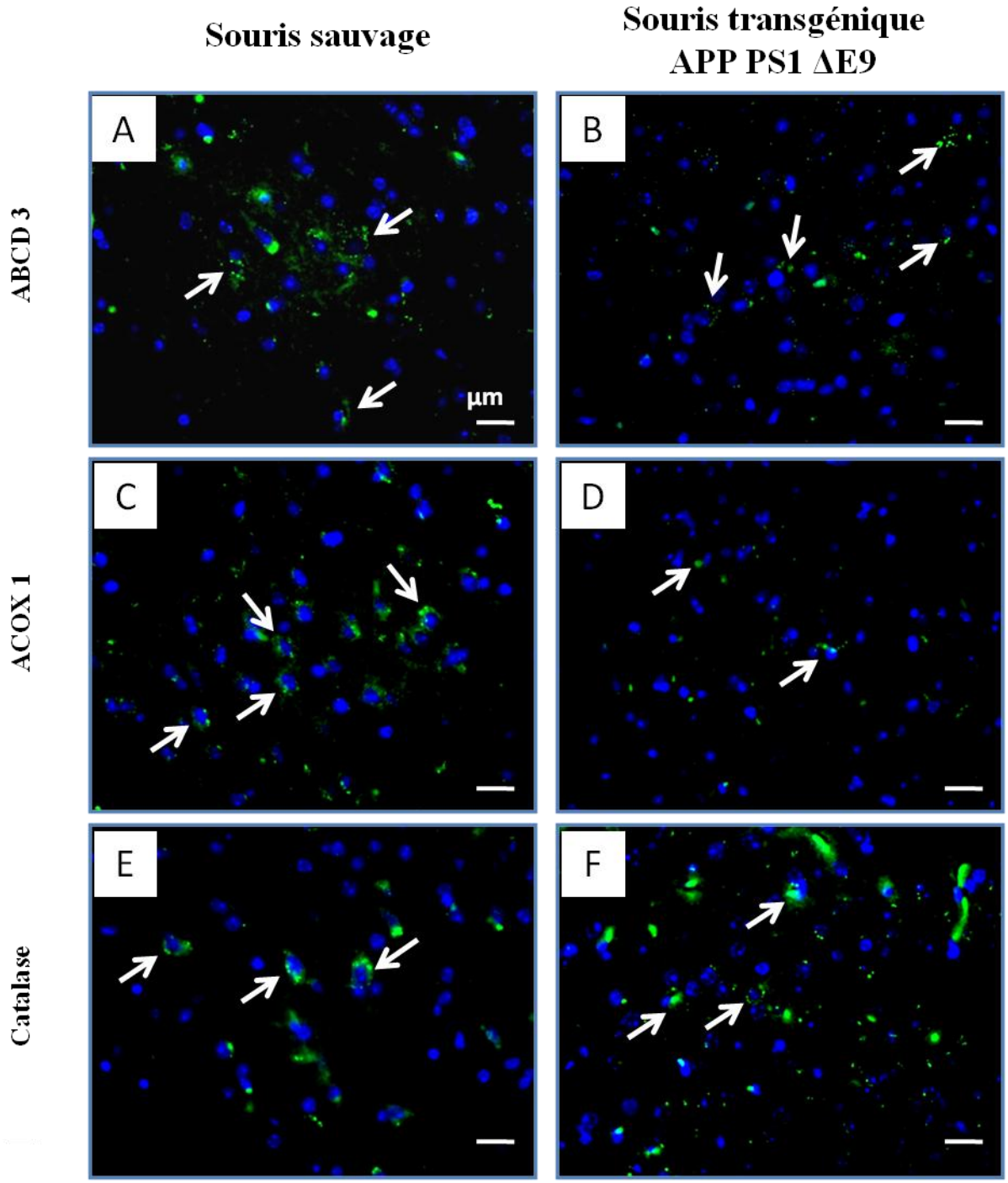


Figure 73: Expression de protéines peroxysomales: ABCD3, ACOX1 et catalase au niveau du cortex. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A,C et E**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**B, D et F**); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitiè Salpêtrière, Paris).
•ABCD3; anticorps primaire: anticorps polyclonal de lapin anti-ABCD3 (Drs Trompier D/ Savary S/Lizard G); Anticorps secondaire: chèvre anti-Ig de lapin couplée Alexa488 (A11034, Life Technologies).
•ACOX1; anticorps primaire: anticorps Polyclonal de lapin anti-ACOX1 (Dr Cherkaoui Malki M); Anticorps secondaire: chèvre anti -Ig de lapin couplée Alexa488 (A11034, Life Technologies).
•Catalase; Anticorps primaire: anticorps monoclonal de souris anti-catalase (Ab16771, Abcam); Anticorps secondaire: F0232 (Dako), anticorps polyclonal de lapin anti-Ig de souris couplé FITC.
Les flèches indiquent des cellules positives. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342.
Coupes de 5 µm d'épaisseur.

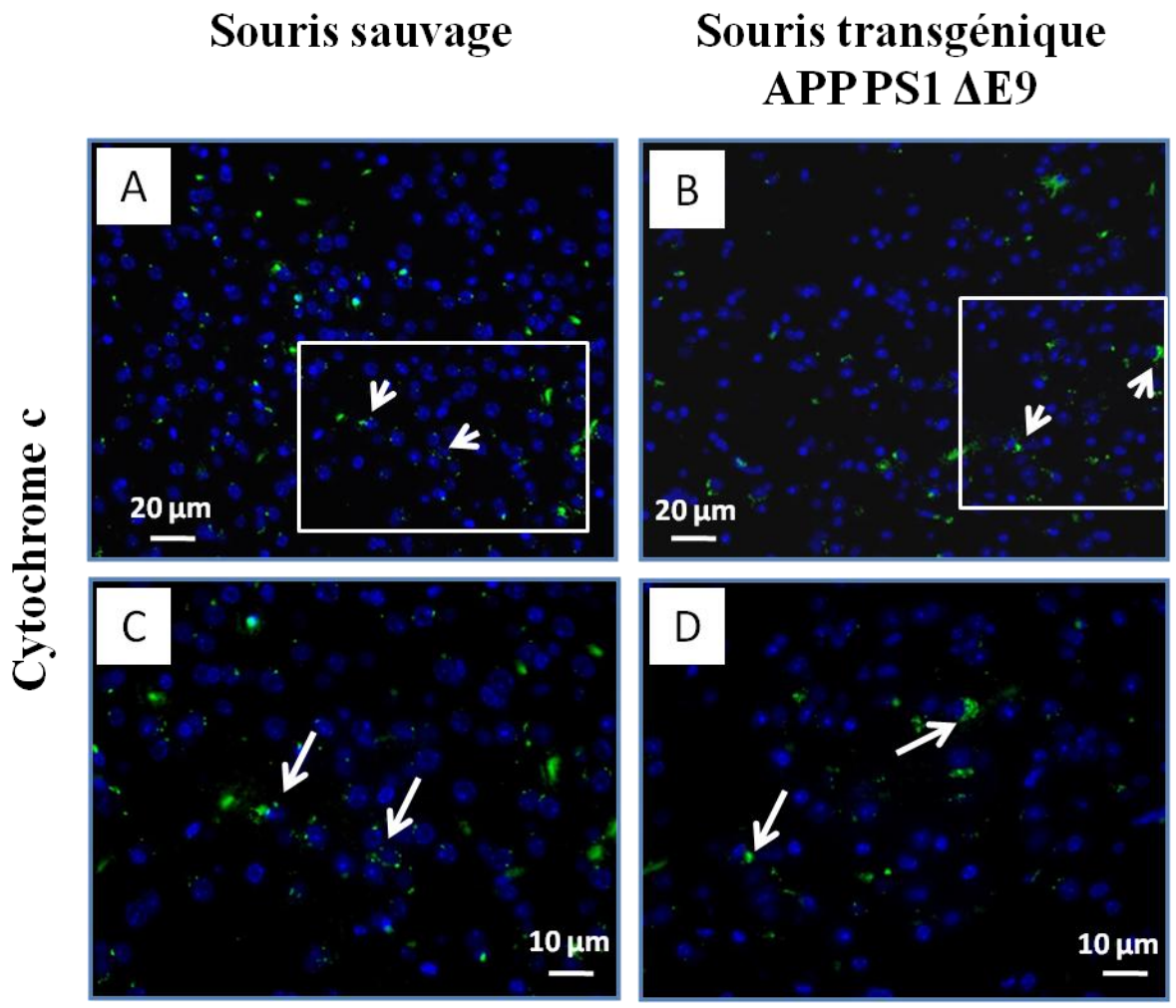


Figure 74: Expression de la protéine mitochondriale: cytochrome c. Coupes saggitales de cerveaux de souris sauvages (**A, C**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9) (**B, D**); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
•Cytochrome c; Anticorps primaire: anticorps de souris anti-cytochrome c (Pharmingen; 556433);
• Anticorps secondaire: anticorps polyclonal de lapin anti Ig de souris couplé FITC (DAKO; F0232);
Les figures **C** et **D** correspondent respectivement aux zones rectangulaires délimitées en **A** et **B**.
Les flèches indiquent des cellules positives. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342. Coupes de 5 µm d'épaisseur.

4. Etude de marqueurs des lysosomes sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques

Les dysfonctions du lysosome sous l'influence de facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques sont connues pour modifier l'activité mitochondriale (**Brunk et *al.*, 2002**). Pour caractériser les lysosomes, le LysoTracker Red a d'abord été utilisé. Ce dernier s'accumulant dans des lysosomes fonctionnels, il n'a pas permis de révéler ces organites. L'antigène de membrane lysosomale LAMP-1 a donc été recherché par immunofluorescence indirecte (**Figures 75**). Il semblerait que l'expression de LAMP-1 soit plus faible chez les souris transgéniques comparativement aux souris normales. Par ailleurs, la répartition de LAMP-1, périnucléaire chez les souris normales, semblent beaucoup plus aléatoire chez les souris transgéniques. Il existe donc des modifications d'expression et de topographie de LAMP-1 entre souris normales et transgéniques mais l'incidence de la nature des coupes et leurs épaisseurs sont à même de pouvoir modifier ces données.

5. Etude de marqueurs du cytosquelette sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques

Des modifications du cytosquelette sont associés à la MA. La désorganisation des microtubules est une conséquence de l'hyperphosphorylation de tau **(Latypova *et al.*, 2011)**. Il existe aussi une désorganisation de l'actine pouvant conduire à la formation de corps d'Hirono (Neuropathology et al., 2013)**.** Or, les peroxysomes et leurs activités semblent dépendre de leur interaction avec les microtubules **(Rapp *et al.*, 1996; Schrader *et al.*, 2000).** Par ailleurs, l'activité mitochondriale serait aussi dépendante de l'interaction de ces organites avec l'actine-F. Pour ces différentes raisons, il était important de préciser s'il était possible d'apprécier des modifications des microtubules et de l'actine sur coupes histologiques sagittales ; les neurofilaments, constituants du cytosquelette spécifiques des neurones, ont aussi été étudiés (**Figure 76**).

Par observation en microscopie à fluorescence conventionnelle, des modifications flagrantes de l'expression ou de la topographie des neurofilaments, des microtubules et de l'actine-F n'ont pas été détectées chez les souris transgéniques comparativement aux souris sauvages. Il est possible que cette absence de différence soit due à l'incidence des coupes. Des coupes transversales ou dorsales seraient peut-être à même de fournir de meilleurs résultats en raison de l'orientation des neurones.

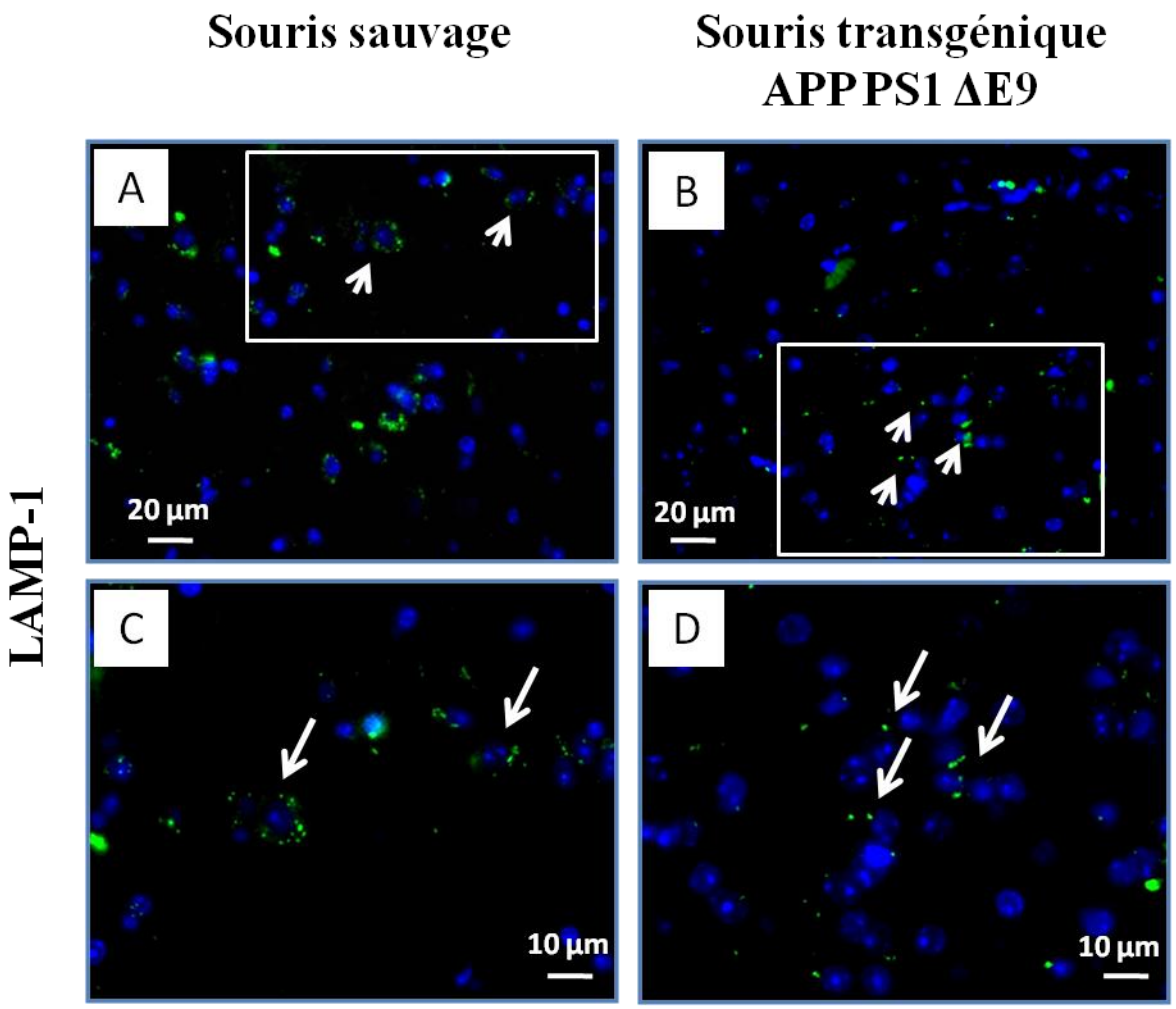


Figure 75: Expression de la protéine lysosomale: LAMP-1. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages et transgéniques (APP PS1 ΔE9); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
•LAMP-1; Anticorps primaire: anticorps polyclonal de lapin anti-LAMP-1 (Ab 24170, Abcam);
• Anticorps secondaire: chèvre anti-Ig de lapin couplée Alexa488 (A11034, Life Technologies).
Les figures C et D correspondent respectivement aux zones rectangulaires délimitées en A et B.
Les flèches indiquent des cellules positives. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342. Coupes de 5 µm d'épaisseur.

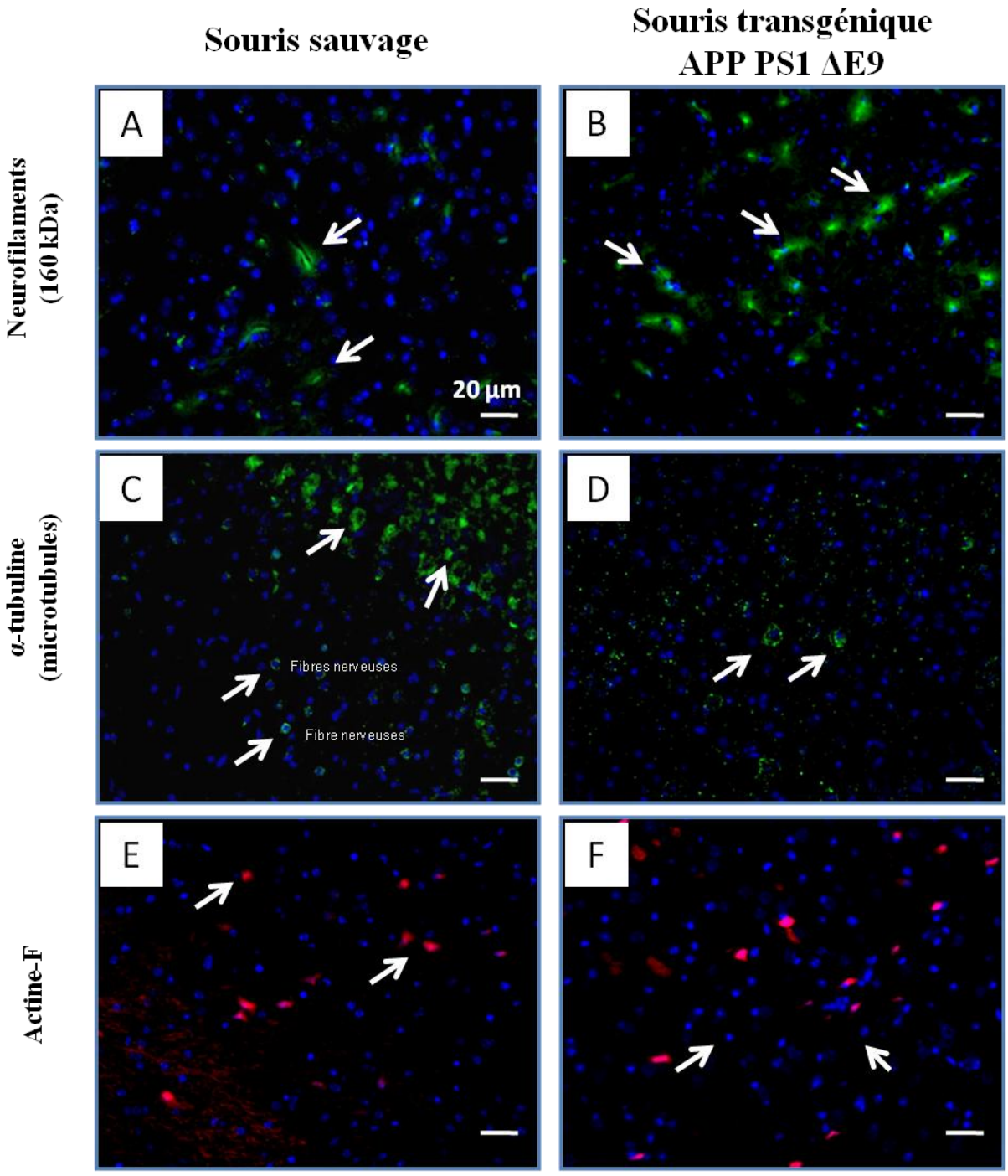


Figure 76: Expression de protéines du cytosquelette: neurofilaments, α-tubuline et Actine-F. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages et transgéniques (APP PS1 ΔE9); femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).

•Neurofilaments; anticorps primaire: anticorps monoclonal de souris anti-neurofilaments (160 kDa) (Ab7794, Abcam); Anticorps secondaire: F0232 (Dako), anticorps polyclonal de lapin anti Ig de souris couplé FITC.

•α-tubuline; anticorps polyclonal de lapin (Ab59680; Abcam); chèvre anti Ig de lapin couplée Alexa488 (A11034, Life Technologies).

•Actine-F: Rhodamine-Phalloïdine (77418; Sigma-Aldrich).

Les flèches indiquent des cellules positives. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342. Coupes de 5 µm d'épaisseur

6. Etude de la composition en acides gras et en phospholipides sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques

Sur coupes histologiques déparaffinées, les lipides neutres ont été recherchées à l'aide du Bodipy (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene ; Life Technologies, Réf D-3922) et les phospholipides à l'aide des LipidTox Red (Life Technologies, Réf H34476).

Un signal de fluorescence vert d'intensité variable a été observé avec le Bodipy et un signal de fluorescence rouge évoquant des plaques séniles a été révélé avec le LipidTox Red (**Figure 77**).

Les faibles signaux observés pourraient s'expliquer en raison du passage dans les solvants utilisés pour le déparaffinage qui extrait les lipides des tissus. Les signaux détectés pourraient éventuellement correspondre à des lipides non solubles dans les solvants, c'est-à-dire associés de façon covalente à des protéines. Les structures reconnues pourraient ainsi être des protéines carbonylées résultant de la réaction d'aldéhydes (produits de dégradation des lipides sous l'effet d'un stress oxydant souvent présent dans les maladies neurodégénératives) avec les résidus amines de protéines (Bases de Schiff) (**Grimsrud et *al.*, 2008)**. Au niveau des zones de l'hippocampe et du cervelet (zone granulaire), on peut noter la présence de zones intensément colorées en vert (lipides neutres) et en rouge (lipides polaires). Les cellules contenant ces phospholipides sont difficilement identifiables de façon non ambigüe selon des critères morphologiques.

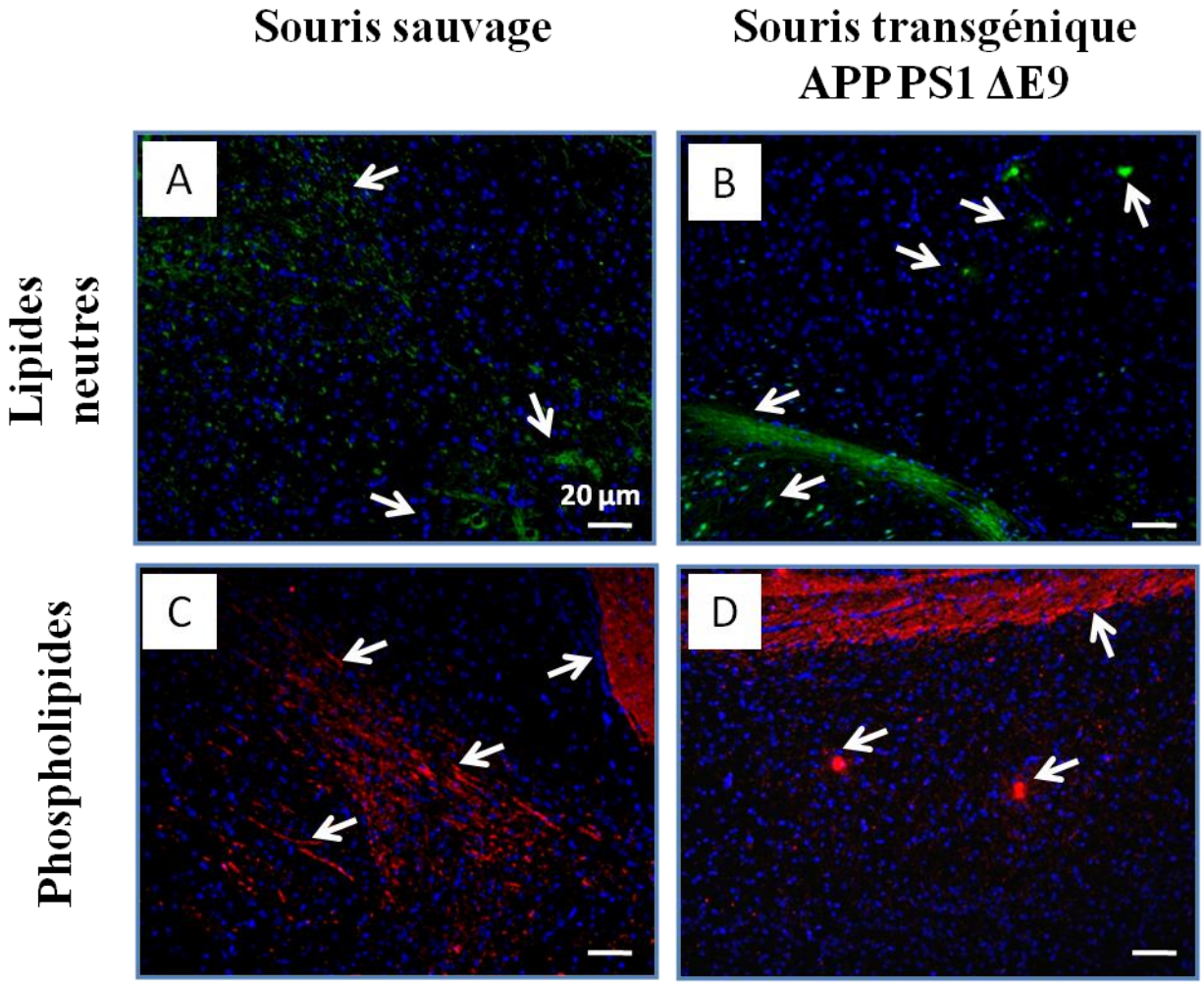


Figure 77: Détection de lipides neutres et de phospholipides par coloration respective au Bodipy et Lipid Tox Red. Coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (**A, C**) et transgéniques (APP PS1 ΔE9); (**B, D**) femelles de 11-12 mois. Origine des souris: Institut de la Moelle Epinière et du Cerveau (Marie-Stéphane Aigrot, CHU Pitié Salpêtrière, Paris).
•Lipides neutres: Bodipy (D-3922; Invitrogen)
•Phospholipides: Lipid Tox Red (H-34476; Invitrogen)
Les flèches indiquent des zones positives. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342. Les coupes colorées au Bodipy sont de 5 µm d'épaisseur. Les coupes colorées au Lipid Tox Red sont de 12 µm d'épaisseur.

7. Profil d'acides gras et de plasmalogène-C16 :0 dans le cerveau, le plasma et les érythrocytes de souris sauvages et transgéniques (APP PS1 ΔE9)

Les acides gras et les plasmalogènes ont été dosés par CPG/SM selon la méthode de **Takimoto (2003**). Des différences notables ont été mises en évidence au niveau du cerveau, du plasma et des érythrocytes entre souris sauvage (une souris) et transgénique (une souris APP PS1 ΔE9) (**Tableau 7**).

Pour évaluer le métabolisme lipidique peroxysomal, les paramètres choisis sont les suivants : C22:0, AGTLCs (C24:0 et C26:0), DHA (C22:6 n-3), acide phytanique et plasmalogène-C16:0. Les autres acides gras choisis n'intervenant pas dans le métabolisme peroxysomal sont les suivants : acide arachidonique (C20:4), acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5) et acide palmitique (C16:0).

Au niveau du cerveau, des modifications suggérant une diminution du métabolisme peroxysomal sont observées. Alors que les taux d'EPA sont pratiquement semblables entre souris sauvage et transgénique, une forte augmentation de C26:0 et d'acide phytanique est observée. Elle est associée à une diminution du DHA. Bien que les taux de plasmalogène ne soient pas exploitables, ces observations seraient en faveur d'une diminution du métabolisme peroxysomal cérébral dans sa globalité. Toutefois, paradoxalement, l'acide arachidonique dégradé par le peroxysome est diminué dans la souris transgénique. Le C22:0 est aussi diminué. En fonction de ces deux dernières constatations, il est possible d'envisager qu'une autre voie métabolique pourrait aussi être impliquée, à savoir celle faisant intervenir les élongases Elov1 et Elov4 qui permettent une synthèse de C24:0 et de C26:0 à partir de C22:0. Dans ces conditions, si ces élongases sont activées, les taux de C24:0 et de C26:0 peuvent aussi augmenter.

Cette hypothèse est transposable aux observations faites au niveau des érythrocytes dont les taux d'acides gras peuvent refléter soit le métabolisme peroxysomal dans les précurseurs de la lignée érythrocytaire (puisque les érythrocytes n'ont pas de peroxysomes), soit un stockage d'acides gras pour pallier à une augmentation plasmatique de C24:0 et de C26:0 transitoire ou chronique.

Les érythrocytes indiquent aussi des altérations du métabolisme peroxysomal. Le DHA est considérablement augmenté ce qui peut résulter d'un catabolisme de l'EPA dont le taux diminue. L'acide phytanique est consommé et le plasmalogène–C16:0 est augmenté. Ceci est plutôt en faveur d'une stimulation du métabolisme peroxysomal. En revanche, le

C24 :0 et le C26 :0 augmentent aussi fortement. Ce qui suggère également une stimulation des élongases Elov 1 et Elov 6.

Au niveau plasmatique, bien que l'EPA soit diminué suggérant qu'il est métabolisé, le C22:6 n'est pas augmenté mais réduit. En revanche, l'acide phytanique et le plasmalogène-C16:0 diminuent. Ceci est en faveur d'une réduction du métabolisme peroxysomal. Toutefois, il n'apparait pas d'accumulation d'AGTLCs, ni de C22:0 qui au contraire diminuent suggérant ainsi l'intervention simultanée d'élongases pouvant conduire à la synthèse puis à la dégradation de C22 :0, de C24 :0 et de C26 :0 par une autre voie que celle du peroxysome.

Ces résultats obtenus sur les cerveaux, le plasma et les érythrocytes de souris sauvages et transgéniques apportent un éclairage nouveau sur le métabolisme du C22:0 et des AGTLCs dans le cadre de la MA suggérant non seulement une perturbation du métabolisme peroxysomal mais aussi de la voie des élongases intervenant au niveau du réticulum endoplasmique.

Tableau 7 : *Profil d'acides gras et de plasmalogène-C16 :0 dans le cerveau, le plasma et les érythrocytes de souris sauvages et transgéniques (APP PS1 ΔE9)*

	Souris sauvage			***Souris transgénique***		
	Cerveau	***plasma***	***érythrocytes***	***Cerveau***	***plasma***	***érythrocytes***
C26-0	0,004	0,0106	0,001	0,006	0,002	0,0103
C25-0	0,042	0,4822	0,024	0,028	0,180	0,4408
C22-6	10,388	3,0016	0,114	4,999	1,956	2,4944
C24-0	1,646	0,3844	1,338	0,357	0,105	1,7860
C22-0	0,388	0,1823	0,356	0,288	0,054	0,5006
C20-5	1,061	2,0149	1,136	0,803	1,100	0,7042
C20-4	6,640	5,7311	5,518	3,831	4,957	5,4499
C16-0	19,333	3,0349	9,179	10,894	7,421	1,5592
Acide phytanique	0,026	0,0118	0,014	0,053	0,006	0,0064
Plasmalogène-C16:0	4,581	0,1044	0,086	4,075	0,030	0,1543

C. Etude clinique

Le nombre total des patients ayant consulté pour trouble cognitif était de 120. Le diagnostic de démence a été retenu chez 108 patients selon les critères DSM-IV. Les tests neuropsychologiques n'ont pas pu être faits que pour 44 patients en raison de la sévérité des troubles cognitifs ou du décès des patients. Ainsi, nous n'avons pu recruter que 64 patients.

Les patients de l'étude ont été répartis en sous groupes.

- Le premier sous groupe formé de 26 patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), diagnostiquée selon les critères NINCDS-ADRDA
- Le deuxième sous groupe comprend des sujets tous porteurs des signes en faveur d'une démence autres que la MA. Ce groupe est composé de 42 patients qui se répartissent selon le type de démence:
    - Démence vasculaire (n=17),
    - Autres démences : démence mixte (n=6), démence à corps de Lewy (n=3), démences fronto-temporales (n=8), Parkinson (n=2), hydrocéphalie à pression normale (HPN) (n=2).

Un groupe contrôle de 128 sujets appariés selon l'âge et le sexe avec le groupe malade a été constitué et utilisé.

I Caractéristiques démographiques de la population

1. Age et sexe

L'âge moyen des patients démens est de 71,8 ± 7,9 ans avec des extrêmes allant de 58 à 91 ans. Il est de 73 ans chez les patients atteints de la MA ou d'une démence vasculaire (DV) et de 71 ans chez les autres déments. Chez le groupe témoin, l'âge moyen est de 65,3 ± 10,9 ans avec des extrêmes allant de 50 à 93 ans.

L'âge moyen de début de symptomatologie est de 71 ans. Les troubles cognitifs ont débuté à un âge inférieur à 60 ans chez 12,5 % des patients. Chez 31,3 % des malades, l'âge de début de la symptomatologie est supérieur à 75 ans. La tranche d'âge de début des symptômes la plus touchée est celle comprise entre 65 et 74 ans avec 42,2 % des patients. Pour les patients atteints par la MA, la maladie débute majoritairement dans la tranche d'âge

comprise entre 65 et 74 ans. Pour les malades atteints d'une démence vasculaire, la maladie débute à un âge plus avancé (>75 ans) chez la majorité des patients (**Figure 78**).

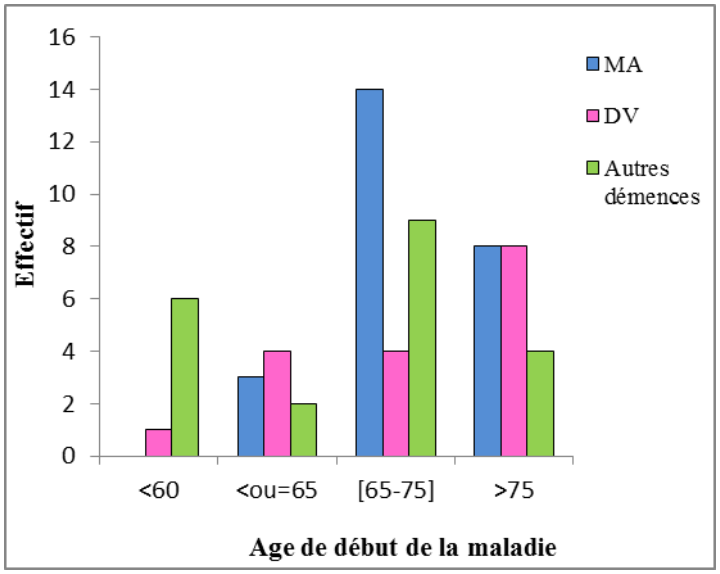


Figure 78: ***Répartition des démences selon l'âge (exprimé en années) de début de la symptomatologie.*** *MA : maladie d'Alzheimer ; DV : démence vasculaire.*

La répartition des malades et des témoins selon le sexe est présentée dans le **Tableau 8 .** Dans notre étude, une légère prédominance masculine est remarquée chez les MA et les autres démences. Cette dominance est plus marquée chez le groupe de démences vasculaires et ceci avec 14 hommes parmi 17 atteints d'une démence vasculaire.

Tableau 8: *Répartition des démences selon l'âge et le sexe*

	Alzheimer	***Démence vasculaire***	***Autres démences***	***Contrôles***
	N=25	***N=17***	***N=22***	***N=128***
Age (années)	73(60-83)	73(59-91)	71(58-86)	65(31-93)
Femme/Homme	12/13	3/14	13/9	60/68

2. Niveau d'instruction

La majorité des patients déments sont illettrés (64 %), prés du quart (23,4 %) des malades sont de niveau primaire. Seulement 6,3 % des malades ont un niveau secondaire et un niveau supérieur. Pour les sujets atteints de la MA, aucun patient ayant un niveau d'étude supérieur n'a été observé. De même, 16 parmi 25 MA sont illettrés et 7 sont de niveau primaire. Ces observations sont validées pour les malades atteints d'une démence vasculaire ou d'une autre démence **Figure 79**.

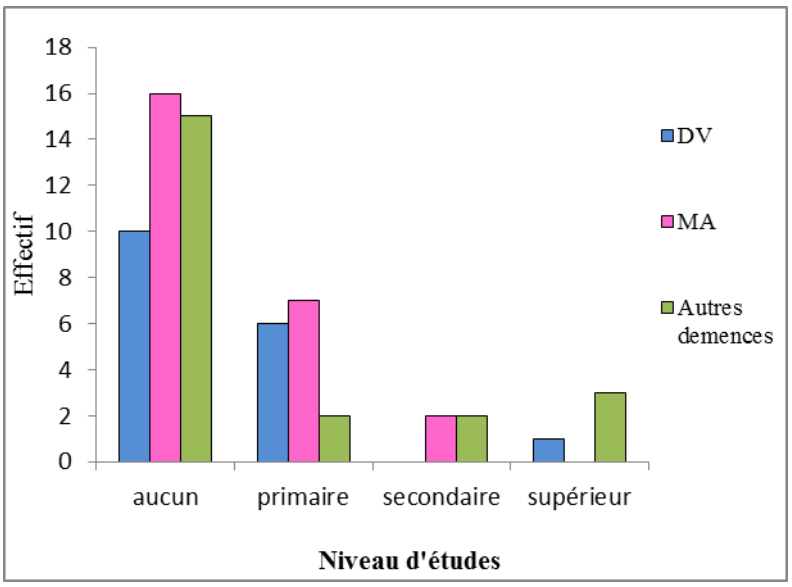


Figure 79: ***Répartition des démences selon le niveau d'instruction****. MA : maladie d'Alzheimer ; DV : démence vasculaire.*

3. Délai du diagnostic et dépendance cognitive

Le délai moyen du diagnostic était de 8 mois avec des extrêmes allant de 1 mois à 2 ans et demi. Dans 70 % des cas, le diagnostic de démence était retenu dans un délai inférieur à un an après la première consultation. Chez 2,5 % des patients le diagnostic n'était fait qu'après un délai de plus de deux ans.

A la première consultation, 52,5 % des malades étaient dépendants et ceci en tenant compte seulement des handicaps dus aux troubles cognitifs.

4. Antécédents familiaux de démence

Les antécédents familiaux de troubles cognitifs ont été constatés chez 31,1 % de la totalité des patients étudiés. Dans le groupe Alzheimer, ces antécédents ont été observés chez 36,3 % des patients et chez 45,5 % du groupe de patients ayant d'autres démences. Par ailleurs, chez le groupe des patients atteint d'une démence vasculaire, les malades ayant des antécédents familiaux ne présentent que 5% de la totalité des groupes.

5. Antécédents médicaux

L'hypertension artérielle est la pathologie la plus fréquente chez les patients déments avec une fréquence de 48,4 % suivie de la dyslipidémie (34,4 %), du diabète (18,7 %) et de l'accident vasculaire cérébral (17,2 %) (**Tableau 9**). Des antécédents de traumatisme crânien, de troubles psychiatriques ou de cardiopathie sont observées respectivement chez 10,9 ; 6,2 et 4,7 % de la totalité des sujets déments. Certains patients présentent multiples antécédents médicaux.

Tableau 9*: Répartition des patients déments selon le sexe et les antécédents médicaux*.

	Hommes	Femmes	Total
HTA	17	14	31 (48, 4%)
Dyslipidémie	10	12	22 (34, 4%)
Diabète	5	7	12 (18, 7%)
AVC	9	2	11(17, 2%)
Traumatisme crânien	5	2	7 (10, 9%)
troubles psychiatriques	2	2	4 (6, 2%)
Cardiopathie	2	1	3 (4, 7%)

AVC : accident vasculaire cérébral ; HTA : hypertension artérielle.

L'évaluation des traitements pris par les patients déments montre que 6,2 % des malades de la population étudiée étaient sous statines avant l'altération des fonctions cognitives malgré les facteurs de risques vasculaires associés. De plus, 8 % des malades Alzheimer et 11,8 % des malades atteints d'une démence vasculaire étaient sous statines.

6. Stades de sévérité de la démence

L'évaluation globale des fonctions cognitives et de la sévérité de la démence a été faite par le Test MMSE réalisé sur les malades. Le score moyen du test MMSE est de 14 ± 6 avec des extrêmes allant de 4 à 27. La répartition de la population des malades selon la sévérité de la démence est comme suit ; 25,37 % ont une démence légère (MMSE supérieur à 19), 58,2 % ont une démence modérée (MMSE compris entre 19 et 10) et 16,4 % ont une démence sévère (MMSE inférieur à 10). 53,84 % des patients Alzheimer souffrent d'une démence modérée,

Tableau 10: *Répartition de la population des déments étudiés selon le score MMSE.*

Score MMSE (*Sévérité de la démence*)	Alzheimer	Démence vasculaire	Autres démences
Légère [19-26]	4 (18 ,38%)	3 (17,64 %)	4(18,18%)
Modérée [10-19]	13 (53,84%)	10 (58,82%)	16 (72,72%)
Severe <10	8 (30,76%)	4 (23,52%)	2 (9,09%)

Le score MMSE varie suivant le niveau d'éducation (**Figure 80**). En effet, la majorité des patients atteints d'une démence modérée et sévère ont un niveau d'éducation faible. Par contre, pour les patients ayant un niveau d'éducation supérieur, la sévérité de la démence est légère ou modérée.

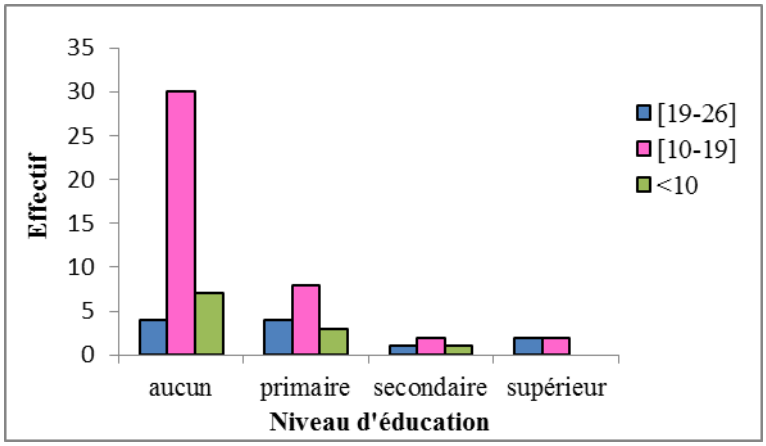


Figure 80 : *Répartition de la population des déments selon la sévérité de la démence et le niveau d'éducation.*

7. Habitudes de vie

L'évaluation des habitudes de vie (consommation d'alcool et tabagisme) des sujets de la population étudiée montrent que le pourcentage des patients déments consommant de

l'alcool est de 14,11 % alors qu'elle est de 5,32% seulement chez les contrôles. De même, le tabagisme est constaté chez 65,63 % de patients déments et 21,43 % des contrôles. L'association entre tabagisme et consommation d'alcool n'est rapportée que pour 6 malades soit 9,32% de la totalité des déments (**Tableau 11**)

Tableau 11*: Habitudes de vie chez les patients déments et les contrôles*

	Contrôles	Patients déments
Alcool (%)	5,32	14,11
Tabac (%)	21,43	65,63

8. Evaluation des symptômes dépressifs

En appliquant le test GDS (Geriatric Depression Scale) à 15 items, un syndrome dépressif est diagnostiqué chez 17,5% des patients déments.

II Etude des paramètres lipidiques et lipoprotéiques chez la population étudiée

1. les lipides sanguins

Les lipides sanguins (cholestérol, triglycérides, LDL, HDL…) sont mesurés en routine et constituent des biomarqueurs de plusieurs maladies. Des études épidémiologiques examinant l'association entre ces marqueurs et la démence ont rapporté des résultats contradictoires.

Ces paramètres mesurés dans le plasma des sujets appartenant à notre étude montrent certaines différences entre le groupe contrôles et le groupe déments. Chez les sujets contrôles, la triglycéridémie varie entre 0,49 et 1,96 mmol/L avec des valeurs moyennes légèrement plus élevées chez les femmes que les hommes (respectivement 1,22 ± 0,35 et 1,17 ± 0,33 mmol/L). Les valeurs moyennes de triglycérides plasmatiques augmentent chez les femmes atteintes d'une MA (1,27 ± 0,81 mmol/L) ainsi que chez les malades (hommes et femmes) ayant une démence vasculaire (1,24 ± 0,34 mmol/L) ou une autre démence (1,23 ± 0,41 mmol/L) avec une plus importante concentration chez les hommes.

Par ailleurs, le taux moyen de cholestérol plasmatique chez les contrôles est de 4,44 ± 0,76 mmol/L. Ce taux augmente en restant non significatif chez les malades Alzheimer et les malades atteints par d'autres démences. Des valeurs moyennes légèrement plus élevées sont observées chez les femmes des 3 groupes de malades (4,99 ± 1,97 mmol/L pour le groupe

MA ; 4,66 ± 1,3 mmol/L pour le groupe démence vasculaire ; 4,98 ± 0,96 mmol/L pour le groupe autres démences).

Les mesures du taux du LDL-C plasmatique montrent une augmentation du taux moyen chez les 3 groupes de malades comparativement aux contrôles. Cette augmentation est significative chez les MA et les malades atteints par d'autres démences. En effet, le taux moyens de 1,95 ± 0,57 mmol/L chez les contrôles passe à 2,43 ± 0,75 mmol/L chez les MA et à 2,47 ± 0,66 mmol/L chez les malades avec d'autres démences ($p<0.05$). Le taux moyen chez les malades atteints par une démence vasculaire est de 2,06 ± 0,91mmol/L.

Le taux moyen du HDL-C trouvé chez les contrôles est de 1,76 ± 0,56 mmol/L. La moyenne des valeurs du HDL–C est trouvée légèrement plus faible chez les MA et les malades atteints par une démence vasculaire (1,71 ± 0,6 mmol/L et 1,7± 0,4 mmol/L, respectivement) (**Tableau 12**). Les valeurs de HDL-C dans les groupes Alzheimer, démence vasculaire et autres démences sont plus élevées chez les femmes (**Tableau 12**).

Dans le groupe des MA, des corrélations négatives mais non significatives entre le score MMSE, indiquant la sévérité et le stade de l'atteinte par la démence, et les taux plasmatiques des triglycérides, du cholestérol et du LDL-C ont été trouvées (avec respectivement r= -0,182 ; r= -0.333 et r= -0,294).

Ces corrélations négatives ont été retrouvées dans le groupe des contrôles avec des valeurs respectives de r de -0,057 ; -0,047 et -0,039 pour les taux plasmatiques de triglycérides, de cholestérol et de LDL-C.

Tableau 12: *Taux moyens de lipides sanguins chez les malades déments des deux sexes et en fonctions*

Type de démences	***Alzheimer***			***Démence vasculaire***			***Autres démences***			***Contrôles***		
Sexe	***Homme***	***Femme***	***Total***	***Homme***	***Femme***	***Total***	***Homme***	***Femme***	***Total***	***Homme***	***Femme***	***Total***
HDL-C (mmol/l)	1,61 ± 0,50	1,88 ± 0,79	1,71 ± 0,61	1,62 ± 0,38	2,11 ± 0,32	1,70 ± 0,40	1,38 ± 0,29	2,01 ± 0,39	1,73 ± 0,47	1,79 ± 0,63	1,72 ± 0,41	1,76 ± 0,56
LDL-C (mmol/l)	2,47 ± 0,55	2,38 ± 1,04	2,43* ± 0,75	2,05 ± 0,92	2,13 ± 1,22	2,06 ± 0,91	2,49 ± 0,74	2,45 ± 0,63	2,47* ± 0,66	1,93 ± 0,55	1,98 ± 0,61	1,95 ± 0,57
Triglycérides (mmol/l)	1,09 ± 0,24	1,27 ± 0,81	1,16 ± 0,53	1,30 ± 0,32	0,92 ± 0,25	1,24 ± 0,34	1,32 ± 0,49	1,15 ± 0,32	1,23 ± 0,41	1,17 ± 0,33	1,22 ± 0,38	1,20 ± 0,35
Cholestérol (mmol/l)	4,57 ± 0,92	4,99 ± 1,97	4,74 ± 1,38	4,26 ± 1,30	4,66 ± 1,01	4,33 ± 1,23	4,47 ± 1,07	4,98 ± 0,96	4,75 ± 1,02	4,34 ± 0,85	4,59 ± 0,60	4,44 ± 0,76

*Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SD. Une différence significative entre les malades et les contrôles est indiquée par * P<0,05 (Test de Mann Whitney).*

2. Les apolipoprotéines plasmatiques

La moyenne des taux plasmatiques de l'apolipoprotéine AI (ApoAI), apolipoprotéine majeure des HDL, chez tous les patients déments ne diffère pas de celle des contrôles (contrôles : 1,39 ±0,30 ; patients déments : 1,38 ± 0,32 ; *P*> 0,05). En outre, la comparaison des taux de l'Apo-A1, chez les différents groupes déments ne montre pas de différences significatives entre elles et par rapport au contrôle (**Tableau 13**). De même, aucune différence du taux de l'Apo-B, apolipoprotéine majeure des LDL, entre les sujets contrôles et les déments n'a été observée (contrôles : 0,72 ± 0,24 ; DV : 0, 6 ± 0,29 g/L ; MA : 0,71± 0,14 ; autres démences : 0,71± 0,17).

Tableau 13*: Valeurs moyennes des taux des apolipoprotéines plasmatiques*

	Alzheimer	Démence vasculaire	Autres démences	Contrôles
Apo-A1 (g/L)	1,38 ± 0,43	1,38 ± 0,25	1,37 ± 0,259	1,39 ± 0,32
ApoB (g/L)	0,71 ± 0,14	0,60 ± 0,29	0,71 ± 0,17	0,72 ± 0,24

3. Indices d'athérogénicité dans la population étudiée

Les rapports d'athérogénicité (Cholestérol/HDL-C et/ou LDL-C/HDL-C) constituent un indice révélateur du risque vasculaire. Si le rapport Cholestérol/HDL-C est supérieur à 4,85 et le rapport LDL-C/HDL-C est supérieur à 3,55, le risque athérogène est important. De même, le calcul du rapport Apo-AI/Apo-B ainsi que le rapport du cholestérol des particules HDL et LDL et leur apolipoprotéines majeures peuvent renseigner sur l'athérogénicité du profil lipidique et lipoprotéique des patients.

Le calcul de ces rapports dans la population de sujets étudiés montre une légère variabilité entre le groupe contrôle et le groupe des patients ayant une démence. Une légère augmentation des rapports Cholestérol/HDL-C et LDL-C/HDL-C est observée dans le groupe MA et dans le groupe de patients ayant d'autres démences comparativement au groupe contrôle (**Tableau 14**). Ces rapports ne dépassent pas le seuil d'athérogénicité. Les rapports HDL-C/ApoAI, ApoAI/ApoB et LDL-C/ApoB ne montrent pas de différence significative entre les différents groupes.

Tableau 14: *Indices d'athérogénicité dans les différents sous groupes de déments comparativement au groupe contrôle*

	Alzheimer	***Démence vasculaire***	***Autres démences***	***Contrôles***
Cholestérol/HDL-C	2,79 ± 0,51	2,55±0,48	2,85± 0,61	2,66 ± 0,79
LDL-C/HDL-C	1,45 ± 0,42	1,21 ± 0,44	1,50 ± 0,48	1,25 ± 0,57
HDL-C/ApoA1	1,37 ± 0,39	1,22 ± 0,27	1,25 ± 0,24	1,23 ± 0,46
LDL-C/ApoB	3,75 ± 1,13	3,58 ± 1,06	3,60 ± 1,14	3,65 ± 1,11
ApoAI/ApoB	2,01 ± 0,71	2,81 ± 1,35	2,01±0,55	2,14 ± 0,83

III Etude d'autres paramètres biochimiques

La mesure de la glycémie chez les patients déments (DV et autres démences) montre une augmentation significative du taux du glucose sanguin comparativement au contrôle (DV : 9,05 mmol/L ; autres démences : 7,25 mmol/L ; contrôle : 5,89 mmol/L) (**Tableau 15**). En outre, une différence significative est observée en comparant la glycémie du groupe de patients atteints d'une démence vasculaire au groupe de patients atteint de MA.

Par ailleurs, le dosage d'un biomarqueur du bilan rénale, la créatinine sanguine, montre une augmentation significative chez le groupe de patients atteints d'une démence vasculaire alors qu'une diminution est observée chez les autres groupes comparativement aux contrôles (97,33 ± 46,97 µmol/L vs 81,92 ± 19,85 µmol/L chez les DV et contrôles, respectivement). Des différences significatives entre les sous-groupes de déments ont été révélées, en particulier en comparant le groupe de patients atteints d'une démence vasculaire au groupe de patients MA et au groupe de patients atteints d'autres démences (**Tableau 15**).

La mesure d'un autre marqueur du métabolisme rénale, l'urée, montre une diminution de son taux sanguin chez les différents sous groupes de patients déments comparativement au contrôle. Cette diminution est significative pour les 3 sous groupes tout en étant la plus marquée chez le groupe de patients atteints par une démence vasculaire. En effet, le taux moyen d'urée qui était de 5,96 mmol/L chez les contrôles passe à 4,10 mmol/L dans le groupe de patients atteints par une démence vasculaire. Aucune différence significative n'est remarquée en comparant l'uricémie des sous groupes de déments entre elles.

Tableau 15: *Paramètres biochimiques chez les différents groupes de déments et les contrôles*

	Alzheimer	*Démence vasculaire*	*Autres démences*	*Contrôles*
Glycémie (mmol/L)	5,98 ± 1,89*	9,05 ± 7,05*¶	7,25 ± 3,84*	5,89 ±2,11
Créatinine (µmol/L)	66,5±18,56	97,33 ± 46,97*¶	70,65 ± 21,94*#	81,92 ± 19,85
Urée (mmol/L)	4,97±2,42*	4,10±1,99*	4,19±2,03*	5,96±2,47

*La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par *,*
La différence significative entre DV et Alzheimer est indiquée par ¶,
La différence significative entre DV et autres démences est indiquée par #.

IV Evaluation des marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique et érythrocytaire dans différents types de démences

Puisque le stress oxydatif est considéré comme événement impliqué dans le déclenchement de la MA, une quantification des marqueurs du stress oxydatif (défenses antioxydantes et produits d'oxydation de certains constituants cellulaires (lipides, protéines)) a été réalisé sur le plasma et les érythrocytes (hémolysat) de patients déments et de sujets sains utilisés comme contrôles.

1. Mesure du taux de défenses antioxydantes au niveau plasmatique et érythrocytaire

Les résultats du dosage de l'activité des enzymes antioxydantes (Superoxyde Dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx) et catalase) au niveau érythrocytaire sont présentés dans le **Tableau 16.**

Tableau 16: *Activité catalytique des enzymes antioxydantes érythrocytaires SOD, GPx, et CAT chez les patients déments et chez les contrôles*

	catalase ***(U/mg de protéine)***	***GPx*** ***(U/mg de protéine)***	***SOD*** ***(U/mg de protéine)***
Contrôles	0,093 ± 0,104	13,251 ± 4,778	0,003 ± 0,0014
Patients déments	0,214 ±0,203*	2,710 ± 1,339**	0,0037± 0,0005*

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney. La différence significative entre contrôles et patients déments est indiquée par :: p<0,05, **: P<0,001; GPx : Glutathion peroxydase ; SOD : Superoxyde Dismutase. U $_{Catalase}$: µmoles H_2O_2/min; U $_{GPx}$: µmol de GSH oxydé/min*

La comparaison de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires mesurées dans le groupe contrôle et le groupe de patients déments montre des augmentations significatives de l'activité catalase et SOD chez les patients déments. Par ailleurs, une diminution hautement significative de l'activité GPx est révélée chez les patients déments comparativement aux contrôles (**Tableau 16**).

La comparaison de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires chez les 3 groupes de déments ne montre pas de différence significative intergroupe. En revanche, des différences hautement significatives sont observées en comparant l'activité GPx de chaque groupe à celle des contrôles. En effet, l'activité GPx qui était de 13,25 ± 4,78 U/mg de protéine chez les contrôles passe à 3,6 ± 1,50 ; 2,14 ± 1,64 et 2,13 ± 1,11 U/mg de protéine respectivement chez les groupes de patients MA, atteints d'une démence vasculaire ou par une autre démence (**Tableau 17**). Par ailleurs, une augmentation de l'activité catalase est observée dans les différents groupes de patients. Cette augmentation est significative chez les patients atteints par une démence vasculaire comparativement aux contrôles (**Tableau 17**).

Tableau 17: *Activité catalytique des enzymes antioxydantes érythrocytaires SOD, GPx, et CAT chez les patients déments et les contrôles.*

	Alzheimer	***Démence vasculaire***	***Autres démences***	***Contrôles***
GPx ***(U/mg de protéine)***	3,60 ± 1,50**	2,14 ± 1,64**	2,13 ± 1,11**	13,25 ± 4,78
SOD ***(U/mg de protéine)***	0,0036 ± 0,0004	0,003 ± 0,0004	0,004 ± 0,0007	0,0036 ± 0,0005
Catalase ***(U/mg de protéine)***	0,20 ± 0,23	0,24 ± 0,16*	0,19 ± 0,20	0,09 ± 0,104

*Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney. La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par * : P<0,05, ** : P<0,001. GPx : Glutathion peroxydase ; SOD : Superoxyde Dismutase.*

L'organisme assure ses défenses contre un stress oxydant en utilisant non seulement des enzymes antioxydantes mais aussi des molécules synthétisées par les cellules et capables de neutraliser les radicaux libres responsables du déclenchement d'un stress oxydant. Une mesure du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire et plasmatique a été réalisée chez les patients et les contrôles. Les résultats des dosages présentés dans le **Tableau 18**, montrent une augmentation significative du taux de GSH érythrocytaire par rapport aux contrôles. Par ailleurs, une diminution du GSH plasmatique s'est révélée significative en comparant les taux chez les contrôles à ceux trouvés chez les patients déments des différents groupes. En effet, le taux qui était de 0,11 mg/mL/mg de protéine chez les contrôles passe à 0,049 ; 0,064 et 0,045 mg/mL/mg de protéine chez le groupe de MA, de malades atteints par une démence vasculaire ou d'une autre démence. Aucune différence significative n'est observée en comparant les différents sous groupes de patients déments.

Tableau 18: *Taux du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire et plasmatique chez les patients déments et les contrôles.*

	GSH plasmatique (mg/ml/mg de protéine)	***GSH érythrocytaire (mg/ml/mg de protéine)***
Alzheimer	0,049± 0,028**	0,0015 ± 0,001**
Démence vasculaire	0,064 ± 0,096**	0,00147 ± 0,00088**
Autres démences	0,045 ± 0,019**	0,0017 ± 0,0024**
Contrôles	0,11 ± 0,064	0,0005 ± 0,0002

*Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney. La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par **. (**: P<0,001)*

2. Evaluation des marqueurs de la peroxydation lipidique et des protéines carbonylées au niveau plasmatique et /ou érythrocytaire

Un déficit de la réponse antioxydante induit divers dommages qui peuvent affecter toutes les composantes de la cellule. Un dosage des produits de l'oxydation des lipides et des protéines a été réalisé au niveau du plasma et/ou des érythrocytes de patients atteints par une démence ainsi que chez les sujets contrôles. Les résultats des dosages présentés dans les **Tableaux 19** montrent une augmentation significative des taux plasmatiques et érythrocytaires de malondialdéhyde (MDA) dans les différents sous-groupes de patients déments comparativement au contrôle.

Au niveau érythrocytaire, le taux moyen de MDA qui était de 9561,87 nmoles/mg de protéine passe à 13770,75 ; 15773,05 et 13527,46 nmoles/mg de protéine, respectivement chez les MA, les patients atteints d'une démence vasculaire ou d'autres démences.

Au niveau plasmatique, le taux moyen de MDA chez les contrôles était de 160,72 ± 64,42 et passe à 203,61 ± 77,89 ; 226,93 ± 64,62 et 194,31 ± 79,50 nmoles/mg de protéine respectivement chez les MA, les patients atteints d'une démence vasculaire ou d'une autre démence. Les taux moyens de MDA érythrocytaire sont à peu prés 10 fois plus élevés que les taux plasmatiques.

De même, des taux plus importants de dienes conjugués au niveau érythrocytaire sont observés chez les patients (MA, DV et autres démences). En effet, la valeur moyenne des dienes conjugués érythrocytaires qui était de 128,43 ± 89,40 µmol d'hydroperoxydes /mg de protéine chez les sujets contrôles, passe à 201,80 ± 130,84 ; 225,04 ± 163,88 et 206,43 ± 127,44 µmol d'hydroperoxydes /mg de protéine respectivement chez les MA, les patients atteints d'une démence vasculaires ou d'une autre démence (**Tableau 19**). Au contraire, au niveau plasmatique, les taux moyens des dienes conjugués chez les patients déments diminuent de façon significative comparativement au contrôle (**Tableau 20**).

Par ailleurs, le taux des protéines carbonylées, indiquant la présence de protéines modifiées, résultant de la réaction d'aldéhydes issus de produits de la peroxydation lipidique avec les résidus amines des protéines, a été mesuré au niveau érythrocytaire chez les patients déments et les sujets contrôles (**Tableau 19**). Une augmentation significative de la carbonylation des protéines est observée en comparant le groupe contrôle aux sous groupes de déments atteints par une démence vasculaire ou par une autre démence. Aucune différence significative du taux des protéines carbonylées érythrocytaires n'est observée chez le sous groupe de MA comparativement au groupe contrôle.

3. Evaluation de l'ampleur du stress oxydant selon la sévérité de la démence

La sévérité de l'atteinte par une démence semble corrélée avec l'installation d'un stress oxydant identifié grâce à la mesure de marqueurs du stress.

- *Relation activité catalase –sévérité des démences*

En effet, une nette augmentation de l'activité catalase est observée dans les différents stades de démences. Cette augmentation est plus marquée chez les patients ayant une démence légère (MMSE entre 19 et 26). Elle est moins importante en fonction de la sévérité de la démence (**Figure 81A**).

L'activité catalase érythrocytaire chez les patients atteints par une démence légère varie selon le type de démence ; les malades MA présentent une activité enzymatique catalase plus importante comparativement aux autres sous groupes de déments (**Figure 81B**). Aux stades les plus avancées de la démence, l'activité catalase est semblable pour les 3 sous groupes de patients déments.

Tableau 19 : *Taux des marqueurs de peroxydation lipidique et de protéines carbonylées érythrocytaires dans les différents sous-groupes de déments et dans les contrôles*

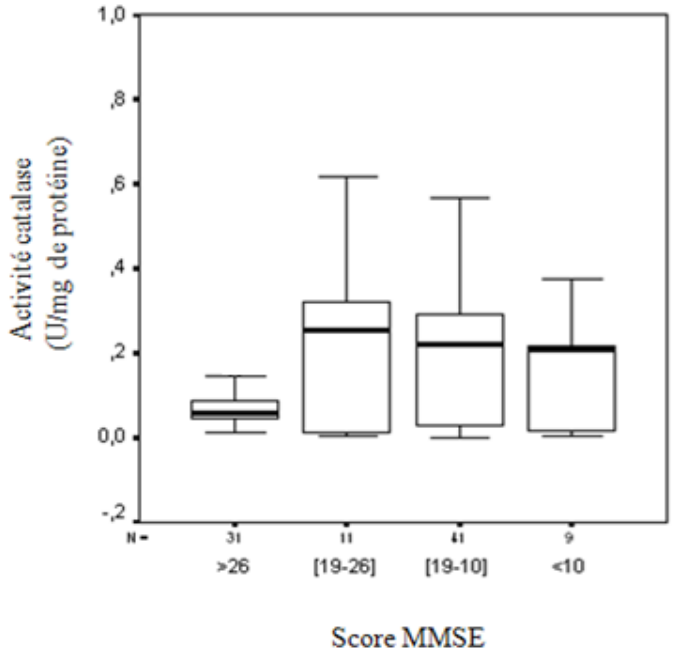
	Alzheimer	***Démence vasculaire***	***Autres démences***	***Contrôles***
MDA (nmoles/mg de protéine)	13770,758 ± 5728,89*	15773,05 ± 5748,38*	13527,46 ± 5532,55*	9561,87 ± 5448,11
protéines carbonylées (nM de carbonyles /mg de protéine)	3,648E-05 ± 1,10E-05	9,08E-05 ± 1,69E-05*	4,31E-05 ± 1,15E-05*	3,65E-05 ± 9,01E-06
Dienes Conjugué (µmol d'hydroperoxydes /mg de protéine)	201,80 ± 130,84*	225,04 ± 163,88*	206,43 ± 127,44*	128,43 ± 89,40

*Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. L'analyse des données a été faite par le test Mann Whitney. La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par *. (* : P<0,05).*

Tableau 20: *Taux de marqueurs de peroxydation lipidique et de protéines carbonylées plasmatiques dans les différents sous-groupes*

	Démence vasculaire	***Alzheimer***	***Autres démences***	***Contrôles***
MDA (nmoles/mg de protéine)	203,61± 77,89*	226,93 ± 64,62**	194,31 ± 79,50	160,72 ± 64,42
Dienes Conjugué (µmol d'hydroperoxydes/mg de protéine)	149,82 ± 56,85*	168,55 ± 52,78*	160,32 ± 58,84*	264,76 ± 241,28

A)



B)

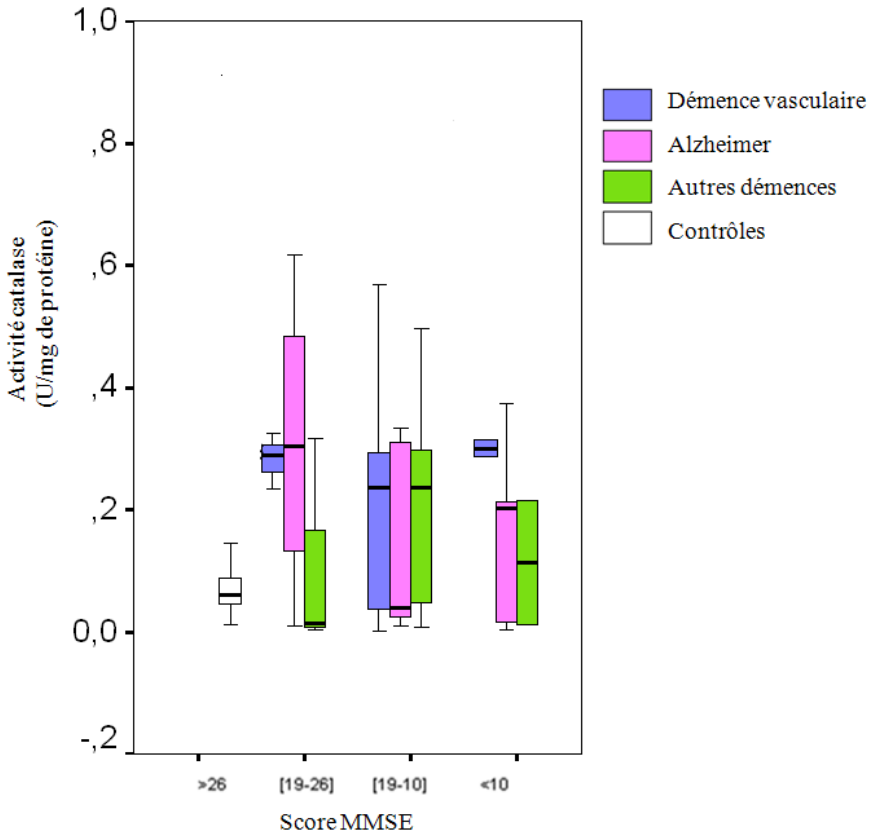


Figure 81: *Evaluation de l'activité catalase érythrocytaire en fonction de la sévérité et du type de démence* ***A)*** *répartition selon le score MMSE (Contrôle >26 ; démence légère [19-26] ; démence modérée [10-19]; démence sévère <10).* ***B)*** *répartition selon le type de démence et le score MMSE.*

- *Relation activité GPx –sévérité des démences*

Une diminution de l'activité GPx érythrocytaire est observée chez les patients à différents stades de démence comparativement au groupe contrôles. La répartition des valeurs moyennes de l'activité GPx érythrocytaire selon la sévérité et le type de démence montre de légères variabilités de cette activité entre les sous groupes de déments ainsi qu'entre les individus du même groupe (**Figure 82A**). En revanche, le sous-groupe des patients atteints par une MA sévère (MMSE<10) présente une activité GPx plus importante par rapport au patients ayant une autre démence au même degré de sévérité (**Figure 82A**).

Par ailleurs, la mesure de l'activité GPx au niveau plasmatique montre une diminution de l'activité antioxydante de cette enzyme dans les patients déments à l'exception du groupe patients atteints par une autre démence pour lesquels une grande variabilité intergroupes est remarquée. La réduction de l'activité GPx est plus marquée chez les patients MA comparativement aux patients atteints par une DV et elle est fonction du score MMSE (**Figure 82B**).

Relation activité SOD –sévérité des démences

La répartition de l'activité SOD érythrocytaire en fonction du score MMSE ne révèle pas de différence notable entre les stades de démence chez les MA ainsi que chez les autres démences (résultats non montrés).

- *Relation MDA –sévérité des démences*

Chez les patients déments dont les MA, les concentrations érythrocytaires et plasmatiques de MDA augmentent progressivement en fonction du stade de la démence. Cette augmentation semble plus importante pour les patients à des stades précoces de la démence (**Figure 83 A et B**).

- *Relation GSH –sévérité des démences*

Les concentrations érythrocytaires et plasmatiques du GSH diminuent dans les différents types de démences. Le stade de l'atteinte par la démence semble ne pas avoir d'effet notable sur les concentrations périphériques en GSH (**Figure 84 A et B**).

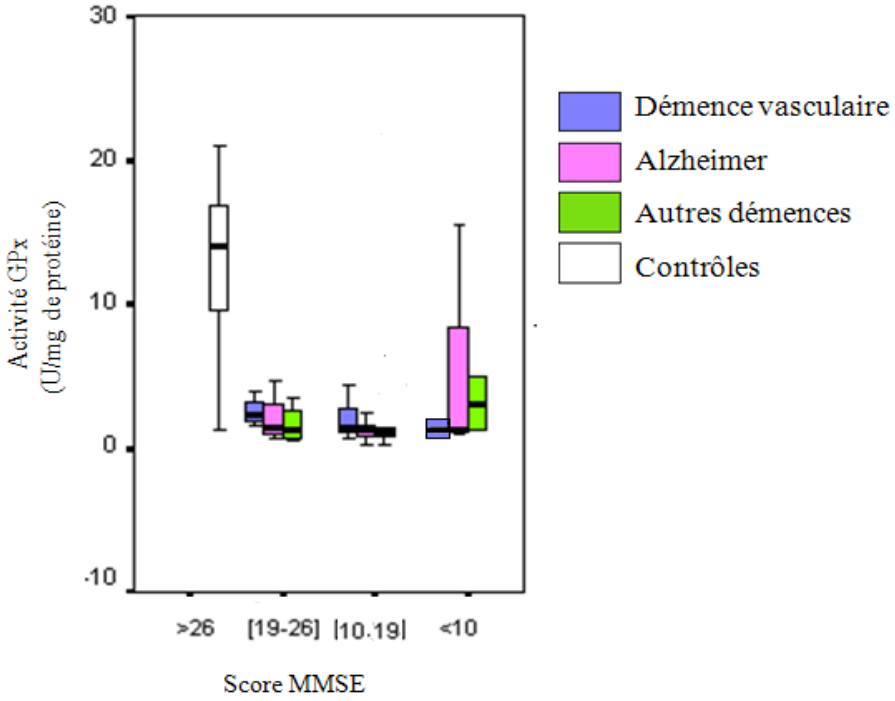
- *Relation diènes conjugués –sévérité des démences*

La mesure de la concentration des diènes conjugués au niveau érythrocytaire révèle une augmentation de leur taux chez les différents patients déments étudiés. Cette augmentation est fonction du stade de la démence. En revanche, au niveau plasmatique la sévérité de l'atteinte par une démence ne semble avoir aucune influence sur la concentration des diènes conjugués.

Dans le groupe des patients MA, les enzymes antioxydantes et le GSH ainsi que les marqueurs de l'oxydation lipidiques et protéiques sont corrélés Ainsi, au niveau érythrocytaire, le taux du MDA est corrélé faiblement avec l'activité des enzymes antioxydantes SOD, GPx et catalase avec des valeurs respectives du coefficient de corrélation r de 0,25 ; 0,168 et 0,111. Au niveau erythrocytaire, le taux de MDA est significativement corrélé avec l'activité GPx plasmatique. Des corrélations négatives ont été observées au niveau érythrocytaire entre le taux de diènes conjugués, le taux de GSH et l'activité SOD (avec respectivement r = -0,422 ; r = -0,581). Le taux de GSH érythrocytaire est corrélé positivement avec le taux de MDA plasmatique, le taux de protéines carbonylées et l'activité SOD érythrocytaire avec des coefficients de corrélation respectifs r de 0,469 ; 0,114 et 0,206.

Par ailleurs, certaines corrélations ont été trouvées au niveau plasmatique. Le taux de MDA plasmatique est corrélé significativement avec l'activité antioxydante du GPx plasmatique (r = -0,512), il est faiblement corrélé avec le taux plasmatique de GSH (r =-0,027). Une corrélation positive entre MDA et diènes conjugués plasmatiques s'est révélée significative chez le groupe des patients MA (r = 0,239).

A)



B)

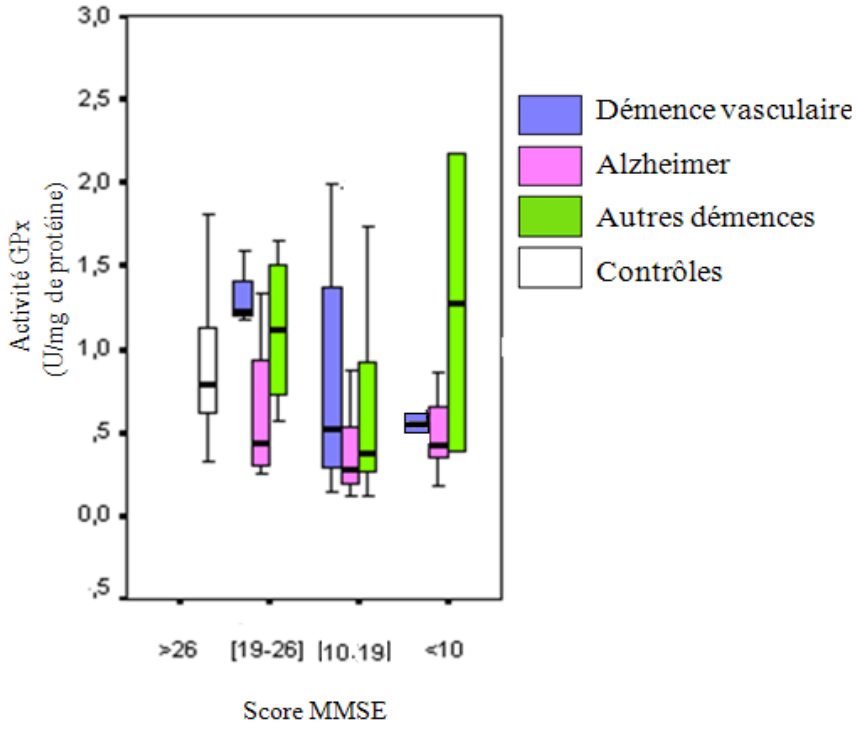
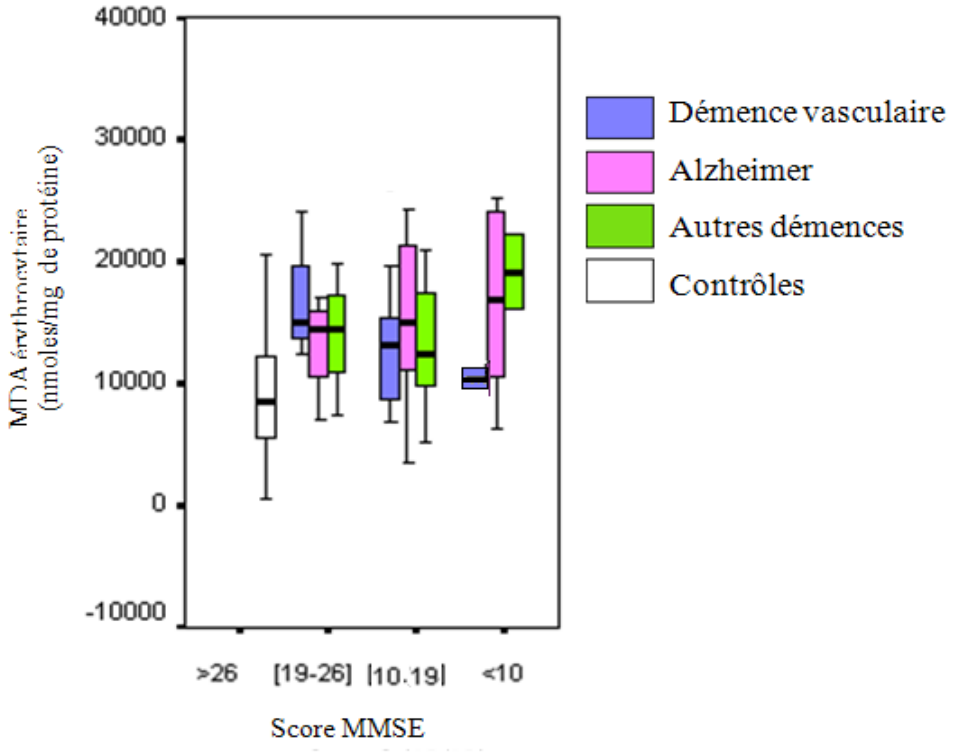


Figure 82: *Répartition de l'activité GPx en fonction de la sévérité (score MMSE) (Contrôle >26 ; démence légère [19-26] ; démence modérée [10-19]; démence sévère <10) et du type de démence :* ***A)*** *Activité GPx érythrocytaire* ***B)*** *Activité GPx plasmatique.*

A)



B)

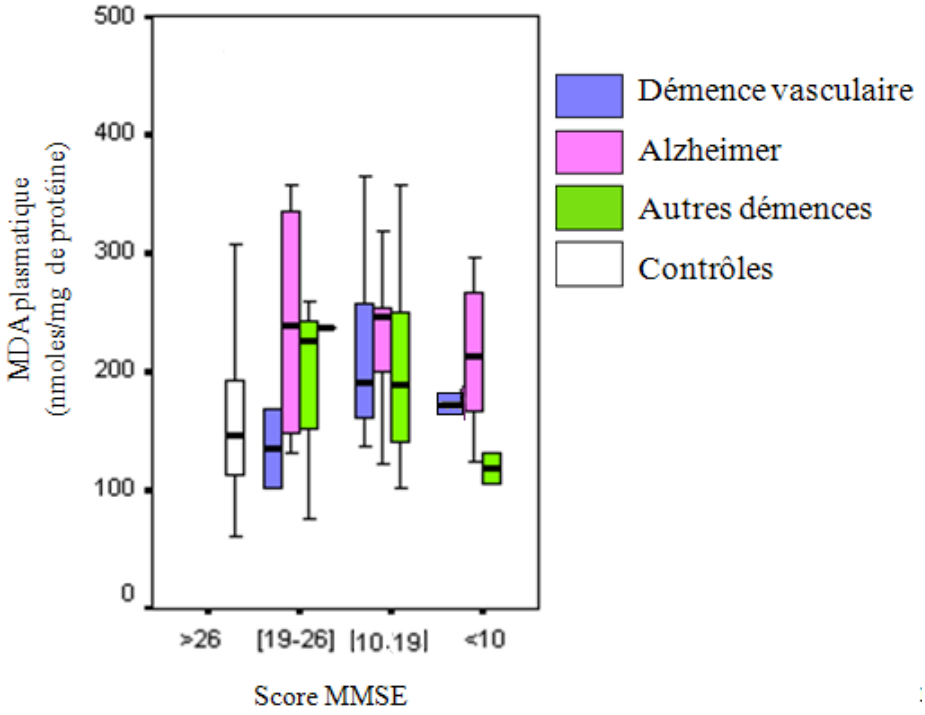
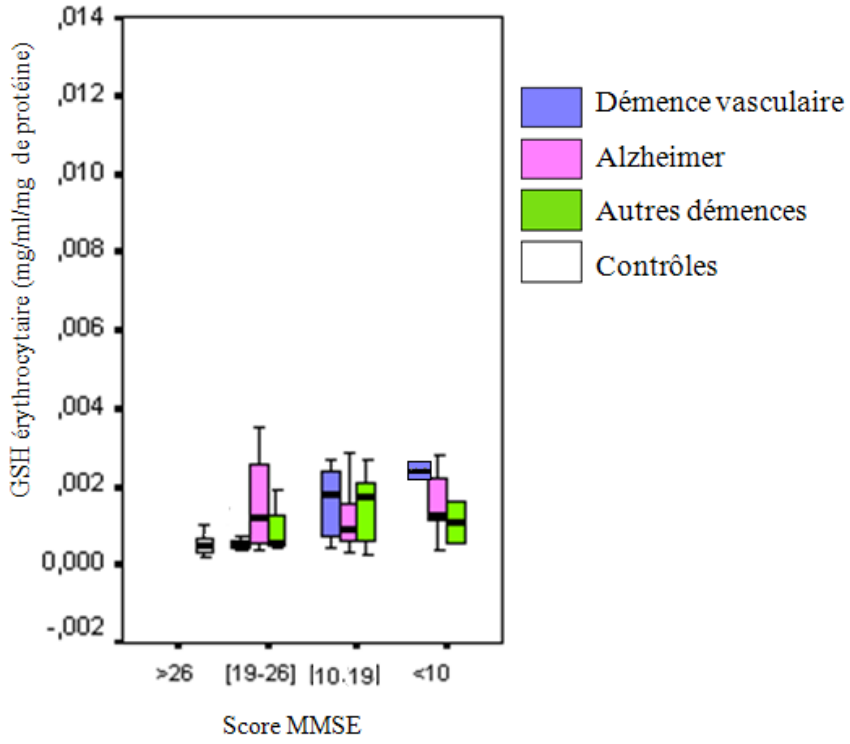


Figure 83: *Répartition du taux de MDA en fonction de la sévérité (score MMSE) (Contrôle >26 ; démence légère [19-26] ; démence modérée [10-19]; démence sévère <10) et du type de démence et du type de la démence.* ***A)*** *Taux de MDA érythrocytaire;* ***B)*** *Taux de MDA plasmatique.*

A)



B)

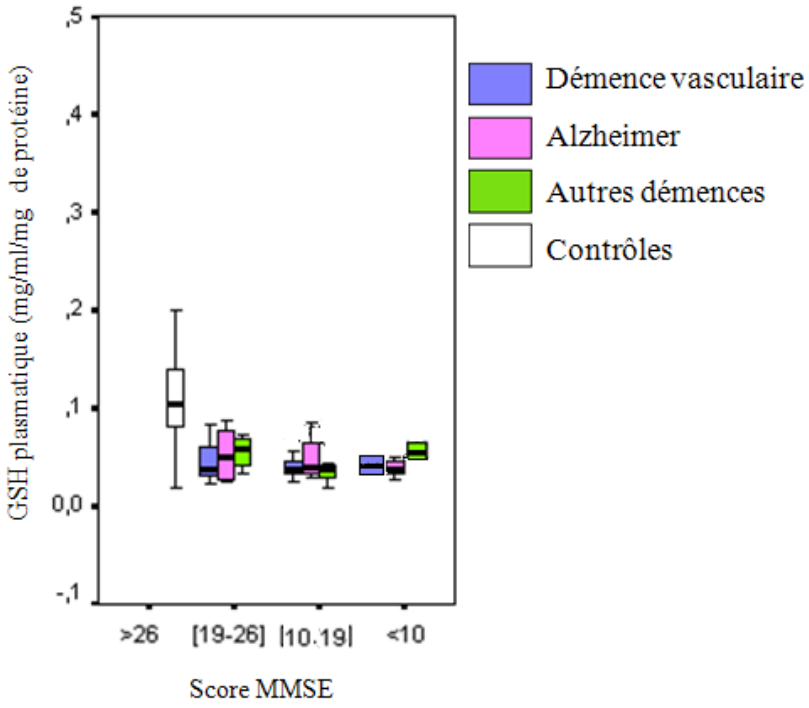


Figure 84: *Répartition du taux de GSH en fonction de la sévérité (score MMSE) (Contrôle >26 ; démence légère [19-26] ; démence modérée [10-19]; démence sévère <10) et du type de démence et du type de la démence.* ***A)*** *Taux de GSH érythrocytaire;* ***B)*** *Taux de GSH plasmatique.*

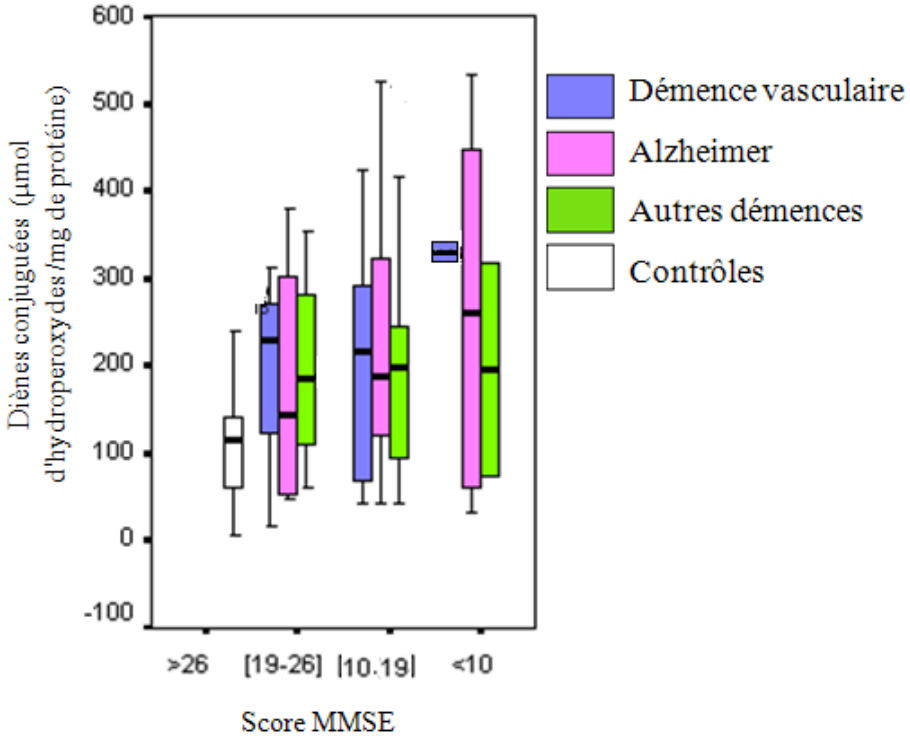


Figure 85: *Répartition du taux des dienes conjuguées erythrocytaire en fonction de la sévérité (score MMSE) (Contrôle >26 ; démence légère [19-26] ; démence modérée [10-19]; démence sévère <10) et du type de démence et du type de la démence.*

V Evaluation du métabolisme peroxysomal au niveau plasmatique et érythrocytaire dans différents types de démences

L'implication du dysfonctionnement du peroxysome dans le processus de vieillissement et au développement de MA a été suggéré par des résultats obtenus in vitro, sur des modèles animaux et dans une étude clinique post-mortem (**Cimini *et al*., 2009**; **Kou *et al*., 2011**). Dans le but de rechercher l'éventuelle contribution de cet organite dans le développement et la physiopathologie des démences et en particulier la MA, différents marqueurs du métabolisme péroxysomale ont été mesurés au niveau du plasma et des érythrocytes de patients déments et contrôles.

Ainsi, une détermination des taux plasmatiques et érythrocytaires de C22:0 et d'AGTLCs (C24:0 et C26:0), d'acide phytanique et de plasmalogènes C16:0 a été réalisée par CPG/SM.

1. Evaluation du taux des substrats de la β-oxydation peroxysomale au niveau érythrocytaire et plasmatique

Les acides gras à très longues chaines (AGTLCs) subissent un raccourcissement de leur chaine carbonée au niveau du peroxysome par β-oxydation. De même, la dernière étape de synthèse du DHA s'effectue dans cet organite par β-oxydation de son précurseur le C24:6. Une quantification des taux plasmatiques et érythrocytaires de ces AGTLCs a été réalisée et les résultats de ce dosage sont présentés dans les **Tableaux 21 à 26**.

La comparaison des valeurs moyennes de ces AGTLCs entre groupe contrôles et groupe de patients déments montre une augmentation significative du C26:0 plasmatique et érythrocytaire dans le groupe de déments (**Tableau 21 et 23**). La concentration plasmatique du C26:0, de 1,08 ± 1,48 µM chez les contrôles, passe à 12,86 ± 5,42 µM chez les patients déments ($p < 0,001$) (**Tableau 23**). Chez les patients MA, le taux du C26:0 plasmatique, est 12 fois plus important comparativement au sujets contrôles (12,64 ± 6,11 µM vs 1,08 ± 1,48 µM) ce qui fait de cet acide gras un biomarqueur puissant et très informatif de la MA (dépôt de brevet n°1358513; 05 09 2013). L'accumulation plasmatique du C26:0 est aussi observée dans les sous-groupes de déments atteints par une démence vasculaire ou par un autre type de démence (**Tableau 24**). L'analyse de la courbe ROC correspondant au C26:0 plasmatique révèle un seuil décisionnel de 2,899 µM. La sensibilité du dosage est de 100%. Sa spécificité est de 98,8% et le dosage du C26:0 plasmatique permet de classer correctement 99,1% des patients Alzheimer.

Au niveau des érythrocytes circulants, le taux de C26:0 qui était de 1,92 ± 2,07 µM dans les contrôles passe à 16,23 ± 2,07 µM ; 17,66 ± 3,85 et 6,72 ± 4,09 µM, respectivement dans le groupe de MA, le groupe des démences vasculaires et d'autres démences (**Tableau 22**).

L'analyse de la courbe ROC correspondant au C26:0 érythrocytaire montre un seuil décisionnel optimal de 4,159 µM. Dans cette situation la sensibilité du dosage est de 100% et sa spécificité de 97,8%. La mesure du C26:0 érythrocytaire permet de classer correctement 98,3% des patients Alzheimer. Les concentrations de C26:0 érythrocytaire sont significativement corrélées à celles du C26:0 plasmatique ($r= 0,787$; $P < 0,001$).

La comparaison des valeurs moyennes du C24:0 entre groupe contrôles et groupe de patients déments montre une augmentation significative du C24:0 plasmatique dans le groupe de déments. La concentration plasmatique du C24:0, qui était de 24,68 ± 1,71 µM dans les contrôles, passe à 28,53 ± 7 µM dans les patients déments (**Tableau 23**).

Chez les patients MA, le taux du C24:0 plasmatique, a augmenté comparativement au sujets contrôles (29,82 ± 6,40 µM). De même, une accumulation du C24:0 est observée dans les plasmas des déments atteints par une démence vasculaire ou par un autre type de démence avec un taux plus important pour le sous-groupe des démences vasculaires (29,92 ±7,93 µM) (**Tableau 24**).

En revanche, une diminution de la concentration du C24:0 au niveau des érythrocytes circulants est observée chez les patients déments, le taux de C24:0 qui était de 31,72 ± 9,52 µM dans les contrôles passe à 24,26 ± 5,7 µM ; 24,29 ± 6,16 et 24,41 ± 4,85 µM, respectivement dans le groupe de MA, le groupe des démences vasculaires et d'autres démences (**Tableaux 21 et 22**).

Les concentrations de C24:0 plasmatiques sont corrélées à celles du C26:0 plasmatique et érythrocytaire avec des coefficients de corrélation r respectifs de 0,163 et 0,179 ($P < 0,05$) (**Figure 86**).

Par ailleurs, le C22:0, un acide gras dont le métabolisme s'effectue en partie dans le peroxysome, a été quantifié chez les patients déments et les contrôles. Ce dosage montre une accumulation de cet acide gras dans le plasma et les érythrocytes. Au niveau plasmatique, la concentration du C22:0 chez les patients est de 26,5 ± 7,86 µM alors qu'elle n'est que de 23,59 ± 7,09 µM chez les sujets contrôles ($P < 0,001$) (**Tableau 23**). La comparaison de la concentration du C22:0 entre les différents sous groupes de démence et le groupe contrôles révèle une surproduction significative de cet acide gras au niveau plasmatique (MA : 24,77 ± 7,45 µM; DV : 28,7 ± 8,36 µM et autres démences : 26,98 ± 7,86 µM) (**Tableau 24**). Au niveau érythrocytaire, une accumulation moins marquée du C22:0 est détectée avec une concentration de 21,57 ± 8,32 µM dans les contrôles et de 24,96 ± 5,83 µM chez les patients déments (**Tableau 21**). Pour les MA, la concentration moyenne de C22:0 est de 25,69 ± 4,11 µM (**Tableau 23**).

L'analyse de la courbe ROC correspondant au C22:0 érythrocytaire montre un seuil décisionnel optimal de 19,53 µM. Dans cette situation, la sensibilité du dosage est de 100% et sa spécificité de 42,96%.

Les concentrations de C22:0 érythrocytaire sont significativement corrélées à celles du C26:0 érythrocytaire (r= 0,221 ; *P < 0,05*) et plasmatique (r=0,225 ; *P < 0,05*). De plus, les concentrations de C22:0 plasmatique sont significativement corrélées à celles du C26:0 érythrocytaire (r= 0,270 ; *P < 0,001*) et plasmatique (r=0,149).

La comparaison des concentrations moyennes du C22:6 (DHA) entre groupe contrôle et groupe de patients déments montre une diminution significative du cet AG au niveau plasmatique et érythrocytaire dans le groupe de déments (**Tableau 21 et 23**). La concentration plasmatique du DHA (71,47 ± 5,11 µM) dans les contrôles passe à 45,65 ± 4,06 µM chez les patients déments (*P < 0,001*). Chez les patients MA, le taux de DHA plasmatique, est de 45,69 ± 8,25 µM. La déficience plasmatique du DHA, comparativement au contrôle, est aussi observée dans les sous-groupes de déments atteints par une démence vasculaire ou par un autre type de démence (**Tableau 24**).

Au niveau des érythrocytes, la concentration du DHA qui est de 79,88 ± 9,75 µM dans les contrôles passe à 43,85 ± 12 ,57 µM ; 59,05 ± 30,67 µM et 55,99 ± 26,60 µM, respectivement dans le groupe de MA, de démences vasculaires ou d'autres démences (**Tableau 22**).

L'analyse de la courbe ROC correspondant au DHA érythrocytaire montre un seuil décisionnel optimal de 51,45 µM. Dans cette situation, la sensibilité du dosage est de 54,1 % et sa spécificité de 72 %.

Les concentrations de DHA érythrocytaire sont significativement corrélées à celles du DHA plasmatique (r= 0 ,407 ; *P < 0,001*).

Tableau 21 : *Valeurs moyennes des taux érythrocytaires des AGTLCs chez les patients déments et les contrôles.*

	C26:0 (µM)	*C24:0 (µM)*	*C22:0 (µM)*	*C22 :6 (µM)*
Contrôles	1,92 ± 2,07	31,72 ± 9,52	21,57 ± 8,32	79,88 ± 9,75
Patients déments	16,78 ± 4,37**	24,32 ± 5,47**	24,96 ± 5,83**	52,19 ± 4,21

*La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par **, (** : P < 0,001)*

Tableau 22: *Valeurs moyennes des taux érythrocytaires des AGTLCs et du DHA dans les différents sous groupes de patients déments et chez les contrôles.*

	C26:0 (µM)	*C24:0 (µM)*	*C22:0 (µM)*	*C22:6 (DHA) (µM)*
Démence vasculaire	17,66 ± 3,85**	24,29 ± 6,16	25,54 ± 6,32*	59,05 ± 30,67
Alzheimer	16,35 ± 4,91**	24,26 ± 5,70	25,69 ± 4,11*	43,85 ± 12,57**
Autres démences	16,59 ± 4,15**	24,41 ± 4,85**	23,73 ± 6,99	55,99 ± 26,60
Contrôles	1,92 ± 2,07	31,72 ± 9,52	21,57 ± 8,32	79,88 ± 49,75

*La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par **, (** P<0,001)*

Tableau 23 : *Valeurs moyennes des taux plasmatiques des AGTLCs et du DHA dans les patients déments et les contrôles.*

	C26:0 (µM)	***C24:0 (µM)***	***C22:0 (µM)***	***C22:6 (DHA) (µM)***
Contrôles	1,08 ± 1,48	24,68 ± 1,71	23,59 ± 7,09	71,47 ± 5,11
Patients déments	12,86 ± 5,42**	28,53 ± 7,00	26,50 ± 7,86	45,65 ± 4,06**

*La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par **, (** : P < 0,001)*

Tableau 24: *Valeurs moyennes des taux plasmatiques des AGTLCs et du DHA dans les différents sous groupes de patients déments et les contrôles.*

	C26:0 (µM)	***C24:0 (µM)***	***C22:0 (µM)***	***C22:6 (DHA) (µM)***
Démence vasculaire	*14,00 ± 5,11**	*29,92 ± 7,93*	*28,70 ± 8,36*	*40,39 ± 14,22**
Alzheimer	*12,64 ± 6,11**	*29,82 ± 6,4*	*24,77 ± 7,45**	*45,69 ± 8,25**
Autres démences	*12,21 ± 4,76**	*25,74 ± 6,46*	*26,98 ± 7,86*	*49,80 ± 18,54**
Contrôles	*1,08 ± 1,48*	*24,68 ± 11,71*	*23,59 ± 7,09*	*71,47 ± 55,11*

*La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par * et **, (* : P < 0,05 et ** : P < 0,001)*

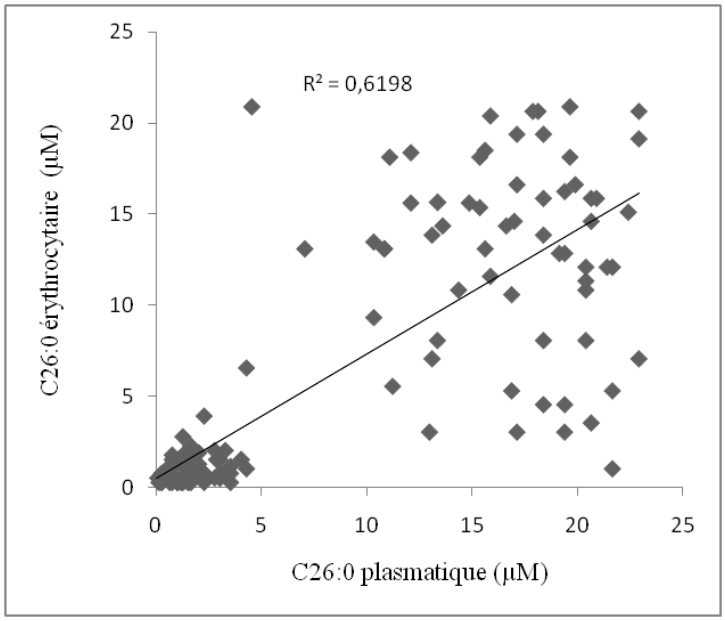


Figure 86: *Corrélation entre les concentrations de C26:0 érythrocytaire et celles de C26:0 plasmatique.*

Tableau 25: *Valeurs moyennes des taux plasmatiques et érythrocytaires de l'acide phytanique et du plasmalogène-C16:0 chez les patients déments et chez les contrôles.*

	Acide phytanique érythrocytaire (µM)	***Plasmalogène-C16:0 érythrocytaire (µM)***	***Acide phytanique plasmatique (µM)***	***Plasmalogène-C16:0 plasmatique (µM)***
Contrôles	16,39 ± 6,67	55,85 ± 7,17	16,90 ± 3,16	22,36 ± 2,67
Patients déments	18,61 ± 7,35	48,02 ± 4,29*	25,27 ± 7,32**	17,41 ± 3,62

*La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par *, (* : P < 0,05).*

Tableau 26 : *Valeurs moyennes des taux plasmatiques et érythrocytaires de l'acide phytanique et du plasmalogène-C16:0 dans les différents sous groupes de patients déments et chez les contrôles.*

	Acide phytanique érythrocytaire (µM)	***Plasmalogène-C16:0 érythrocytaire (µM)***	***Acide phytanique plasmatique (µM)***	***Plasmalogène-C16:0 plasmatique (µM)***
Démence vasculaire	*16,04 ± 8,70*	*53,31 ± 6,54*	*29,43 ± 9,19**	*17,55 ± 11,94*
Alzheimer	*20,15 ± 5,07*	*49,06 ± 4,79*	*24,33 ± 5,64**	*12,86 ± 6,66**
Autres démences	*18,87 ± 1,49*	*42,49 ± 3,37*	*23,16 ± 8,15*	*23,21 ± 8,99*
Contrôles	*16,39 ± 6,67*	*55,85 ± 7,17*	*16,9 ± 3,16*	*22,36 ± 2,67*

*La différence significative entre contrôle et patients déments est indiquée par * et **, (* : P < 0,05 et ** : P < 0,001)*

La comparaison des concentrations moyennes de l'acide phytanique érythrocytaire et plasmatique entre groupe contrôle et groupe de patients déments montre une augmentation chez ces derniers (**Tableaux 25 et 26**). Cette augmentation s'est montrée significative au niveau plasmatique. En effet, la concentration de 16,9 ± 3,16 µM chez les contrôles est passée à 29.43 ± 9,19 µM chez les patients atteints d'une démence vasculaire, à 24,33 ± 5,64 µM chez les patients Alzheimer et à 23,16 ± 8,15 µM dans les autres démences.

En revanche, le dosage du plasmalogène–C16 :0 montre une diminution de son taux au niveau erythrocytaire et plasmatique chez les patients déments. Cette diminution est significative pour les patients MA avec une concentration plasmatique de 12,86 ± 6,66 µM alors qu'elle est de 22,36 ± 2,67chez les contrôles (**Tableaux 25 et 26**).

2. Détermination du profil des acides gras au niveau plasmatique et erythrocytaire

Pour établir un profil d'acides gras plus large, un dosage par CPG a été réalisé sur les érythrocytes (**Tableaux 27 et 28**) ainsi que sur les plasmas des patients déments et contrôles (**Tableaux 29 et 30**). Pour les acides gras saturés étudiés (de C12:0 à C26:0), des variations importantes entre déments et contrôles ont été observées avec les différents acides gras. Les taux de C13:0, C16:0, C22:0 et C24:0 et de C26:0 augmentent de façon significative chez tous les déments. Des taux en acide gras saturés plus faibles sont observés chez les patients ayant une démence vasculaire ou une autre démence en comparaison aux patients MA et ceci en particulier pour le C13:0, C14:0, C15:0 et C18:0 (**Tableau 28)**.

Pour les acides monoinsaturés, de faibles diminutions du C14:1, C16:1 n-7 et du C17:1 n-7 ont été observées pour tous les déments. Une augmentation des AGMI à longue et à très longue chaîne s'est révélée importante chez les déments en comparaison aux contrôles (**Tableau 28)**.

Pour les acides polyinsaturés, une augmentation très significative est observée chez tous les déments en comparaison aux contrôles, à l'exception du C22:6 n-3. On observe également une différence significative entre les DV et les MA (MA>DV) et entre MA et autres démences (MA>autres démences) (**Tableau 28)**.

Tableau 27 : *Profil érythrocytaire des acides gras trans dans les différents sous groupes de patients déments et chez les contrôles.*

	Contrôles	***Alzheimer***	***Démence vasculaire***	***Autres démences***
C16:1 trans11	5,90 ± 2,00	4,91 ± 1,37	3,12 ± 2,18	3,24± 1,47
C18:1 trans 9	3,27 ± 1,72	58,85 ± 4,83*	44,14 ± 2,22*¶	5,88 ± 1,25*#£
C18:1 trans 11	5,69± 2,63	17,62 ± 2,91*	17,52 ± 1,33*	5,78 ± 1,60#£
C18:2 cis 9 trans 11	1,22 ± 0,19	6,51 ± 1,24*	2,82 ± 0,53	12,39± 1,33**#£
C18:2 trans 9 trans 12	3,08 ± 0,47	4,98 ± 1,49	2,96 ± 0,84	2,81 ± 0,92
C18:2 trans 9 cis 12	2,28 ± 1,03	6,39± 1,34*	3,78 ± 1,14	6,31± 1,30*
C18:2 cis 9 trans 12	2,06± 0,60	10,37± 4,26*	5,63 ± 1,35¶	2,50 ± 1,00£
C18:2 trans 10 cis 12	2,31 ± 0,24	18,24 ± 5,65*	5,76 ± 2,01¶	4,22 ± 1,05

C20:1 trans 11	3,15 ± 1,82	5,31 ± 3,15	8,08 ± 2,11*	7,31 ± 1,87*
∑AG Trans	23,93 ± 2,57	87,32 ± 5,02**	71,21 ±5,56**	28,44 ± 3,29#£

*Une différence significative entre contrôles et patients déments est indiquée par * (Test Mann Whitney).*
Une différence significative entre DV et Alzheimer est indiquée par ¶ (Test Mann Whitney).
Une différence significative entre DV et autres démences est indiquée par # (Test Mann Whitney).
Une différence significative entre Alzheimer et autres démences est indiquée par £ (Test Mann Whitney).
∑AG Trans : Somme des acides gras trans

Pour les acides gras trans (**Tableau 27**), une augmentation significative de la concentration totale en AG trans erythrocytaires est observée chez les patients déments (Alzheimer et démence vasculaire) comparativement aux contrôles. De même, l'accumulation des différents AG trans s'est révélée significative chez le groupe de patients MA en comparaison aux contrôles. Les taux de C18:1 trans 9, C18:2 cis 9 trans 11 et C18:2 trans 10 cis 12 sont significativememnt plus faibles chez les patients ayant une démence vasculaire comparativement aux patients MA. Les taux plus faibes de ces acides gras ainsi que ceux de C18:1 trans 11 sont observés chez les patients ayant une autre démence en comparaison au patients MA.

Pour les acides gras saturés plasmatiques étudiés des augmentations importantes des différents acides gras, à l'exception du C14:0, C15:0 et C16:0, ont été observées chez les déments en comparaison aux contrôles. Le taux de C13:0, C16:0, C22:0 et C24:0 et de C26:0 augmentent de façon significative chez tous les déments. Des taux en acide gras saturés plus faibles ont été observés chez les patients ayant une démence vasculaire ou une autre démence en comparaison aux patients MA et ceci en particulier pour le C13:0, C14:0, C15:0 et C18:0 (**Tableau 29).**

Pour les acides gras monoinsaturés plasmatiques, une diminution significative des taux de la majorité des acides gras a été observée chez les groupes de déments à l'exception du C18:1 n-7 et du C20:1 n-9. Des variations intergroupes ont été remarquées avec des taux de C14 :1, C17 :1 n-7, C18:1 n-9 et C22 :1 plus faibles chez les MA (**Tableau 29).**

Pour les acides gras polyinsaturés plasmatiques, des taux plus faibles ont été remarqués chez les différents groupes de déments comparativement aux contrôles. Des variations significatives ont été observées également entre les MA, les DV et les autres démences avec des taux plus faibles pour le groupe MA.

Pour les acides gras trans, une augmentation de la concentration totale de ces AG chez les groupes MA et autres démences a été mise en évidence comparativement aux contrôles (**Tableau 30**). En effet, une accumulation de certains AGT a été observée chez les MA à savoir C18:1 trans 9, C18:1 trans 11, C18:2 trans 9 trans 12, C20:1 trans 11 et C18:2 trans 10 cis 12. Des variations entre les groupes de déments ont été ramarquées.

Tableau 28 : *Profil érythrocytaire des acides gras dans les différents sous groupes de patients déments et chez les contrôles. Les valeurs présentées dans le tableau sont exprimées en µg pour 1mL d'érythrocytes*

	Contrôles	***Alzheimer***	***Démence vasculaire***	***Autres démences***
ΣAGS	252,01 ± 4,24	427,30 ± 14,70*	389,47 ± 13,30*	368,12 ± 13,56*£
C12:0	10,59 ± 2.83	9,69 ± 2,47	4,14 ± 1,29*¶	8,64 ± 1,56#
C13:0	5,32 ± 7,40	9,35 ± 14,11*	5,35 ± 7,26	7,52 ± 2,87
C14:0	11,94 ± 10,31	11,85 ± 20,75	4,75 ± 5,06*¶	11,63 ± 4,36*#
C15:0	5,47 ± 7,61	3,46 ± 4,10	2,91 ± 2,04	2,79 ± 0,33
C16:0	132,95 ±32,41	217,76 ± 12,07*	190,68 ± 7,22	174,49 ± 6,48#£
C18:0	74,16 ± 7,20	136,98 ± 8,62*	131,88 ± 8,03*¶	130,38 ± 7,31**
C20:0	3,55 ± 1,66	4,12 ± 1,34	4,09 ± 1,47	2,27 ± 1,16*
C22:0	7,15 ± 1,31	8,50 ± 2,24*	15,21 ± 2,28*¶	6,92 ± 2,12#
C24:0	5,68 ± 2,10	19,67 ± 1,91**	19,63 ± 3,96**	16,13 ± 1,23*
C26:0	1,94 ± 0,78	9,11 ± 1,52	17,50 ± 3,41**¶	10,25 ± 1,60*#
ΣAGMI	137,97 ± 19,3	234,19 ± 14,42	148,34 ± 7,39¶	195,97 ± 11,94*#
C14:1	5,53 ± 7,13	4,11 ± 5,96*	2,30 ± 2,18*	5,97 ± 1,19
C16:1 n-7	7,18 ± 3,93	5,12 ± 1,92	2,49 ± 0,38*¶	3,31 ± 0,63
C17:1 n-7	5,76 ± 1,28	2,22 ± 1,89	2,15 ± 1,97	18,77 ± 53,12#£
C18:1 n-9	95,73 ± 11,77	131,27 ± 9,34*	79,06 ± 8,59¶	106,28 ± 7,81#£
C18:1 n-7	9,96 ± 1,79	15,71 ± 10,17*	15,75 ± 11,62*	14,51 ± 8,05
C20:1 n-9	2,59 ± 1,06	21,62 ± 2,50**	14,84 ± 2,58**¶	9,49 ± 2,24£

C22:1n-9	7,43 ± 1,95	14,78 ± 2,32*	8,33 ± 1,02	4,35 ± 1,61*£
C24:1 n-9	7,81 ± 4,31	48,88 ± 3,37	27,16 ± 2,69**¶	40,23 ± 3,80*
ΣAGPI	72,41 ± 9,20	246,38 ± 15,14	179,82 ± 9,06**¶	229,59 ± 19,06*
C18:2 n-6	38,01 ± 7,81	84,45 ± 6,78*	40,24 ± 7,32¶	71,92 ± 4,44**
C18:3 n-6	2,47 ± 4,71	2,61 ± 1,71	2,85 ± 1,79	22,48 ± 6,18#£
C18:3 n-3	2,54 ± 1,15	13,02 ± 3,31	7,27 ± 1,50¶	3,68 ± 1,41#£
C20:3 n-6	6,89 ± 1,65	54,12 ± 5,62**	55,33 ± 5,41*	48,33 ± 8,30**
C20:3 n-3	5,22 ± 1,07	16,61 ± 1,81**	18,72 ± 3,64*	10,79 ± 3,17#
C20:4 n-6	13,58 ± 5,60	77,82 ± 5,80**	33,55 ± 4,80*¶	61,05 ± 5,77*#
C20:5 n-3	2,93 ± 1,59	13,77 ± 1,61*	19,73 ± 4,00*	22,04 ± 5,44*£
C22:6 n-3	4,78 ± 3,48	3,92 ± 1,94	3,01 ± 1,40	7,91 ± 1,77*#
ΣAGPI n-3	13,07 ± 9,67	39,42 ± 4,78	51,53 ± 6,69*	42,84 ± 5,83#
ΣAGPI n-6	144,92 ±14,36	206,96 ± 13,64*	133,61 ± 62,05	186,75 ± 16,46*
AGPI n-3/ AGPI n-6	0,69 ± 0,61	0,44 ± 0,37	1,92 ± 0,84¶	0,91 ± 1,89*#

*Une différence significative entre contrôles et patients déments est indiquée par * (Test Mann Whitney).*
Une différence significative entre DV et Alzheimer est indiquée par ¶ (Test Mann Whitney).
Une différence significative entre DV et autres démences est indiquée par # (Test Mann Whitney).
Une différence significative entre Alzheimer et autres démences est indiquée par £ (Test Mann Whitney)

Tableau 29 *Profil plasmatique des acides gras dans les différents sous groupes de patients déments et chez les contrôles. Les concentrations en acide gras sont exprimées en µM.*

	Contrôles	***Alzheimer***	***Démence vasculaire***	***Autres démences***
ΣAGS	4705,11±21,72	4095,27±20,47*	3896,42±13,44*¶	4385,11±19,54*#
C12:0	46,20 ± 5,50	231,72 ± 17,71*	236,01± 19,67**	150,55 ± 11,14*#£
C13:0	51,86 ± 6,98	119,92 ± 14,06*	74,05 ± 6,38*¶	107,49 ± 9,16*#
C14:0	553,61 ±26,24	62,00 ± 7,82*	79,80 ± 12,11**	121,14 ± 13,68*#£
C15:0	77,95 ± 8,36	20,98 ± 20,61*	21,34 ± 18,58**	34,46 ± 4,73#£

C16:0	3193,52 ±17,57	2505,17 ± 4,84*	2305,35 ± 80,81**	2709,85 ± 34,74£
C18:0	908,63 ± 35,73	930,40 ± 36,48	899,32 ± 31,38	929,12 ± 33,20#
C20:0	30,89 ± 4,90	34,26 ± 3,22	27,77 ± 7,46	48,59 ±7,15*#
C22:0	37,97 ± 4,07	61,47 ± 6,39*	39,75± 6,61¶	59,86 ± 7,82*#
C24:0	22,67 ± 4,74	28,65 ± 4,96	20,49 ± 1,26*	26,07 ± 1,13
C26:0	172,54± 112,51	245,94±17,91*	198,51± 9,60¶	249,43± 18,14*
ΣAGMI	3604,74± 49,54	2830,69± 25,92	2709,16± 17,95	3266,39± 68,59#£
C14:1	156,35 ± 16,97	21,59 ± 32,71	22,58 ± 4,71**	37,52 ± 6,48**
C16:1 n-7	340,43 ± 22,35	212,16 ± 16,29	167,41 ± 8,46**¶	220,49 ± 112,32*#
C17:1 n-7	82,57± 12,91	29,14 ± 3,20	76,72 ± 8,30¶	81,11 ± 10,33£
C18:1 n-9	2712,32± 19,44	2277,64 ±12,51	2369,65 ± 46,38	2857,71± 41,42#£
C18:1 n-7	231,22±10,00	239,74 ± 13,16	247,31 ±13,13	259,97± 13,60
C20:1 n-9	69,89 ± 7,54	119,74 ± 12,13	89,03± 11,20¶	61,79 ± 4,68£
C22:1n-9	41,85 ± 7,52	8,08 ± 7,18	9,84 ± 2,88**	18,46 ± 4,56*£
C24:1 n-9	29,04± 6,71	29,07± 7,47	29,81±5,07	40,33±3,46*#£
ΣAGPI	4653,05±18,66	3703,75± 26,34	3936,20± 14,76*¶	3515,95±12,81*£
C18:2 n-6	3682,28 ±52,21	2796,99 ±14,37	2800,62 ± 70,85*	2354,12± 29,89*£
C18:3 n-6	63,28 ± 4,09	40,79 ± 4,97	48,55± 7,09	79,61 ± 5,34#£
C18:3 n-3	85,04 ± 13,49	22,62 ± 4,24*	29,58 ± 7,35*	48,78 ± 7,16£*
C20:3 n-6	60,26 ± 5,73	74,61 ± 45,95	162,96 ± 27,75¶	182,87 ± 32,18£*
C20:3 n-3	210,53 ± 9,34	155,46 ± 4,66	207,75 ± 12,84¶	226,75 ± 13,30£
C20:4 n-6	545,87 ±25,26	575,63 ± 57,80	605,83± 31,70¶	722,22± 34,94*
C20:5 n-3	33,98 ± 7,88	37,58 ± 4,56	64,76 ± 18,75*¶	19,27 ± 1,77*#£
C22:6 n-3	42,72± 38,84	34,19± 17,18	32,47± 12,59	26,97± 16,45*£

ΣAGPI n-3	367,55± 26,15	212,29± 42,22*	321,26±19,29¶	317,79± 26,17*£
ΣAGPI n-6	4312,43 ± 78,03	3488,02 ± 86,42*	3614,94 ± 134,51*	3198,16 ±150,43*£

*Une différence significative entre contrôles et patients déments est indiquée par * (Test Mann Whitney).*
Une différence significative entre DV et Alzheimer est indiquée par ¶ (Test Mann Whitney).
Une différence significative entre DV et autres démences est indiquée par # (Test Mann Whitney).
Une différence significative entre Alzheimer et autres démences est indiquée par £ (Test Mann Whitney).

Tableau 30 : *Profil plasmatique des acides gras trans dans les différents sous groupes de patients déments et chez les contrôles. Les concentrations en acide gras sont exprimées en µM.*

	Contrôles	***Alzheimer***	***Démence vasculaire***	***Autres démences***
AG Trans	545,38± 38,49	813,21± 16,96*	300,96± 17,69¶	616,96± 93,31#£
C16:1 trans11	146,16 ± 11,45	67,44 ± 4,38*	71,50 ± 4,88*	83,35 ± 5,52£
C18:1 trans 9	64,96 ± 13,70	278,63± 40,54*	206,41 ±53,43**¶	193,05 ± 41,96**£
C18:1 trans 11	58,79± 4,51	63,09 ± 5,66*	49,32 ± 3,98¶	53,89 ± 38,44#
C18:2 trans 9 trans 12	24,99 ± 4,93	44,61 ± 5,68*	31,96 ± 4,22	22,71± 1,17#£
C18:2 trans 9 cis 12	28,56 ± 5,28	17,40 ± 11,86	26,12 ± 22,65¶	24,73 ± 15,72£
C18:2 cis 9 trans 12	26,70 ± 2,50	30,31 ± 21,71	32,13 ± 18,76	27,19 ± 23,36
C20:1 trans 11	32,07 ± 36,87	44,66 ± 7,42	32,75 ± 3,65	30,28 ± 31,49£
C18:2 cis 9 trans 11	46,85± 8,40	40,16 ± 11,39	33,69 ± 4,72	36,64 ± 6,36
C18:2 trans 10 cis 12	161,53 ± 47,39	396,06 ± 3,80*	36,04 ±3,79*	145,12 ± 57,98#

*Une différence significative entre contrôles et patients déments est indiquée par * (Test Mann Whitney).*
Une différence significative entre DV et Alzheimer est indiquée par ¶ (Test Mann Whitney).
Une différence significative entre DV et autres démences est indiquée par # (Test Mann Whitney).
Une différence significative entre Alzheimer et autres démences est indiquée par £ (Test Mann Whitney).

VI Evaluation des marqueurs inflammatoires au niveau plasmatique chez les malades Alzheimer

Le dosage de certains marqueurs de l'inflammation (IL1-β, TNF-α, acide arachidonique (C20:4 érythocytaire ; C20:4 plasmatique) ; Crp_{us}) n'a été effectué que sur 25 patients Alzheimer parmi les 64 malades recrutés et que sur 21 contrôles parmi les 128 inclus dans l'étude. Une différence significative entre Alzheimer et contrôles n'a été mise en évidence qu'avec l'IL-1β (Test de Mann-Whitney ; P = 0,0297). Toutefois, des valeurs approchant la significativité sont observées avec le C20:4 érythrocytaire (Test de Mann-Whitney ; P = 0,0823). Les autres paramètres mesurés n'ont pas révélé de différences marquées entre les groupes Alzheimer et contrôles (**Tableau 31**).

Tableau 31 : *Valeurs moyennes de la concentration plasmatique en TNF-α, IL1-β, C20:4 érythrocytaire, C20:4 plasmatique et Crp_{us} chez les patients Alzheimer et les contrôles*

Paramètres inflammatoires mesurés	***Alzheimer***	***Contrôles***
TNF-α (pg/mL)	130,57 ± 99,75	144,94 ± 105,34
IL-1β (pg/mL)	168,84 ± 40,84	152,77 ±37,86 *
C20:4 érythrocytaire (µM)	384,47 ± 145,83	277,29 ± 206,25 (*)
C20:4 plasmatique (µM)	1065,22 ± 692,26	1028,50 ± 430,18
Crp_{us} (mg/L)	9,22 ± 14,10	9,03 ± 13,53

** : Test de Mann-Whitney ; P=0,0297; (*):Test de Mann-Whitney ; P= 0,0823*

Sur les paramètres ayant montré une significativité (IL-1β) ou une tendance (C20:4 érythrocytaire), nous avons cherché à savoir si les valeurs de ces paramètres pouvaient être influencées par le score MMSE (score 0 : contrôles >26; score 1 : démence légère [19-26] ; score 2 : démence modérée [10-19]; score 3 : démence sévère <10).

Avec l'IL-1β, les valeurs sont plus élevées lorsque le score augmente (score 1 : 136,96 ± 10.86 pg/mL; score 2 : 167,10 ± 42,82 pg/mL; score 3 : 175,35 ± 49,49 pg/mL). Selon un test

de rang de Kriskall-Wallis la valeur de *P* par rapport aux contrôles (score 0 : 152,77 ± 37,86 pg/mL) est de 0,1597 ; la valeur de *P* entre les sous groupes Alzheimer est de 0,8433. En raison des valeurs de *P* proches de 0,1 sur un petit effectif, il est possible que la quantification de l'IL-1β sur l'ensemble de la population Alzheimer et contrôles conduise à des résultats significatifs.

DISCUSSION

La MA est définie comme une démence menant au déclin des fonctions cognitives des sujets atteints. De point de vue histologique, cette maladie est caractérisée par des dépôts d'amyloïde-β (Aβ) et des dégénérescences neurofibrillaires, trouvés de part et d'autre de la membrane plasmatique des neurones (**Zhou *et al.*, 2011**). Des perturbations du métabolisme lipidique sont rapportées à un stade précoce de la maladie à savoir la réduction de plus de 15% du taux d'éthanolamine plasmalogènes au niveau de la matière grise du cerveau de patients atteints de MA; cette réduction a été corrélée à des pertes synaptiques et à des dégénérescences au niveau du cerveau de ces patients (**Han *et al.*, 2001**). Des accumulations de C22:0 et d'AGTLCs (C24:0 et C26:0) ont aussi été révélées au niveau des régions corticales du cerveau de patients MA à l'exception du parasubiculum, région dont les cellules neuronales sont en nombre plus faible et ont une taille plus petite comparativement aux autres régions du cortex (**Kou *et al.*, 2011**). Ces AGs ont été associés à des dépôts de peptides Aβ (**Kou *et al.*, 2011**) et leur accumulation indiquerait des dysfonctions peroxysomales chez les malades MA **(Lizard *et al.*, 2012).** Dans certaines maladies neurodégénératives, l'accumulation d'AGTLCs est déjà bien connue comme dans le cas des leucodystrophies peroxysomales. Dans ces maladies génétiques rares, telles que l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome-X (X-ALD), le syndrome de Zellweger et la maladie Refsum infantile, d'importantes accumulations plasmatiques et tissulaires d'AGTLCs sont observées (**Geillon *et al.*, 2012**).

Au cours du travail de Thèse réalisé, la quantification de la teneur plasmatique en C22:0 et en AGTLCs réalisée par CPG/SM chez des patients atteints de MA recrutés au sein de la population Tunisienne a montré une augmentation hautement significative de la concentration plasmatique en C22:0, C24:0 et C26:0 comparativement aux sujets contrôles (**Zarrouk *et al.*, 2012**).

Ces résultats ont conduit :

- **i)** à préciser les activités biologiques de C22:0, C24:0 et C26:0 sur des cellules neuronales SK-N-BE en culture pour évaluer et caractériser leur lipotoxicité,
- **ii)** à définir l'incidence de C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'amyloïdogenèse et la tauopathie et réciproquement à évaluer l'impact de protéines amyloïdes sur l'accumulation de ces acides gras.
- **iii)** à tenter de s'opposer aux effets délétères de C22:0, C24:0 et C26:0 à l'aide du DHA.

iv) à valider un modèle Alzheimer de souris transgénique APP PS1 ΔE9 pour évaluer les modifications de lipides en relation avec le métabolisme peroxysomal chez ces animaux,

v) à quantifier d'autres lipides associés au métabolisme peroxysomal (plasmalogènes, acide phytanique, DHA) dans les échantillons de plasmas et d'érythrocytes de malades déments (MA, démences vasculaires et autres démences) utilisés pour quantifier C22:0, C24:0 et C26:0 ainsi qu'à mesurer dans ces derniers des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation cytokinique et non cytokinique.

Les résultats obtenus suggèrent que le C22:0 et les AGTLCs (C24:0, C26:0) peuvent contribuer à la neurodégénéréscence et que des dysfonctions du métabolisme de ces acides gras pourraient intervenir dans les démences et en particulier dans la MA.

I. Caractéristiques de la lipotoxicité associée aux acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 : effets sur les organites cellulaires (mitochondries, peroxysomes et lysosomes), l'activation de mort cellulaire, l'oxydation et l'inflammation

Dans le cadre des maladies neurodégénératives et en particulier de la MA, les modifications cellulaires associées à la neurodégénéréscence s'accompagnent d'une altération des mitochondries, de modifications du cytosquelette et d'un stress oxydant pouvant conduire à la mort cellulaire ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, l'atrophie cérébrale chez les malades MA.

Pour aborder la part prise par le C22:0 et les AGTLCs (C24:0, C26:0) dans ces modifications importantes survenant au niveau du système nerveux central, des cellules neuronales humaines SK-N-BE ont été mises en présence d'acides gras C22:0 et d'AGTLCs (C24:0 et C26:0), identifiés en quantité augmentée au niveau des lésions cérébrales de patients Alzheimer au stade V et VI de la classification de Braak, en utilisant des concentrations correspondant à celles trouvées dans le plasma de malades MA (**Zarrouk *et al.*, 2012**).

Dans ces conditions, sur cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0, les modifications suivantes ont été identifiées : inhibition de la croissance cellulaire, perte d'adhésion, changement de la topographie et de la morphologie des mitochondries ainsi que de leurs caractéristiques fonctionnelles (chute de potentiel transmembranaire mitochondrial

ΔΨm, modification de l'expression des protéines de la phosphorylation oxydative, augmentation d'anions superoxydes), désorganisation du cytosquelette, surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, diminution du glutathion réduit (GSH), peroxydation lipidique, augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'iodure de propidium et relargage de LDH. A la plus forte concentration utilisée (20 µM), la mort cellulaire induite ne présente pas de caractéristiques d'apoptose : absence de pic Sub-G1 et de noyaux condensés et/ou fragmentés révélés par coloration à l'iodure de propidium et par microscopie électronique à transmission. Cette dernière méthode met par ailleurs en évidence la présence de nombreuses vacuoles suggérant qu'une déstabilisation de ces dernières (ou un processus d'autophagie) pourrait intervenir dans la mort cellulaire activée par les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0. Cette lipotoxicité sur celules SK-N-BE affecte aussi d'autres organites cellulaires (peroxysome, lysosome), conduit à la rupture de l'équilibre RedOx, à une surproduction de radicaux oxygénés et à une inflammation non cytokinique (surproduction de LTB4) sans association à un processus inflammatoire cytokinique.

1. Effets des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur la mitochondrie et l'activation de la mort cellulaire

Les fonctions des mitochondries incluent la phosphorylation oxydative nécessaire pour la production de l'ATP, mais elles jouent aussi des rôles importants dans l'homéostasie ionique, dans plusieurs voies métaboliques, dans l'apoptose et la mort cellulaire en général et dans la production et la dégradation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Beal , 2007 ; Brinton , 2008**).

Diverse études ont suggéré que les dysfonctionnements mitochondriaux joueraient des rôles majeurs dans la pathogénie de troubles neurodégénératifs, y compris dans la MA (**Baloyannis *et al*., 2006**).

En accord avec les résultats obtenus sur des oligodendrocytes murins 158N, une diminution de la prolifération cellulaire visualisée par microscopie à contraste de phase et comptage en présence de bleu trypan (non exclu par les cellules mortes) a été révélée (**Khan *et al.*, 2011)**. Ces effets sur la croissance cellulaire ont été confirmés par coloration au crystal violet qui permet d'évaluer l'état de confluence en colorant le noyau des cellules. La diminution de l'activité succinate deshydrogénase par l'intermédiaire du MTT a conduit à envisager des altérations mitochondriales sous l'effet des acides gras.

Compte tenu du rôle majeur que jouent les mitochondries dans le mode de mort cellulaire déclenché par divers agents (**Kroemer *et al.*, 2007**), l'influence de C22:0, C24:0 et C26:0 sur la topographie, la morphologie et les fonctions mitochondriales a été étudiée.

Par microscopie électronique à transmission, des changements topographiques et morphologiques majeurs des mitochondries ont été observés dans les cellules traitées avec les acides gras comparativement aux cellules non traitées ou traitées (**Zarrouk *et al.* 2012**). Un regroupement des mitochondries dans diverses zones du cytoplasme a été remarqué suggérant une biogenèse mitochondriale dans ces zones. De plus, des mitochondries de forme allongées ont été trouvées dans ces zones. Par ailleurs, dans les cellules traitées par les AGs, une distribution diffuse et irrégulière des mitochondries a été révélée en microscopie à fluorescence après coloration au MitoTraker-Red. Ce fluorochrome est capable de diffuser passivement et de s'accumuler spécifiquement à l'intérieur des mitochondries actives ce qui confirme la modification de la topographie des mitochondries mais suggère aussi une éventuelle modification des caractéristiques de leurs membranes.

Il apparait donc que le traitement des cellules avec C22:0, C24:0 et C26:0 induit une augmentation de la masse mitochondriale dès 5 µM, l'effet étant plus marqué avec le C22:0. L'allongement des mitochondries associé à l'augmentation de leur masse pourrait être un outil de protection du fonctionnement de l'organite ; cela permettrait de maintenir le niveau d'ATP nécessaire pour le fonctionnement et la survie de la cellule comme démontré par **Gomes *et al.* (2011**). Le dosage de l'ATP mitochondriale dans les cellules SK-N-BE traitées par 5 et 10 µM d'AGs a aussi montré une légère diminution du taux d'ATP ce qui suggère l'altération de l'expression des enzymes et des complexes de la chaîne respiratoire impliqués dans la synthèse de l'ATP et le maintien du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi m$). Les effets neurotoxiques du C22:0, C24:0 et C26:0, via les changements d'activité mitochondriale, ont été confirmés avec l'utilisation du $DiOC_6(3)$, une sonde fluorescente permettant de mesurer le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi m$). En utilisant cette sonde, le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées augmente avec la dose d'AGs démontrant un impact significatif des AGs sur l'activité mitochondriale dont la diminution peut contribuer au déclenchement de la mort cellulaire. Des altérations du potentiel mitochondrial sous l'effet des acides gras C22:0, C24:0 et / ou C26:0, en particulier à 20 µM, ont aussi été démontrées sur des cellules de gliome de rat C6 (**Baarine *et al.*, 2012**), sur des fibroblastes normaux ou de patients X-ALD (**Fourcade *et al.*, 2008**), des oligodendrocytes et des astrocytes (**Hein *et al.*, 2008**). Cet impact des AGs sur la mitochondrie semble donc être

un effet néfaste survenant quel que soit le type et l'origine des cellules considérées. Ceci indique que la diminution de ΔΨm est commune à différents types de cellules et fournit la preuve que le processus de mort cellulaire impliquant la mitochondrie est déclenché par les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0.

Pour tenter d'expliquer la dépolarisation mitochondriale induite par les AGs, une évaluation de l'expression protéique des complexes de la chaîne respiratoire a été réalisée par western blotting révélant de légères variations de l'expression des unités des complexes II, III, et IV en particulier pour les cellules traitées avec le C22:0. Ces faibles variations n'excluent pas les possibles modifications oxydatives (carbonylation protéique) que peuvent subir ces protéines ou d'autres protéines des complexes de la chaine respiratoire, pouvant altérer leur activité mais pas leur expression. En revanche, des différences de l'expression protéique de la sous-unité Core 2 du Complexe III et de la sous-unité II du Complexe IV ont été observées suite aux traitements avec le C24:0 et le C26:0. Ces modifications sont en accord avec celles observées dans les hépatocytes de souris déficientes en PEX-5 présentant des troubles de la biogenèse des peroxysomes, une altération de la ß-oxydation peroxisomale et l'accumulation de C24:0 et C26:0 **(Dirkx *et al.*, 2005).** De telles perturbations du niveau de l'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial pouvant conduire à une réduction de la synthèse de l'ATP est considérée comme un phénomène impliqué dans l'apparition des dommages trouvés au niveau du cerveau de patients atteints de MA (**Blass *et al.*, 2000**). Par ailleurs, l'utilisation de modèles des cellules cybrides formées par la transformation des cellules cultivables, privées de leur ADN mitochondrial endogène, par un ADN mitochondrial provenant de patients atteints de MA, a aussi permis de souligner l'importance du dysfonctionnement mitochondrial dans la pathogénie de la MA (**Cardoso *et al.*, 2004; Yao e*t al.*, 2009**). Les cellules cybrides de MA présentent une diminution du potentiel mitochondrial, une diminution de la mobilité mitochondriale, un stress oxydant accru et une augmentation de la production d'Aβ.

Par rapport aux connaissances actuelles, l'étude réalisée sur les cellules SK-N-BE a apporté des éléments nouveaux sur les effets des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 au niveau de la mitochondrie : la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial mesurée par coloration au $DiOC_6(3)$ pourrait être la conséquence de modifications survenant au niveau des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (**Galea *et al.*, 2012**)**.** Cette perturbation de la chaîne respiratoire conduirait alors à une accumulation d'anions superoxydes au niveau de la mitochondrie révélée par coloration au Mitotracker Red

(**Zarrouk *et al*., 2012**). Toutefois, la part prise directement par la mitochondrie dans le stress oxydant global ne serait que mineure dans la mesure où la proportion de cellules colorées par le MitoSox Red (permettant de mesurer la surproduction d'anions superoxydes mitochondriaux) est plus faible que celle révélée par la dihydroéthidine (permettant de mesurer la surproduction d'anions superoxydes totaux au niveau intracellulaire). En fait, en accord avec l'hypothèse émise par **Galea *et al***. (**2012**) et l'hypothèse du 'Three Hit Hypothesis' proposée par **Singh & Pujol** (**2010**) dans le processus de lipotoxicité des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0, le stress oxydant généré par ces derniers pourrait conduire à des carbonylations de protéines de la chaîne respiratoire, qui devenant ainsi non fonctionnelles, s'opposerait au transport d'électrons réduisant ainsi le gradient de protons, le potentiel transmembranaire mitochondrial et par conséquent la production d'ATP. Il n'est pas à exclure que les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 aient aussi des propriétés découplantes s'opposant ainsi à la phosphorylation oxydative.

Le stress oxydant induit par le C22:0 et les AGTLCs (C24:0 et C26:0) pourrait donc être un élément majeur de leur lipotoxicité activant la cascade d'évènements aboutissant à la neurodégénrescence.

La chute de potentiel transmembranaire mitochondrial étant un élément déclenchant incontournable des différents types de mort actuellement répertoriés dont les plus connus sont l'apotose (mort cellulaire de type I), l'autophagie (mort cellulaire de type II), la nécrose (mort cellulaire de type III) et la nécroptose (**Kroemer *et al*., 2008 ; Kroemer *et al*., 2009**), des éléments permettant de caractériser la mort cellulaire induite par les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 ont été recherchés. En accord avec les résultats obtenus par **Kahn *et al*. (2011)** sur oligodendrocytes murins 158N, aucun indice ne permet de conclure à une mort par apoptose : absence de cellules avec des noyaux condensés et/ou fragmentés révélés par coloration au Hoechst 33342 et par microscopie électronique à transmission (**Lizard *et al*., 1995**) et absence de cellules en Sub-G1 révélées par cytométrie en flux après coloration à l'iodure de propidium et constituant un indice de fragmentation inter-nucléosomal de l'ADN (**Founel *et al*., 1995**). L'augmentation de perméabilité à l'iodure de propidium, observée dans les cellules en nécrose primaire et secondaire (nécrose faisant suite à l'apoptose) et le relargage de LDH dans le milieu de culture sont plutôt considérés comme des indices de nécrose ou de forme apparentée (nécroptose) (**Kroemer *et al*., 2009**).

2. Effets des acides gras C22:0, C24:0 ou C26:0 sur le lysosome et l'activation de la mort cellulaire

En raison de l'identification par microscopie électronique de vacuoles de structures et de tailles variables dans les cellules SK-N-BE traitées par C22:0, C24:0 ou C26:0, une implication des lysosomes a été supposée dans la mort cellulaire compte tenu des résultats analogues obtenus sur oligodedrocytes murins 158N (**Baarine *et al*, 2012**). Sur ces cellules, les vacuoles observées par microscopie électronique à transmission sont en effet associées à une déstabilisation de la membrane lysosomale pouvant favoriser le relargage dans le cytoplasme d'enzymes protéolytiques entrainant la dépolarisation des mitochondries et contribuant à la nécrose (**Kroemer *et al*., 2008**). Par ailleurs, sachant que les lysosomes contribuent à la formation des vésicules d'autophagie par fusion avec l'autophagosome ***(Choi Ryter & Levine, 2013)***, l'implication de l'autophagie dans la mort cellulaire induite par les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 a été abordée en utilisant la protéine LC3II, résultant de l'association de la protéine LC3I avec un phosphatidylétahnolamine comme marqueur de l'autophagie. Les résultats préliminaires obtenus, montrant la présence de LC3II, sont en faveur d'un processus d'autophagie associée à un processus de nécrose. Il reste à définir si cette autophagie se met en place pour contribuer à la mort cellulaire ou pour s'y opposer. Tout comme dans le cas de la mort cellulaire induite par les oxystérols oxydés en C7 sur des cellules monocytaires U937, il reste à préciser les relations entre autophagie, mort cellulaire et stress oxydant (**Monier *et al*., 2003**). A l'instar du processus de mort complexe induit par les oxystérols sur cellules U937 pour lequel le terme 'oxiapoptophagy' (OXIdation, APOPTOsis, and autoPHAGY) a été proposé (**Monier *et al*., 2003**), le terme 'oxinecrophagy '(OXIdation, NECROsis and autoPHAGY) est suggéré pour la mort cellulaire induite par le C22:0, C24:0 et C26:0.

3. Effets des acides gras C22:0, C24:0 ou C26:0 sur le peroxysome

Le peroxysome, un organite impliqué dans le métabolisme lipidique en assurant la β-oxydation des AGTLCs, l'α-oxydation de l'acide phytanique, la synthèse du DHA et des plasmalogènes ainsi que la dégradation du peroxyde d'hydrogène via la catalase. La présence de NO synthase inductible au niveau du peroxysome contribue aussi à la synthèse de NO **(Trompier *et al*., 2013**). De même, cet organite assure la dégradation de certains eicosanoïdes (leucotriènes) (**Diczfalusy, 1994**) qui sont des médiateurs lipidiques importants de

l'inflammation. Ces médiateurs jouent des rôles de chémoattractants lymphocytaires (**Funk, 2001**).

L'accumulation des AGs (C22:0, C24:0 ou C26:0) au niveau des lésions de cerveaux de malades MA suggère une éventuelle altération du métabolisme des peroxysomes dans cette maladie (**Lizard *et al*., 2012**). Cette perturbation du métabolisme peroxysomal pourrait être accentuée par la désorganisation du cytosquelette induite par le traitement avec les AGs, l'activité peroxysomale dépendant de l'association du peroxysome aux microtubules (**Shrader *et al*., 2000**). Afin d'évaluer le métabolisme du peroxysome en présence de C22:0, C24:0 et C26:0, une évaluation de l'expression de certains marqueurs peroxysomaux a été réalisée : quantification du transporteur ABCD3, constituant majeur de la membrane peroxysomale ; de l'Acyl-CoA oxydase-1 (ACOX-1), qui catalyse la première étape de la β-oxydation peroxysomale ; de la catalase, principale enzyme de détoxification au niveau du peroxysome (**Schrader & Fahimi., 2008**).

Le traitement des SK-N-BE avec les AGs suivi de l'observation des cellules immunomarquées en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre ABCD3 a montré une ponctuation plus importante dans les cellules traitées. Cette observation a été confirmée par cytométrie en flux avec laquelle une augmentation significative de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) a été révélée. Les AGs pourraient ainsi favoriser l'augmentation du nombre de peroxysomes dans les cellules. Par ailleurs, l'immunomarquage de la catalase et l'observation par microscopie à fluorescence conventionnelle ou confocale a montré l'apparition d'amas de peroxysomes à la périphérie des cellules traitées en particulier avec le C22:0. Par analyse au cytomètre en flux, une augmentation significative de l'expression de la catalase a été observée en présence du C22:0 (10, 20 µM) alors que le traitement avec C24:0 et C26:0 induit dès 5 µM une diminution significative de l'expression de cette enzyme. En revanche, aucune modification de l'expression d'ACOX-1 n'est observée entre cellules contrôles et cellules traitées par les AGs. Dans leur ensemble, il semble donc qu'en fonction du type d'AGs considéré, les effets sur l'expression de marqueurs du peroxysome puissent varier. Par conséquent, *in vivo*, la prolifération ou non du peroxysome et la modulation de l'expression de certains de ses marqueurs pourrait dépendre du ratio entre les différents AGs.

Par ailleurs, la mesure du taux de C22:0, C24:0 et C26:0 par CPG/SM après traitement des SK-N-BE avec 10 µM d'AGs montre qu'après traitement des cellules avec C22:0, une accumulation importante du C24:0 et du C26:0 survient. De plus, après traitement avec le

C24:0, non seulement le C24:0 s'accumule, mais une augmentation du C26:0 est aussi révélée. L'accumulation du ces AGs suggère l'activation d'enzymes impliquées dans l'élongation des AGs et notamment de l'enzyme ELOVL1 localisée au niveau du réticulum endoplasmique (**Kemp & Wanders, 2010**). Le traitement avec le C24:0 induit aussi une surproduction du C22:0 dont l'accumulation peut être expliquée par le fait qu'un excès de substrat (C24:0) provoque une activation de la β-oxydation peroxysomale et par conséquent l'accumulation de métabolites intermédiaires de dégradation comme le C22:0.

Le dosage de la quantité de C26:0 dans les SK-N-BE après traitement au C26:0 (10 µM) met en évidence une accumulation de C26:0, ainsi qu'une augmentation de C24:0. Ceci peut être expliqué par le fait qu'un excès de C26:0 pourrait aussi provoquer une activation de la β-oxydation peroxysomale et par conséquent l'accumulation de métabolites intermédiaires de dégradation comme le C24:0.

Les plasmalogènes sont aussi des lipides impliquant le peroxysome. Les deux premières enzymes de leur synthèse sont localisées dans le peroxysome, les autres dans le réticulum endoplasmique (**Brites *et al.*, 2004**). En raison de leur liaison vinyle éther, les plasmalogènes assurent différents fonctions au sein de la cellule. Ils contribuent à l'intégrité de la structure membranaire, ils sont impliqués dans multiples fonctions cellulaires comme la formation des vésicules et la fusion des membranes et le transport des ions. La présence de la liaison vinyle éther confère une propriété anti-oxydante importante à ces molécules ce qui réduit les dommages provoquées par les radicaux libres.

Les plasmalogènes ont été dosés dans les cellules SK-N-BE traitées avec 10 µM d'AGs. Une diminution des plasmalogènes totaux a été observée en présence de C22:0 et C26:0 alors qu'une augmentation est remarquée avec le C24:0. Suite au traitement avec le C22:0 et le C26:0, une diminution des plasmalogènes à C16:0, C18:0 et C18:1 s'est révélée significative. En revanche, le C24:0 semble avoir un effet inverse avec une augmentation des plasmalogènes en particulier les plasmalogènes 16:0/20:4 et 16:0/18:1, 18:1/20:4 et 18:1/18:1. En raison de la multitude de fonctions attribuées à cette classe de molécules, un déficit au niveau de la concentration intracellulaire des plasmalogènes est en faveur d'une rupture de l'équilibre RedOx comme cela a été suggéré dans des peroxysomopathies telles que le syndrome de Zellweger, la maladie Refsum infantile et la maladie de Niemann-Pick type C, le syndrome de Down et la MA. Une réduction du plasmalogène éthanolamine a également été observée dans les cerveaux de patients MA, dans le sérum de sujets souffrants de MA, de

maladie cardiovasculaire et de cancer (**Ginsberg *et al.*, 1995 ;Farooqui *et al*., 1997; Guan *et al.*, 1999 ; Han *et al*, 2001; Mankidy *et al*., 2010**). Toutefois, **Pettegrew *et al*. (2001)** n'ont rapporté aucune différence de plasmalogènes chez les patients MA. Si les plasmalogènes ont leurs synthèses modulées en fonction du stress oxydant, il est possible que la variabilité puisse dépendre du statut oxydatif des patients et puisse entrainer des différences d'une étude à l'autre. Actuellement, la réduction des taux de plasmalogènes est considérée comme une conséquence de l'atteinte par la MA.

Il a par ailleurs été montré que les plasmalogènes affectent directement l'activité γ-secrétase sans avoir un effet sur le niveau d'expression protéique ou d'ARN des secrétases (**Rothhaar *et al*., 2012)** Ces molécules pourraient ainsi diminuer l'activité γ-secrétase dans les cerveaux de patients MA soulignant l'impact de plasmalogènes dans cette maladie. Comme tous les plasmalogènes testés ont montré une diminution de l'activité γ-secrétase indépendamment de l'AG qu'ils portent, cela démontre que l'effet observé n'est pas fonction de l'AG mais de la liaison vinyle éther (**Rothhaar *et al*., 2012)**.

Compte tenu du rôle joué par le peroxysome dans la synthèse du DHA (C22:6 n-3) dont la dernière étape de synthèse s'effectue dans le peroxysome suite à un cycle de β-oxydation à partir de son précurseur le C24:6 n-3; une quantification par CPG/SM du DHA et du C24:6 n-3 a été réalisée dans les cellules SK-N-BE traitées avec les AGs (10 µM). Cela a montré une diminution significative du taux intracellulaire de DHA, en particulier avec le C26:0, ce qui reflète la capacité de cet AGTLC à perturber la β-oxydation peroxysomale. De plus, le traitement avec le C26:0 induit une diminution significative de la quantité de C20:5 précurseur aussi du DHA.

Un autre rôle important du peroxysome concerne ses fonctions dans le contrôle de l'inflammation non cytokinique. En effet, le peroxysome est impliqué dans le métabolisme des leucotriènes (LTs), médiateurs lipidiques obtenus après oxydation de l'acide arachidonique par la 5-lipoxygénase tel que le LTB4 (**Jedlitschky *et al*., 1991**). Il était donc important de considérer l'impact des AGs sur la production de LTB4. Le traitement par les AGs a montré une augmentation significative du taux de LTB-4 dans les cellules traitées avec le C24:0 et avec le C26:0 (5 µM). Ceci est en accord avec les études évoquant que le taux des leucotriènes et notamment de LTB4, considéré comme une des substances chimiotactiques les plus puissantes, augmente dans certaines maladies peroxysomales ; en effet, dans ces maladies génétiques peroxysomales les taux d'AGTLCs plasmatiques et tissulaires sont

considérablement élevés (**Mayatepek *et al.*, 1993; Johansson *et al.*, 2010**). Une accumulation des eicosanoïdes a également été rapportée par **Mayatepek & Tiepelmann** dans le cas de dysfonctionnements primaires ou secondaires du peroxysome au niveau hépatique chez des patients souffrant du syndrome de Zellweger (**Mayatepek & Tiepelmann, 1996**), ainsi que dans le liquide céphalorachidien de patients atteints d'X-ALD (**Mayatepek & Tiepelmann, 2003**).

Dans leur ensemble, les résultats obtenus sur cellules SK-N-BE montrent que les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 affectent le peroxysome de façon variable d'un acide gras à l'autre. Ces effets concernent la biogénèse du peroxysome, l'expression de certains de ses constituants protéiques ainsi que ses fonctions : β-oxydation peroxysomale intervenant dans la synthèse de DHA, synthèse de plasmalogènes impliqué dans l'équilibre RedOx et contrôle de l'inflammation non cytokinique via LTB4.

4. Effet des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur la morphologie cellulaire et l'organisation du cytosquelette

Une estimation de la morphologie et de l'ultrastructure des cellules a été réalisée en ayant recourt à la microscopie en contraste de phase et à la microscopie électronique à transmission. Sous l'effet du traitement avec les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0, une augmentation dose dépendante du nombre des cellules rondes correspondants à des cellules mourantes est révélée dès 5 µM. La présence de cellules rondes est marquée avec C22:0 (20 µM) concentration à laquelle de nombreuses cellules décollées et formant des amas sont observées (**Zarrouk *et al.*, 2012**).

Ces modifications de la morphologie cellulaire suggèrent une désorganisation du réseau de filaments protéiques (actine, filaments intermédiaires (neurofilaments) et microtubules) qui forment le cytosquelette des neurones, déterminent la forme de la cellule et assurent le mouvement des organites dans le cytoplasme

En effet, l'activité des mitochondries, un organite essentiel impliqué dans la production de l'énergie, le métabolisme du glucose et des lipides, l'homéostasie RedOx et le contrôle de la mort cellulaire dépend de son interaction avec l'actine et les microtubules. De plus, il a été rapporté que l'activité peroxysomale dépend de son interaction avec les microtubules. Puisque des modifications d'actine et de microtubules peuvent survenir dans des conditions normales ou pathologiques diverses (vieillissement, cancer, maladie

neurodégénératives) et en raison de la dégénérescence neurofibrillaire associée à la MA (caractérisées par l'accumulation intracellulaire de protéine tau hyperphosphosphorylée sous forme de complexe avec les microtubules), l'impact des AGTLC sur l'organisation du cytosquelette a été évaluée en prenant en compte l'organisation des filaments d'actine étudiée à l'aide de Rhodamine-phalloïdine et celle de la tubuline et des neurofilaments abordée par immunomarquage avec des anticorps spécifiques. Actine et tubuline (sous unités α et β) ont aussi été quantifié par western blotting. Pour la tubuline, un développement méthodologique basé sur l'utilisation de Tubuline Tracker Green a aussi permis de révéler les microtubules et leurs interactions avec l'actine.

En présence d'acides gras C22:0, C24:0 et C26:0, d'importantes perturbations du réseau de filaments d'actine ont été observées dans les cellules traitées avec 10 µM d'AGs particulièrement avec le C24:0 et le C26:0. Ceci est associé à une augmentation significative de la quantité d'actine-F avec le C22:0, le C24:0 et le C26:0 (5 et 20 µM) ainsi qu'avec le C26:0 (10 µM). En revanche, la quantification de l'expression protéique de la β-actine par western blotting n'a montré aucune différence entre contrôle et cellules traitées par les AGs.

L'observation des cellules SK-N-BE au microscope à fluorescence montre des perturbations du réseau de microtubules dans les cellules traitées avec les AGs en particulier à 20 µM. Des perturbations analogues ont été observées pour les neurofilaments dès 5 µM d'AGs en particulier avec C24:0 et C26:0. A ces concentrations d'AGs, les cellules SK-N-BE perdent progressivement leur forme fusiforme pour devenir rondes avec des microtubules plus ou moins absents et ou compactés et un réseau de neurofilaments désorganisé allant de pair avec une capacité d'adhésion diminuée. Une diminution de l'expression de la tubuline α et β sous l'effet du traitement avec les AGs à 5 et 10 µM est aussi révélée. Cette diminution est confirmée par western blotting où une diminution de l'expression de l'α-tubuline est remarquée pour les cellules traitées avec le C22:0 et le C24:0 (5, 10 µM).

Par ailleurs, la coloration simultanée des filaments d'actine et de tubuline en utilisant respectivement la rhodamine phalloïdine et le Tubulin Tracker Green (un fluorochrome qui produit une fluorescence verte en présence de tubuline polymérisée) montre un phénomène FRET dans les cellules traitées par le C24:0 alors que ce phénomène est absent dans les cellules contrôles. Les interactions actine-tubuline sont donc modifiées sous l'influence d'AGs.

Actuellement, plusieurs arguments sont en faveurs d'une désorganisation des protéines du cytosquelette dans la physiopathologie de la MA (**Minamide *et al*., 2000 ; Fulga *et al*., 2007**). Les molécules qui en sont issues pourraient contribuer au développement de la MA en amplifiant la déstabilisation du cytosquelette. Des analogues des corps d'Hirano (aggrégats d'actine résultant d'altération du cytosquelette) ont ainsi été trouvés quand des mutants de la protéine tau humaine ont été exprimés dans des drosophiles. D'un point de vue fonctionnel, la déstabilisation des microtubules pourraient aussi avoir des conséquences importantes sur l'activité peroxysomale. En effet, les interactions microtubules – peroxysomes semblent indispensables au maintien d'un métabolisme peroxysomal régulé (**Tirotenko & Terlecky, 2011**). Il a été suggéré que la perte d'interaction peroxysome-microtubule pourrait conduire au processus de vieillissement et à la neurodégénérescence en favorisant une hypocatalasémie (**Terlecky *et al*., 2006**). Cette diminution d'activité catalase conduisant à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène favoriserait ainsi le stress oxydant.

L'impact des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur le cytosquelette (en favorisant la désorganisation de l'actine et de la tubuline) pourrait donc participer à la neurodégénérescence fibrillaire et s'inscrit dans la physiopathologie de la MA. Par ailleurs, en raison des interactions microtubules/peroxysomes, il est possible que la désorganisation du cytosquelette modifie le métabolisme oxydatif peroxysomal et contribue à la rupture de l'équilibre RedOx en faisant appel à des mécanismes qui restent à préciser. En fonction des résultats obtenus, il serait intéressant de mieux connaitre ces relations cytosquelette-activité peroxysomale-stress oxydant qui pourraient conduire à l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques pour prévenir la tauopathie.

5. Effets des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur le stress oxydant

Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) sont les principaux acteurs du stress oxydant. Ils causent des dégâts irréversibles à la cellule et peuvent conduire à sa mort. Ces radicaux peuvent avoir des effets délétères sur la mémoire et la plasticité synaptique (**Massaad & Klann, 2010**)

Chez les patients atteints de MA, une augmentation du stress oxydant ainsi qu'une diminution des défenses anti-oxydantes totales a été rapportée ; elle est considérés comme événement déclencheur de la MA. Dans des études antérieures, il a été démontré que l'accumulation de C26:0 induit une surproduction de radicaux libres dans des cellules gliales C6 de rat (**Di Biase *et al*., 2004**) et dans des fibroblastes humains sauvages ou déficients en

ABCD1 (**Fourcade *et al.*, 2008**). Ces données suggèrent que les AGTLCs peuvent altérer l'homéostasie oxydative *in vivo* et *in vitro*. Puisque le métabolisme des AGTLCs, ainsi que les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) sont à même d'intervenir dans différentes formes de neurodégénérescences, les effets pro-oxydants des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 ont aussi été étudiés sur les cellules neuronales SK-N-BE. Comme une perturbation du statut RedOx ne peut pas être exclue même avec les faibles concentrations d'AGs, la capacité du C22:0, du C24:0 et du C26:0 à déclencher un stress oxydatif a été évaluée à 10 et 20 µM en prenant en compte les paramètres suivants : production d'ERO et ERN, défenses antioxydantes (taux de glutathion réduit (GSH), activités catalase et SOD), peroxydation lipidique (4-HNE résultant de l'oxydation des acides gras, 7-hydroxycholestérol résulatnt de l'auto-oxydation du cholestérol).

La quantité intracellulaire d'ERO produites au cours du traitement des SK-N-BE par les AGs a été déterminée par coloration au H_2DCFDA ; cette dernière est augmentée en présence d'AGs à 10 et 20 µM. A ces concentrations une surproduction d'$O_2^{\cdot -}$ intracellulaire (majeure) et mitochondriale (mineure) a été révélée dans les cellules. En revanche, la mesure de la production du monoxyde d'azote (NO) dans les cellules SK-N-BE en utilisant le DAF-FM diacétate, montre de faibles variations de sa production quelles que soient les concentrations d'AGs. Seul le traitement avec le C22:0 (20 µM) s'est révélée significatif. De plus, le dosage du H_2O_2 révèle de légères augmentations avec le C22:0 et le C26:0 à l'exception du C26:0 à 10 µM où l'augmentation s'est révélée significative. En revanche, le C24:0 induit une surproduction de H_2O_2 à partir de 5 µM.

Puisque le stress oxydant résulte d'un déséquilibre de la balance pro-oxydant/anti-oxydant, nous avons procédé à une évaluation du système anti-oxydant suite au traitement des cellules SK-N-BE avec les AGs. La surproduction des ERO et des ERN révélée après traitement aux AGs est associée à une diminution des défenses anti-oxydantes intracellulaires et en particulier du GSH, l'antioxydant intracellulaire majoritaire, soulignant l'activité pro-oxydante potentielle des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0. Ceci est en accord avec des études antérieures, réalisées sur des oligodendrocytes murins 158N et des fibroblastes humains de sujets sains ou atteints de l'X-ALD en présence de C26:0 (**Fourcade *et al.*, 2008**). En effet, l'application de 100 µM du C26:0 sur des fibroblastes Humains a montré une surproduction des ERO associée à une réduction du taux de GSH.

Le niveau de GSH a été mesuré utilisant le monochlorobimane, qui se lie aux groupes thiol par une réaction enzymatique catalysée par la glutathion-S-transférase. La diminution du niveau de GSH suite au traitement aux AGs pourrait donc être due à la diminution de l'activité de la glutathion-S-transférase. Ce niveau réduit de GSH témoignant de l'installation d'un stress oxydatif pourrait subséquemment induire l'activation d'enzymes anti-oxydantes comme la catalase. L'activité de cette enzyme a été dosée dans les cellules traitées par les AGs utilisées à 5, 10 et 20 µM. Une légère augmentation de son activité a été observée avec le C22:0 (10 µM) et le C24:0 (20 µM).

L'augmentation de l'activité catalase est concomitante à la surproduction du H_2O_2 ce qui peut être à l'origine de l'oxydation des composants cellulaires majeurs comme les lipides, les protéines et l'ADN causant leurs inactivations et leurs dégradations ultérieures. De ce fait, il était aussi important de préciser les effets de l'oxydation en termes de peroxydation lipidique par l'intermédiaire du dosage du 4-HNE, aldéhyde issu de l'oxydation des acides gras, et d'oxystérols oxydés en C7 (7-hydroxycholestérol), provenant de l'oxydation du cholestérol.

L'analyse des cellules traitées par le C22:0 et le C24:0 montre de légères augmentations de la production du 4-HNE. Une accumulation intracellulaire plus importante de cet aldéhyde est observée en présence du C26:0 à 5, 10 et 20 µM. Ces résultats indiquent une peroxydation lipidique des acides gras avec le C26:0. Le 4-HNE a déjà été identifié chez des patients atteints des maladies neurodégénératives. En effet, il a été détecté dans le cerveau de patients atteints de MA ainsi que dans le sérum où une augmentation de plus de 90% a été révélée en comparaison aux sujets contrôles (**Casado *et al.*, 2008**).

L'attaque radicalaire du cholestérol mène à l'accumulation intracellulaire d'oxystérols et en particulier de 7ß-hydroxycholesterol et le 7-cétocholestérol produits par auto-oxydation du cholestérol sur le carbone C7. Les concentrations de ces oxystérols augmentent significativement suite au traitement par les AGs (10 µM). De plus, le calcul du rapport entre le taux des dérivées oxydés du cholestérol en C7 dans les cellules traitées et le taux du cholestérol dans ces cellules révèle une augmentation significative de ce rapport témoignant d'un processus de peroxydation lipidique important. Comme les 7-hydroxycholestérols totaux ont une large gamme d'activités biologiques et sont des inducteurs puissants de la mort cellulaire (**Vejux *et al.*, 2009**), ils pourraient contribuer au processus mort déclenché par les AGs.

Ainsi, la présence de 4-HNE et des 7-hydroxycholestérols totaux dans les cellules traitées avec les AGs constituent un lien important entre le stress oxydatif et l'induction de mort cellulaire.

Bien que l'origine du stress oxydant activé par les AGs ne soit pas connue, par analogie avec les résultats obtenus sur cellules de malades X-ALD, des mécanismes analogues sont probables. Il a été rapporté que l'accumulation des AGs dans les lymphoblastes de patients X-ALD induit l'augmentation de la sous-unité catalytique de l'enzyme NADPH oxydase gp91PHOX (**Schlegel *et al.*, 1993**). Tout comme dans les lymphoblastes, la forte surproduction d'ERO observée en présence des AGs pourrait résulter de l'activation de cette enzyme qui pourrait ainsi contribuer au déclenchement de la mort cellulaire (**Laakko *et al.*, 2002**).

Il a été postulé que le stress oxydatif généré dans la mitochondrie peut réduire les activités des protéines mitochondriales suite aux modifications oxydatives que peuvent subir ces molécules (**Nulton-Persson *et al.*, 2001 ; Bulteau *et al.*, 2003 ; Starkov *et al.*, 2004 ; Tretter *et al.*, 2005**). Le stress oxydatif peut aussi provoquer des mutations au niveau de l'ADNm, qui s'avère plus sensible aux ERO que l'ADN nucléaire. Selon **Galino *et al.* (2011)**, l'excès du C26:0 dans les cellules de la moelle épinière des souris Abcd1-/- et dans les fibroblastes de patients X-ALD, pourrait induire une surproduction des ERO qui pourrait aboutir à des dégâts oxydatifs affectant les enzymes clefs de la glycolyse et du cycle de Krebs. Ces dégâts oxydatifs provoquent une réduction des activités enzymatiques aboutissant à une réduction du niveau de NADH, le substrat du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, une diminution du pouvoir réducteur de la cellule (augmentation du rapport NAD^+ /NADH) (**Ying, 2008**), ce qui pourrait contribuer à une diminution de la production d'ATP (**Ferrer, 2009; Gibson *et al.*, 2010)**. En conséquence, le taux réduit d'ATP dans les neurones diminue leur capacité à accomplir leurs activités physiologiques comme la transmission synaptique et le transport axonal, ce qui pourrait mener à une dégénérescence des terminaisons nerveuses ou à un dysfonctionnement neuronal progressif comme dans la majorité des maladies neurodégénératives.

L'effet délétère du stress oxydant sur les neurones est conforté par plusieurs arguments. Au niveau membranaire les protéines et les lipides peuvent être modifiées par les produits de la peroxydation lipidique et activer différents voies métabolismes contribuant à la mort cellulaire (**Awasthi *et al.*, 2003**). Par ailleurs, la surproduction des ERO étant

concomitante avec la chute de ΔΨm, celle-ci pourrait contribuer à des altérations mitochondriales aboutissant à la mort cellulaire. De plus, la surproduction d'ERO et leur capacité de réaction avec les macromolécules pourrait induire diverses modifications du cytosquelette puisque les ERO pourraient réagir sur les composantes du cytosquelette en les modifiant par carbonylation ou via différentes voies métaboliques (**Lum *et al*., 2001 ; Zahm *et al*., 2003).**

Ces résultats obtenus sur cellules SK-N-BE sont en faveur d'un fort potentiel pro-oxydant des AGs C22:0, C24:0 et C26:0 à même de conduire à des modifications cellulaires majeures pouvant favoriser la MA (neurodégénrescence fibrillaire, mort neuronale).

Identifier des cibles thérapeutiques liées à la surproduction d'ERO et des molécules capables de les inhiber pourraient donc avoir un intérêt pharmacologique important pour l'ensemble des maladies neurodégénératives associées à une augmentation d'AGs C22:0, C24:0 ou C26:0.

6. Effet des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'inflammation

De nombreuses études ont montré que des processus de neuroinflammation contribuent à la pathogénie de la MA (**Cuenca-López *et al*., 2010; Daniela & Norbert, 2010; Gorelick, 2010; Medeiros *et al*., 2010; Wyss-Coray, 2006; Zotova *et al*., 2010**). De plus, une inflammation chronique a été observée dans les cerveaux des patients atteints de MA : accumulation de cellules microgliales autour des plaques séniles et niveaux élevés de cytokines, de chémokines, de protéases et d'ERO autours de ces dernières (**Daniela & Norbert, 2010; Giunta *et al*., 2008)**.

L'évaluation de l'incidence du traitement aux AGs sur la production de cytokines (IL6, IL8, IL1β, IL10, TNF-α et IL12p70), de LTB-4 et de 15-(S)-HETE par les cellules SK-N-BE, traitées les AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) n'a montré aucune modification du taux de sécrétion de cytokines. En revanche, le dosage du LTB4, un des facteurs chimiotactique et inflammatoire endogènes les plus puissants, a montré une production augmentée avec le C24:0 et le C26:0 (5 µM). Dans les mêmes conditions, le taux du 15(S)-HETE augmente. Ceci pourrait être le résultat d'une augmentation de l'expression et de l'activité des lipooxygénases, enzymes responsables de la production de ces molécules, comme cela a été décrit par **Pratico *et al*. (2004**). En effet, le 12-HETE et le 15-HETE sont les principaux produits de l'oxydation des acides gras polyinsaturés et en particulier l'acide arachidonique

par la 12/15 LOX dans le système nerveux central (**Nishiyama *et al*., 1992 ; Watanabe *et al*., 1993**). Cette enzyme qui est l'isoforme de la lipooxygénase est la plus abondante dans le système nerveux central. Elle a été décrite principalement dans les neurones et dans quelques cellules gliales dans l'ensemble du cerveau et dans l'hippocampe. De plus, il a été démontré que dans les régions frontales et temporales affectées des cerveaux de patients MA, la quantité de 12/15-LOX était plus haute comparativement aux contrôles **(Pratico *et al*., 2004**). A l'origine, il été suggéré que les 15HETE et la 12HETE jouent le rôle de seconds messagers dans la transmission synaptique et donc sont impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémoire (**Piomelli *et al*., 1987**). Cependant, d'autres études ont suggéré que les LOX pourraient aussi jouer un rôle dans la neurodégénérescence par leur puissant pouvoir pro-oxydant **(Pratico *et al*., 2004)**. Il n'est pas non plus à exclure que l'accumulation de LTB4 pourrait aussi résulter de dysfonctions du peroxysome dont le rôle est aussi de dégrader les leucotriènes et les prostaglandines (**Wanders & Waterham., 2006**).

La capacité des AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) à stimuler la production de LTB4 a déjà été rapportée sur différents modèles cellulaires *in vitro* et sur des modèles animaux. La stimulation de l'inflammation non cytokinique semble donc être une composante importante de la lipotoxicité de ces molécules.

Le ciblage des voies métaboliques conduisant à la surproduction de LTB4 pourrait donc aussi conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et au développement de nouveaux traitements dans le cadre de MA associée à des augmentations d'AGs (22:0, C24:0 et C26:0).

7. Evaluation des effets du DHA sur la lipotoxicité induite par les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0

Puisque un déficit en AGPI et en particulier en DHA est impliqué dans différents troubles neurologiques, dont la MA, et en se basant sur l'effet neuroprotecteur de cet AG et de ses dérivées, il était intéressant d'évaluer la capacité du DHA à atténuer les dysfonctionnements cellulaires induits par les AGs (C22:0, C24:0 et C26:0). Pour cela, les cellules SK-N-BE ont été traitées simultanément avec les AGs et le DHA utilisé à des concentrations allant de 10 à 150 µM pour tenter de corriger les effets cytotoxiques induits par les AGs,

Nos résultats montrent que le DHA peut atténuer les dysfonctionnements mitochondriaux et/ou la croissance cellulaire. En revanche, ses effets sur la surproduction d'ERO sont moins prononcés et variables d'un AG à l'autre. Il apparait par ailleurs que le DHA dès 100 µM peut stimuler la surproduction des ERO, quand il est utilisé seul, ou l'amplifier en présence de C22:0, C24:0 et C26:0. A forte concentration, le DHA pourrait aussi avoir des effets secondaires. Ceci incite à une utilisation éclairée de ce composée pour éviter de provoquer de dégâts neurologiques supplémentaires.

Ces résultats suggèrent que l''efficacité thérapeutique du DHA pourrait ainsi fortement dépendre de sa posologie et des conditions de traitement. L'effet dual du DHA (bénéfique ou délétère en fonction des concentrations utilisées), révélé dans la présente étude, pourrait expliquer, au moins en partie, les différences trouvées avec cet acide gras d'une étude clinique à un autre (**Cederholm *et al.*, 2010**). Une meilleure connaissance des effets secondaires associés à l'utilisation du DHA, de ses activités biologiques et pharmacologiques contribuerait probablement à améliorer son efficacité.

Comme il a été montré que le DHA peut neutraliser plusieurs effets du peptides Aß (**Veszelka *et al.*, 2013**) et empêcher l'hyperphosphorylation de la protéine tau (**Ma *et al.*, 2009**) son efficacité biologique n'est pas remise en doute. Des données supplémentaires sont cependant nécessaires pour déterminer son activité contre les effets délétères des AGs (C22:0, C24:0 et C26:0).

Il a été démontré que les AGTLCs peuvent subir une ω-oxydation dont les enzymes clefs sont CYP4F2 et CYP4F3B. Cette voie fournirait une alternative de dégradation des AGTLCs.

8. Incidence des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 sur l'amyloïdogenèse et la tauopathie

Dans la physiopathologie de la MA, étant donné l'importante implication des plaques séniles et de la dégénérescence neurofibrillaire résultant respectivement de dépôts extra-cellulaires d'Aβ et d'un enchevêtrement intra-cellulaire de fibrilles et de protéine tau hyperphosphorylée, il s'est avérée important d'évaluer la capacité des AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) à induire des marqueurs de la MA. Pour cela, des dosages de l'$A\beta_{1-42}$ et de la protéines tau totale et phosphorylée ont été réalisés sur cellules SK-N-BE traitées par les AGs (10 µM). Une augmentation du taux de la protéine tau phosphorylée a été observée avec le C24:0 et le

C26:0 (10 µM). Une augmentation du taux d'$A\beta_{1-42}$ a également été révélée. Cette augmentation est significative avec le C24:0 (10 µM). En revanche, la quantification par RT-qPCR de l'expression de certains gènes impliqués dans la voie de clivage de l'APP et de la synthèse de l'Aβ (APP, α-secrétase et β-secrétase) n'a pas montré de variation significatives suggérant que les AGs agiraient en modifiant l'expression protéique ou l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse d'Aβ et mais non sur leur expression génique.

En fonction des résultats obtenus, il existe donc des relations entre lipotoxicité induite par les AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) et amyloïdogenèse.

9. Evaluation de l'implication d'Aβ1-40 dans l'accumulation de C22:0, C24:0 et C26:0

Il a été suggéré que la toxicité de l'Aβ serait liée à une stimulation de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires synaptiques, à une atteinte radicalaire des protéines, de l'ADN nucléaire ou de l'ADN mitochondrial, à une stimulation de la production de radicaux libres dans les cellules microgliales, mais aussi à une atteinte de type pro-inflammatoire des cellules endothéliales vasculaires. Par ailleurs, des effets de l'Aβ sur l'altération de la glycolyse neuronale et les troubles du cytosquelette ont également été notés (**Grundman *et al.*, 2000** ; **Stephan *et al.*, 2001** ; **Casley *et al.*, 2002; Crouch *et al.*, 2005**)

Dans cette étude, une évaluation de la toxicité *d*'$A\beta_{1-40}$ oligomérisé a été réalisé sur les cellules SK-N-BE. L'influence de ce peptide a été précisée sur la prolifération cellulaire, sur le métabolisme mitochondrial ainsi que sur l'accumulation intracellulaire d'AGTLCs et de dérivés oxydés du cholestérol.

L'$A\beta_{1-40}$ oligomérisé utilisé sur les cellules SK-N-BE s'est montré toxique. En effet, le dosage de l'activité LDH dans le milieu de culture a montré une augmentation de l'activité de cette enzyme dont la libération dans le milieu de culture est un signe de mort cellulaire de type nécrotique. De plus, l'évaluation de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale a révélé une diminution de cette activité suggérant qu'$A\beta_{1-40}$ agirait en perturbant le métabolisme mitochondrial. L'impact mitochondrial d'$A\beta_{1-40}$ est conforté par le dosage d'ATP qui augmente d'$A\beta_{1-40.}$à 10 µM.

Par ailleurs, l'évaluation de l'impact d'$A\beta_{1-40}$ sur le métabolisme lipidique réalisée par mesure de la concentration intracellulaire des AGTLCs (C24:0, C26:0), de l'AA (C20:4), du DHA (C22:6 n-3) et de son précurseur (C24:6 n-3) révèle une augmentation de la quantité des

AGTLCs dans les cellules traitées avec 10 µM d'$A\beta_{1-40}$. Cette augmentation n'est significative que pour le C20:4, le C22:0 et le C22:6.

Ces résultats soulignent qu'$A\beta_{1-40}$ pourrait perturber le métabolisme des AGs dont le métabolisme est associé à l'activité peroxysomale, peut-être en altérant la β-oxydation des AGTLCs selon des mécanismes qui restent à préciser.

Récemment, une relation entre prolifération des peroxysomes et réduction de la toxicité du peptide amyloïde a été décrite par **Inestrosa *et al.* (2013**) suggérant que les proliférateurs de peroxysomes agiraient en augmentant la clearance de l'Aβ du cerveau. De plus, une atténuation de la toxicité du peptide amyloïde été montrée dans les neurones de l'hippocampe en culture par un mécanisme dépendant de PPARα.

Par ailleurs, le traitement des cellules SK-N-BE avec $A\beta_{1-40}$ génère un stress oxydant comme le prouve la surproduction des dérivées oxydés du cholestérol en C7 et l'augmentation du rapport entre le taux de ces oxystérols et le taux du cholestérol dans les cellules contrôles et traitées.

L'$A\beta_{1-40}$ est donc capable de provoquer une mort cellulaire en perturbant le métabolisme peroxysomal et en induisant une accumulation d'AGTLCs. Ces derniers, ainsi que les oxystérols générés, pourraient être à l'origine d'une altération du fonctionnement des mitochondries, d'une désorganisation du cytosquelette et d'une induction du stress oxydant conduisant à la mort cellulaire.

En fonction des résultats obtenus, il existe donc des relations entre toxicité induite par $A\beta_{1-40}$ et accumulation d'AGs (C22:0, C24:0 et C26:0).

10. Hypothèse intégrant l'effet des Acides gras sur l'amyloidogenèse et de l'amyloidogenèse sur le métabolisme des Acides gras

Dans leur ensemble, les résultats obtenus permettent d'élaborer une hypothèse intégrant les effets des AGs sur l'amyloïdogénèse et de l'amyloïdogénèse sur le métabolisme des AGs. Cette hypothèse est résumée dans la Figure 87 suivante.

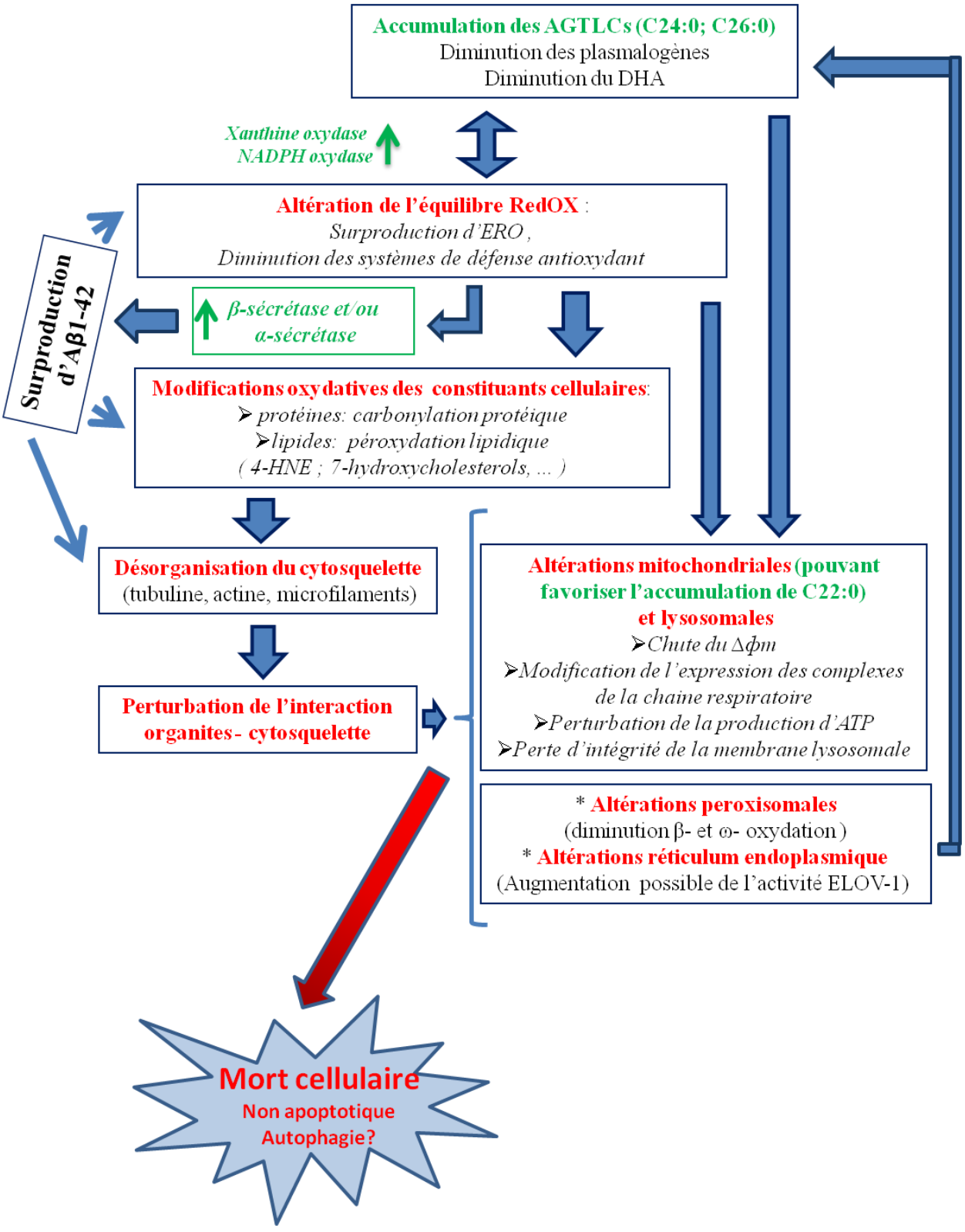


Figure 87: Effets des AGs sur l'amyloïdogenèse et de l'amyloïdogenèse sur le métabolisme des AGs. L'étude clinique a révélé des augmentations d'AGTLCs (C24:0 ; C26:0) au niveau plasmatique et de leur précurseur C22:0 ainsi qu'une diminution du DHA et des plasmalogènes. Cela a conduit à caractériser l'incidence de ces AGs sur des cellules neuronales humaines SK-N-BE en prenant en compte des paramètres associés à la

neurodégénéréscence dans la MA. Les AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) induisent une rupture de l'équilibre RedOx associée à une surproduction d'ERO (pouvant résulter d'une augmentation d'activité xanthine oxydase et/ou NADPHoxydase) et à une diminution des systèmes de défenses antioxydants. Le stress oxydatif induirait des dommages au niveau des constituants cellulaires : peroxydation des lipides ; carbonylation des protéines telles que celles contribuant à la formation du cytosquelette ce qui pourrait engendrer la désorganisation de ce dernier conduisant à des perturbations des interactions organites (peroxysomes, mitochondries)-cytosquelette. Comme le bon fonctionnement de ces organites dépend de leur interaction et de leur mobilité au niveau du cytosquelette, une altération de l'intégrité de ce réseau, induirait des dysfonctionnements pouvant conduire à la mort neuronale. Au niveau mitochondrial ; la chute de $\Delta\phi m$ pourrait favoriser une accumulation d'électrons contribuant à la formation d'anions superoxydes conduisant à la production d'autres ERO. Ceux-ci pourraient induire l'oxydation de protéines mitochondriales dont celles de la chaîne respiratoire ce qui perturberait la production d'ATP. Ce dysfonctionnement mitochondrial pourrait aussi conduire à l'accumulation du C22:0 car ce dernier, contrairement au C24:0 et C26:0 (dégradés uniquement par β-oxydation peroxysomale) est essentiellement métabolisé par β-oxydation mitochondriale. Chronologiquement, *in vivo*, la diminution de l'activité peroxysomale observée avec l'âge, pourrait donc mener à une accumulation initiale de C24:0 et C26:0 favorisant secondairement une accumulation de C22:0. Dans les mécanismes conduisant à l'accumulation de C24:0 et de C26:0, il faut aussi tenir compte d'augmentation possible d'activité ELOV-L1 mais aussi d'une déficience du catabolisme des acides gras C24:0 et C26:0 par ω-oxydation via l'enzyme peroxysomale CYP4F2. Les dysfonctionnements mitochondriaux, peroxysomaux et lysosomaux (initiés et/ou amplifiés par le stress oxydatif) contribueraient alors à la désorganisation du cytosquelette qui s'inscrit dans la neurodégénéréscence4 fibrillaire, caractéristique de la MA. Le stress oxydatif (en agissant sur l'activité d'enzymes impliquées dans le clivage de l'APP telle que la β sécrétase) pourrait par ailleurs contribuer à stimuler la production d'amyloïdes Aβ1-42, fortement agrégeants, constituant essentiel des dépôts amyloïdes et des plaques séniles observées au niveau des lésions cérébrales de MA. Par ailleurs, il n'est pas à exclure que l'$A\beta_{1\text{-}42}$ puisse aussi influencer l'accumulation des AGs (C22:0, C24:0 et C26:0).

Sur la base des résultats obtenus, le stress oxydatif serait donc un élément important permettant de relier les activités biologiques des AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) et l'amyloïdogenèse (et vice versa). L'identification de molécules (synthétiques ou naturelles)

traversant la barrière hémato méningée et capables de s'opposer à cet effet pourrait donc avoir un réel intérêt thérapeutique dans la MA pour laquelle aucun traitement efficace n'existe actuellement.

II Validation d'un modèle Alzheimer de souris transgénique APP PS1 ΔE9 pour l'étude du métabolisme des lipides en relation avec le métabolisme peroxysomal

Plusieurs études *in vitro* et cliniques sont en faveur d'une intervention de dysfonctions du peroxysomes dans la MA (**Lizard *et al.*, 2011**). Les études cliniques les plus anciennes faisaient références à des modifications de plasmalogènes et de DHA dont la synthèse implique en partie le peroxysome (**Wanders & Waterham., 2006**). L'étude réalisée sur cerveau humains de sujets atteints de MA au stade V et VI de la classification de Braak (**Kou *et al.*, 2011**) montrant une accumulation d'acides gras C22:0 et d'AGTLCs (C24:0 et C26:0), dont le catabolisme est assuré, tout ou en partie par une β-oxydation peroxysomale, a conduit a un regain d'intérêt pour préciser l'implication du peroxysome dans la neurodégénérescence associée à la MA. Plusieurs modèles murins font aussi référence à une intervention probable du peroxysome dans le développement de la MA (**Cimini *et al.*, 2009, Farnelli *et al.*, 2013**). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de l'activité peroxysomale chez le rat favorise l'amyloïdogenèse et la tauopathie (**Shi *et al.*, 2012**). Toutefois, malgrè l'intérêt de ces modèles animaux, aucune information n'est disponible sur leurs profils lipidiques. Malgré l'intérêt porté à l'étude du lipidome dans de nombreuses pathologies et malgré une composante vasculaire dans certaines formes de MA, aucune étude lipidomique complète n'a été entreprise à ce jour sur des modèles animaux alors que de plus en plus d'arguments sont en faveurs de dysrégulations du métabolisme lipidique dans plusieurs formes de neurodégénérescences.

Pour tenter de palier cette lacune, nous avons entrepris de mieux caractériser une lignée de souris transgénique (APP PS1 ΔE9) développant des signes marqués de la MA par différentes méthodes : immunohistochimie sur coupes de cerveaux inclus en paraffine, profil d'acides gras par GC/MS sur extraits lipidiques de cerveaux totaux.

Les plaques amyloïdes ont été révélées par coloration à la Thiflavine T et au Rouge Congo ainsi qu'à l'aide d'anticorps anti-Aβ. La dégénérescence neurofibrillaire a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-tau phosphorylé. Les souris APP PS1 ΔE9 utilisées (souris femelles âgées de 12 mois) présentent des dépôts amyloïdes nombreux et de nombreux

enchevêtrements neurofibrillaires validant le développement de la MA. Aucun signe histologique de MA n'est révélé chez les souris sauvages du même âge.

Sur les souris transgéniques et sauvages des marqueurs du peroxysomes ont été recherchés par immunohistochimie afin d'établir une cartographie de l'expression des peroxysomes au niveau du cerveau. En accord avec des résultats obtenus par hybridation *in situ* (**Trompier *et al*., 2013**), des peroxysomes en quantité abondantes ont été identifiés au niveau de l'hippocampe et du cervelet (couche granuleuse) de ces souris. Au niveau du cervelet, les cellules de Purkinje sont toujours fortement colorées par les anticorps dirigés contre des constituants peroxysomaux (ABCD1, ABCD2, ABCD3, ACOX1, catalase). Il n'a pas été noté de différence visuelles notables entre souris Alzheimer et souris sauvages.

Les modifications mitochondriales abordées via un anticorps dirigé contre le cytochrome c ont fourni de bons immunomarquages sans révéler de différences d'un type de souris à l'autre.

Par ailleurs, des constituants du cytosquelette (microtubules, actine, neurofilaments) ont été utilisés pour aborder la neurodégénérescence fibrillaire. L'utilisation de coupes sagittales, bien adaptée à la révélation de dépôts amyloïdes et de peroxysomes, s'est montrée d'un intérêt limité pour aborder la neurodégénérescence fibrillaire via l'utilisation d'anticorps dirigés contre les constituants du cytosquelette en raison de l'orientation concentrique des neurones. Avec ces anticorps, des coupes frontales seraient plus appropriées.

De façon inattendue, des coupes déparaffinées ont pu être colorées à l'aide de fluorochromes dirigés contre des lipides neutres et polaires. Hors, dans les conditions expérimentales utilisées, le déparaffinage conduit à une élimination des lipides. Si des lipides sont détectés de façon préférentielle sur cerveaux de souris transgéniques, cela suggère des liaisons covalentes lipides-protéines qui pourraient être des bases de Schiff résultant de la réaction de produits de dégradation des lipides (aldéhydes) avec des fonctions amines des protéines.

L'analyse par CPG/SM bien que réalisée uniquement sur un cerveau de souris transgénique versus un cerveau de souris sauvage ne permet pas de conclure de manière franche sur des dysfonctions de métabolisme peroxysomal chez les souris transgéniques même si des différences notables dans les profils d'acides gras sont observés. Il est donc nécessaire d'envisager des analyses complémentaires sur un nombre d'échantillons plus

important et d'utiliser d'autres modèles de souris transgéniques développant à la fois une amyloïdogenèse et une Tauopathie puisque le modèle utilisé dans cette étude combine la mutation suédoise de l'APP humaine et la mutation ΔE9 (délétion au niveau de l'exon 9) de la PS1. La combinaison de ces deux mutations accélère l'apparition des dépôts amyloïdes mais n'est pas particulièrement appropriée pour l'évaluation de la tauopathie.

La caractérisation de ce modèle de souris transgéniques a plusieurs intérêts : meilleures connaissances de l'implication des lipides dans la physiopathologie de la MA, identification de voies métaboliques pouvant servir de cible thérapeutiques, utilisation du modèle animale pour le développement de nouveaux traitements de la MA ciblant le métabolisme des lipides.

III Etude clinique

Avec le vieillissement de la population mondiale, les démences et les syndromes apparentés sont devenus des problèmes prioritaires de santé publique. En Tunisie, la proportion des personnes âgées de plus de 60 ans est passée de 4,1% en 1956 à 9,3% en 2004 et sera de 13% en 2019. Ceci s'accompagne en conséquence d'une progression de la prévalence des démences. Cette prévalence était de 3,7% en 2003 **(Hajjem *et al* ., 2008**). En raison du coût élevé de ces maladies en termes de structures d'accueil, d'accompagnement et de soins, il est important de mieux en connaitre la physiopathologie non seulement dans un but curatif mais aussi préventif. Si certains facteurs de risque génétiques sont avérés, tels que le polymorphisme de l'APOE (**Ertekin-Taner, 2007**), l'incidence des habitudes de vie (nutrition, alcoolisme, tabagisme, stress) sont à considérer.

Pour mieux connaitre les facteurs associés aux démences (MA, démences vasculaires, autres démences), une étude a donc été entreprise sur des malades tunisiens recrutés au service de neurologie de Mme le Prof Mahbouba FRIH de l'hôpital Fatouma Bourguiba (Monastir) de janvier à juillet 2011.

Cette étude a été réalisée sur des plasmas et des érythrocytes. Elle a inclus plusieurs paramètres conventionnels (bilan lipidique, rénale, hépatique, glycémie).

Les objectifs de cette étude réalisée chez des déments (MA, démences vasculaires, autres démences) versus sujets non déments appartenant à la même tranche d'âge ont consisté :

i. à définir le profil en acides gras au niveau plasmatique et érythrocytaire,
ii. à caractériser le stress le stress oxydant au niveau plasmatique et érythrocytaire,
iii. à quantifier certains marqueurs majeurs de l'inflammation (Cytokines pro-inflammatoires : IL1-β, TNF-α ; protéine C réactive (CRP)) au niveau plasmatique.

Les paramètres conventionnels relatifs à cette étude ont permis de bien caractériser la population de malades étudiés.

- ✓ **Age et habitudes de vie (consommation d'alcool, tabagisme) de la population de malades déments étudiés**

Dans le cadre de l'étude réalisée, l'âge moyen de nos patients était de 71 ans avec un début des symptômes entre 65 et 74 ans (42,2 % des patients). Pour les patients atteints par la MA, la maladie débute majoritairement dans la tranche d'âge comprise entre 65 et 74 ans. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés en Tunisie par **Cheour *et al*. (2006).** L'étude coopérative Européenne de **Lobo *et al*. (2000)** a montré que la tranche d'âge la plus touchée par les démences est située entre 75 et 79 ans. Par ailleurs, l'âge moyen de la population dans l'étude PAQUID était de 82,3 ans. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'espérance de vie qui est plus courte en Tunisie (74,3 ans en 2008 selon l'Institut National de Statistiques). Par ailleurs, dans notre population, une légère prédominance masculine est constatée ceci n'est pas concordant avec les données de la littérature. En effet, une fréquence plus importante de la démence est décrite chez les femmes dans diverses méta-analyses. L'étude PAQUID a conclu que ceci n'est observé qu'après 80 ans. Le risque relatif de développer une MA pour une femme é été estimé à 0,82 à 75 ans et à 1,71 à 85 ans par rapport à un homme de même âge.

En Tunisie, les études descriptives réalisées ont signalé une différence de la prévalence selon le sexe, 4,6% chez les femmes contre 2,8% chez les hommes. Ceci a été expliqué par les différences hormonales et de longévité entre les deux sexes.

La majorité de nos patients étaient illettrés avec une prédominance féminine dans ce groupe. Les sujets ayant un faible niveau d'éducation avaient de moins bons résultats aux tests neuropsychologiques. A l'inverse, les patients à plus haut niveau d'éducation présentent un risque moindre de démence ou un début plus tardif des troubles. Acquérir un haut niveau d'éducation pourrait différer la dégradation des capacités intellectuelles en constituant des

possibilités de compensation lors du développement des symptômes habituels de la maladie (**Letenneur *et al.*, 2000)**. Certes, différents facteurs liées au mode de vie apparaissent comme un facteur protecteur vis-à-vis de la survenue d'une démence. En effet, l'intensité des activités intellectuelles au cours de la vie sont réduites chez les sujets atteints par une MA.

Parmi les facteurs de risque, les habitudes de vies (consommation d'alcool, tabagisme) sont aussi à prendre en compte.

L'alcoolisme était constaté chez 14,11% des patients déments. Selon l'étude PAQUID, une consommation modérée de vin (2 à 4 verres par jour) serait un facteur protecteur de la démence.

Dans notre étude, 65,63% des patients étaient tabagiques. Le tabac, a été reconnu comme étant un facteur de protection dans quelques études (**Bowirrat *et al.*, 2001**). En effet **Mousavi *et al.* (2008)** ont montré une réduction significative de la concentration du peptide Aβ1-42 dans le cerveau des patients fumeurs atteints de la MA par rapport aux non-fumeurs. La nicotine pourrait réduire le taux du β-amyloïde et augmenter la production de l'APP soluble secrétée qui protège le neurone contre le stress oxydatif. Bien que certaines études de cas aient défendu l'idée que le tabac pouvait être protecteur, des études prospectives ont montré que la consommation de tabac peut augmenter le risque de développer une MA (**Zamani & allen., 2001, Tyas *et al.*, 2003, Duron & Hanon., 2008**).

- ✓ **Antécédents familiaux de la population de malades déments étudiés**

Le tiers de nos patients avaient des antécédents familiaux de démence avec une dominance chez les groupes ayant une MA. Plusieurs études ont mis en évidence un risque accru de MA chez les sujets ayant un parent de 1er degré atteint par la démence. Le risque relatif a été estimé à 4 par rapport au sujet n'ayant pas d'antécédents familiaux. Cependant, Dans le cadre d'Eurodem, la ré-analyse des données groupées de plusieurs cohortes européennes n'a pas révélée d'association entre les antécédents familiaux et le risque de développer une MA. Le facteur de risque « antécédent familial » reste donc controversé (**Launer *et al.*, 1999**).

- ✓ **Antécédents médicaux de la population de malades déments étudiée**

La recherche des antécédents médicaux a monté que l'HTA est la maladie la plus fréquente chez nos patients. Ces données concordent avec ceux de la littérature où divers

études ont suggéré la présence d'une liaison étroite entre ces deux pathologies (**Dessi *et al*., 1998).** Par ailleurs, l'étude EVA a montré un risque de déclin cognitif augmenté de 2,8 chez des hypertendus âgés suivi pendant 4 ans (**Tzourio *et al*., 1999**). De même, une corrélation entre la présence d'une HTA et la survenue d'une altération cognitive 6 ans plus tard a été montré chez 10963 sujets de la cohorte ARIC (**Knopman *et al*., 2001**). Le tiers des patients avait des antécédents de dyslipidémie, ceci concorde avec plusieurs études épidémiologiques qui suggèrent que des taux élevés du cholestérol total et du LDL-Cholestérol associés à un taux faible de HDL-Cholestérol sont impliqués dans la pathogenèse de démence (**Kivipelto *et al*., 2001**). *In vitro,* il a été suggéré que le cholestérol favorise la formation de peptide β-amyloïde (**Bodovitz *et al*., 1996; Frears *et al*., 1999**) et accélère le développement de la pathologie amyloïde chez l'animal transgénique (**Howland et *al*., 1998; Refolo *et al*., 2000).** Une étude sur pièces d'autopsie a aussi montré un lien entre hypercholestérolémie, dépôts amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire (**Launer *et al*., 2001**). De plus, l'hypercholestérolémie a été associée à une augmentation de l'activation de la microglie et à une infiltration leucocytaire, comme on peut l'observer dans les plaques amyloïdes. Cette activation des cellules microgliales contribuerait à la neurodégénéréscence via la production de cytokines et de radicaux libres conduisant à une rupture de l'équilibre RedOx (**Streit *et al*., 1997**). L'importance de l'hypercholestérolémie est soulignée par l'utilisation de statines connues pour leur rôle dans la réduction du niveau intracellulaire du cholestérol : ces dernières ont un effet inhibiteur sur la production de β-amyloïde sur cultures cellulaires **(Simons *et al*., 1998; Fassbender *et al*., 2001)**. Dans notre étude, seuls 10,4 % des patients étaient sous statines avant altération de leurs fonctions cognitives. Les données de la littérature sont controversées. Certaines études d'observation ont montré un effet bénéfique des statines sur le déclin cognitif (**Jick *et al*., 2000; Yaffe *et al*., 2002**) mais ces espoirs ont été rapidement déçus par les résultats de deux essais autres thérapeutiques qui n'ont pas pu confirmer l'efficacité des statines pour la prévention des démences (**Shepherd *et al*., 2002 ; HBSCG, 2002**).

Par ailleurs, des antécédents de diabète ont été déterminés chez 19 % de nos patients ainsi qu'une importante augmentation de la glycémie chez les patients atteints par la DV et par une autre démence. Cette augmentation n'est pas significatives pour les patients MA. Cependant, des complications liées au diabète et son rôle potentiel dans l'altération des fonctions cognitives ont été décrites par **Mc Crimmon *et al* (2012)**. En effet, il a été suggéré que le diabète, ses complications et son traitement peuvent inciter des anomalies cognitives

transitoires ou permanentes, résultant de perturbations aiguës et/ou chroniques du niveau du glucose dans le sang. Il a été montré que l'incidence des démences apparait plus élevée chez les sujets présentant un diabète de type 2 ; un risque relatif compris entre 1,5 et 2 est retrouvé chez les patients MA et les malades par une démence vasculaire (**Biessels *et al.*, 2006**). De plus, une association entre diabète type 2 et atrophie hippocampique indépendamment de la pathologie vasculaire a été montré (**den Heijer *et al.*, 2003**). L'étude Honolulu-Asia Aging a également montré que l'association diabète - MA est particulièrement forte avec les patients porteurs de l'allèle ε4 de l'apolipoprotéine (**Peila *et al.*, 2002**).

L'antécédent d'un AVC était retrouvé chez 17,2 % des patients. On note que ces derniers étaient tous atteints d'une démence vasculaire. Par ailleurs, plus de 10% des patients avaient un antécédent de traumatisme crânien. Toutefois cette association est largement controversée bien que l'effet du traumatisme crânien soit majoré chez les sujets porteurs de l'allèle ε4 du gène de l'APOE (**Mayeux *et al.*, 1995**; **Shively *et al.*,, 2012**). Une surproduction d'Aβ et d'IL-1 observée suite à un traumatisme crânien pourrait être le signal déclencheur de la démence. Il est important de noter que l'incidence du traumatisme crânien sur le développement des démences est difficile compte tenu de l'absence de méthodes standardisées pour évaluer la sévérité du traumatisme et le temps entre le traumatisme et le début de la maladie.

Les antécédents de troubles psychiatriques en particulier un trouble de l'humeur touche 6,2 % de nos patients. Une association entre dépression et démence est confirmée par diverses études (**Jorm, 2000**).

Près de 5 % de nos patients avaient des antécédents de cardiopathie. Plusieurs équipes ont mis en œuvre une association positive entre l'altération des fonctions cognitives et la fibrillation auriculaire. Le suivi de 180 sujets atteints d'une MCI et de 431 sujets témoins sur une période de 3 à 4 ans a montré une relation significative entre la fibrillation auriculaire et l'évolution vers la démence chez les sujets MCI (**Bowirrat *et al.*, 2002**). Certaines études ont aussi prouvé une association entre l'altération cognitive et l'insuffisance cardiaque (**Bornstein *et al.*, 1995**). De plus, une analyse en post-mortem de sujets d'âge moyen égal à 87 ans a montré une relation significative entre la densité des lésions neuropathologiques cérébrales et l'importance de l'atteinte coronarienne. Ces lésions étaient plus prononcées chez les sujets porteurs de l'allèle ε4 de l'APOE **(Beeri *et al.*, 2006**).

L'altération des fonctions cognitives est aussi un critère important des démences. L'évaluation globale des fonctions cognitives a été faite par le score MMSE. Ce test permettant de rechercher l'altération d'une ou de plusieurs fonctions cognitives et d'évaluer la sévérité du déficit cognitif a permis de classer les patients utilisés dans cette étude selon le stade de l'atteinte par la démence. Ainsi, plus que la moitié des patients déments avaient une démence modérée alors que 16 % avaient un syndrome potentiel sévère. Par ailleurs, la sévérité de la démence des patients présents dans cette étude est fonction du niveau d'instruction comme le montre différentes études. En effet, chez des sujets d'une même tranche d'âge, la valeur qui définissait le quartile inférieur était de 19 chez les sujets ayant une scolarité de 0 à 4 ans, de 24 pour une scolarité de 5 à 8, de 27 pour une scolarité de 9 à 12 ans et de 28 pour 12 ans d'étude et plus.

Ces critères conventionnels n'étant pas suffisants pour caractériser les malades, une recherche de marqueurs plus spécifiques s'avère indispensable pour identifier les démences, les distinguer et les traiter.

1. Profil lipidique de la population de malades déments étudiés

Le lien entre les marqueurs biologiques du métabolisme lipidique et le risque de démence est controversé. Cette controverse apparait tant au niveau du cholestérol que des acides gras. L'incidence des lipides dans le développement des démences étant contradictoires de nouvelles analyses sont indispensables afin de préciser les relations entre métabolisme lipidique et démences. C'est pourquoi ces paramètres ont été repris dans l'étude réalisée.

1.1. Etude des relations cholestérol - démence**s**

Pour le cholestérol, plusieurs études épidémiologiques ont suggéré que des taux augmentés de cholestérol plasmatique peut contribuer à la pathogenèse de la démence. Ainsi des individus ayant des taux élevés de cholestérol et de LDL-Cholestérol sont plus à même de développer une démence et en particulier une MA. Cette probabilité est augmentée chez les patients porteurs de l'allèle ε4 du gène APOE, impliqué dans le transport du cholestérol. **Whitmer *et al*. (2005)** suggèrent qu'un taux élevé du cholestérol à la quarantaine (âge moyen = 42 ans) augmente considérablement le risque de démence à un âge plus avancé de la vie (61-83 ans). Ceci a été confirmé par **Solomon *et al*. (2007)** qui ont constaté que le taux du cholestérol moyen à la cinquantaine ('âge moyen = 50,4 ans) était plus élevé chez les personnes ayant développé une déficience cognitive comparativement au sujet n'ayant pas

développé de démence et ceci indépendamment du génotype de l'APOE (**Jarvik *et al*., 1995 ; Kivipelto *et al,* 2002 ;**. **Zambon *et al,* 2010).** Il est donc très probable que les individus ayant une hypercholestérolémie familiale sont plus à même de développer une démence modérée. Toutefois, les travaux de **Reitz *et al* (2004)** ont montré qu'un taux augmenté de cholestérol chez des personnes âgées de 77 ans et plus diminue le risque d'atteinte par la MA. De la même, **Mielke *et al*. (2005)** ont montré que des hauts niveaux du cholestérol entre 70-79 ans réduit le risque de développer la démence à l'age de 79-88.

Dans notre étude, chez les malades déments étudiés, des taux augmentés de cholestérol, de triglycérides, et de LDL-cholestérol associés à des taux réduits de HDL-cholestérol ont été observés chez les patients atteints de MA ainsi que chez les patients avec démences vasculaires et autres démences. Ces variations sont plus marquées chez les femmes. De plus, les taux plasmatiques de triglycérides, de cholestérol et de LDL-cholestérol chez les patients MA sont inversement corrélés avec le score MMSE et donc avec la sévérité et le degré de l'atteinte par la démence. Une évaluation des polymorphismes de l'APOE et du CYP46, gènes qui ont été associés au développement de la MA (**Reddy *et al*., 2010**), dans différentes études, pourrait être envisagée.

Les résultats obtenus dans notre étude sont donc en faveur d'une association entre hypercholestérolémie et démence.

D'un point de vue mécanistique, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le mode d'action du cholestérol dans les démences. Ainsi, il a été suggéré que le cholestérol pourrait augmenter l'activité de la ß-ou de la γ-sécrétase, enzymes impliquées dans la voie amyloidogénique du clivage de l'APP et la production d'Aß (**Simons *et al*., 1998**). L'agrégation d'Aβ pourrait être accélérée en présence de taux élevés de cholestérol (**Yip *et al*., 2001**). Le cholestérol pourrait aussi réprimer de façon partielle le clivage de l'APP par la voie non amyloidogénique (**Bodovitz *et al*., 1996 ; Refolo *et al*., 2000**). En effet, un apport exogène du cholestérol à des souris ou sur des cellules rénales d'embryon humaines (HEK) (cellules surproduisant l'APP humain) provoque une diminution de la sécrétion des produits de clivage de l'APP par l'α-sécrétase. Par ailleurs, un possible effet néfaste du cholestérol sur la physiologie des neurones (croissance des dendrites et des axones) a été rapporté (**Fan *et al*., 2002**).

1.2. Etude des relations acides gras - démences

Des altérations des lipides au niveau des cerveaux de malades Alzheimer ont été démontrées (**Söderberg *et al.*, 1991, Mulder *et al.*, 1998**). En effet, des niveaux diminués d'AA et de DHA ont été observés dans les fractions phosphatidylcholine et phosphatidylethanolamine de differntes régions du cerveau de patients MA (**Prasad *et al.*, 1998**). Le vieillissement en lui-même n'influence pas la composition en AGs de ces frations du cerveau (**Söderberg *et al.*, 1991**).

Outre les changements de la composition en AGs connus au niveau neuronal, plusieurs troubles neurologiques, comme la schizophrénie et la dépression présentent aussi des changements de la composition en AGs plasmatiques (**Peet *et al.*, 1998**). Bien que la MA ne soient pas semblable aux troubles neurologiques mentionnés ci-dessus, il est possible que la composition en AGs plasmatiques des patients MA soient modifiées comparativement aux sujets contrôles et aux autres déficiences cognitives.

Cette étude a révélé d'importantes modifications du profil d'acides gras chez les déments versus contrôles tant au niveau plasmatique qu'érythrocytaire. Des augmentations importantes et hautement significatives de C22:0, C24:0 et C26:0 ont été observées ainsi qu'une diminution de DHA et plasmalogènes-C16:0. Une augmentation de l'acide phytanique a aussi été notée. L'accumulation de C24:0, de C26:0 et d'acide phytanique ainsi que la diminution de DHA, substrat de la β-oxydation peroxysomale, et la diminution plasmalogène-C16:0, dont les deux premières étapes de synthèse sont peroxysomales, sont en faveur de dysfonction du peroxysome dans les démences et en particulier dans la MA. Dans cette maladie, la très forte augmentation de C26:0 tant au niveau plasmatique qu'érythrocytaire a conduit à proposer cet acide gras comme biomarqueur de la MA (**Brevet n° 1358513**). Par rapport aux biomarqueurs déjà existant (protéine Aβ, rapport Aβ1-40/ Aβ1-42, tau phosphorylé) qui ne sont détectables que dans le LCR (nécessitant un prélèvement dans des services de neurologie spécialisés), l'avantage du C26:0 est de pouvoir être quantifié sur du sang total qui peut être prélevé dans un laboratoire de biologie médicale conventionnel. Ce biomarqueur du sang périphérique serait bien adapté à un diagnostic de routine.

Dans le cadre des analyses en AGs, la composition de la membrane érythrocytaire et du plasma en AGs reflète l'apport alimentaire en lipides. Bien que le profil érythrocytaire reflète la concentration d'AGs sur une période plus longue (de l'ordre de 3 mois) que celle

fournie par le plasma (profil extemporané), ce profil peut aussi être influencé par le métabolisme des AGs et par les échanges entre plasma et membrane.

La détermination du profil d'AGs érythrocytaires ainsi que plasmatique peut donc être utilisé comme indicateur biochimique de l'apport alimentaire ainsi que pour évaluer le métabolisme lipidique. Dans cette étude, des taux élevés d'AGs saturés (C13:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0 et C26:0) ont été révélés chez les déments aussi bien au niveau plasmatique qu'erythrocytaire. Des taux plus faibles ont été observés chez les patients ayant une démence vasculaire ou une autre démence en comparaison aux patients MA. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature, indiquant qu'une augmentation de C18:0 au niveau érythrocytaire est associée à un risque plus important du déclin cognitif (**Heude *et al.*, 2003**). Ces AGs sont synthétisés de façon endogène *via* la voie de synthèse de *novo* par transformation de l'acétyl-coA en AGs saturés (C16:0 et C18:0) qui pourraient subir des élongations et des désaturations pour donner C16:1 n-7, C18:1 n-9 ou C18:1 n-7 (**Paton *et al.*, 2009**). Cette voie reflète la capacité de l'organisme à convertir l'excès d'hydrocarbure en AGs ou triglycérides (**Schutz *et al.*, 2004 ; Chong *et al.*, 2008**). Des données émergentes suggèrent que les AGs produits par la voie de synthèse de *novo* pourraient augmenter le risque de mort subite (**Lemaitre *et al.*, 2010 ; Wu *et al.*, 2011**), de diabètes (**Kroger *et al.*, 2011**), d'hypertension (**Zheng *et al.*, 1999**) et d'inflammation (**Petersson *et al.*,2008**). Les données de l'étude ARIC révèlent une association positive entre C16:1 n-7 et l'incidence du diabète. Puisque le diabète est l'un des facteurs de risque de la MA, ces données suggèrent que C16:1 n-7 pourrait influencer le risque de MA. **Djousse *et al.*, 2012** ont montré une association positive entre le taux erythrocytaire de C16:1n-7 et le risque de développer une maladie cardiovasculaire alors qu'une association négative a été révélée pour le C18:1 n-7.

De plus, l'analyse du profil d'AGs révèle des diminutions significatives de la concentration totale en AGPI (DHA, C18:2 n-6, C18:3 n-6 et C18:3 n-3) chez les différents groupes de déments au niveau plasmatique. En revanche, au niveau erythrocytaire une augmentation de ces AGs est remarquée à l'exception du DHA dont le taux diminue. Ces observations sont en accord avec celle faite par **Conquer *et al.* (2000)** ayant déterminé la composition en AGs dans les phosspholipides totaux ainsi que dans les différentes fractions plasmatiques de phosphatidylcholines, de phosphatildyléthanolamines et lysophosphatidylcholines. Lors de cette étude, des niveaux réduits d'AGPI ont été mises en évidence dans ces différentes fractions et en particulier celui du DHA **(Conquer *et al.*, 2000).** Il a été suggéré que les phosphatidylcholines seraient utilisées comme un lieu de stockage de

différents AGPI dans le cerveau, y compris le DHA. Ainsi, les taux diminués de DHA plasmatiques chez les patients MA pourraient être partiellement responsables de la réduction de sa concentration dans le cerveau.

Les taux cérébraux d'AGPI n'ont pas été jusqu'à ce jour déterminés chez les patients ayant des démences autres que la MA. Dans cette étude, des taux diminués de ces AGs ont été observés chez les patients ayant une démence vasculaire ou une autre démence. Ces observations peuvent refléter l'altération de la composition cérébrale en AGs chez ces patients. Ces observations suggérent qu'une consommation réduite d'aliments riches en AGPI n-3 (**Kalmijn *et al.*, 1997; Grant, 1997**) pouurait s'ajouter à l'altération de leur métabolisme au niveau cellulaire pour aggraver le déclin cognitif et accélérer la manifestation de la démence.

D'un point de vue fonctionnel, plusieurs études ont montré que les AGPI sont importants pour le développement et la physiologie des cellules neuronales et leur déficit a été associé au développement de la MA (**Fan *et al.*, 2003 ; Ma *et al.*, 2004; Young *et al.*, 20005 ; Chen *et al.*, 2007 ; Chapkin *et al.*, 2008**). Il a été démontré que le contenu du cerveau de souris en AGPI n-3 est dépendant de l'apport alimentaire et du vieillissement. La déplétion de 50 à 80% des AGPI n-3 est suffisante pour altérer les fonctions neuronales. En effet, la déficience du régime alimentaire en AGPI n-3 est à l'origine de déficits cognitifs dans les souris Tg2576, mais pas dans les souris contrôle. Au contraire, les souris Tg2576 sous régime enrichi en DHA se comportent de façon similaire aux souris contrôles. Cette sensibilité des souris transgéniques à la déplétion en AGPI n-3 suggère que les patients portant un risque génétique d'atteinte de la MA pourraient être plus vulnérables à un déficit d'acides gras essentiels. Comme le vieillissement normal et la MA sont associés à des concentrations cérébrales diminuées d'AGPI n-3 (**Favrelere *et al.*, 2000; Yehuda *et al.*, 2002**), des patients âgés portant un prédisposition génétique à la MA présenteraient un risque plus élevé de développer la maladie (**Calon *et al.*, 2008**)**.** De ce fait, un faible apport d'AGPI et en particulier de DHA associé à une déficience en anti-oxydants constitue un risque cumulé de la MA (**Etminan *et al.*, 2003, Morris *et al.*, 2003**). Des altérations protéiques accrues résultant du stress oxydant chez des animaux privés de DHA confortent cette hypothèse (**Calon *et al.*, 2008).**

Par ailleurs, l'acumulation des AGTLCs chez les patients déments recrutés et en particulier chez les MA est en accord avec des résultats ultérieurs montrant une augmentation

du taux de C26:0 par rapport aux valeurs normales au niveau des érythrocytes de patients ayant une adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD) (**Knazek *et al.*, 1983).** Il a été suggéré que l'incorporation des AGTLCs dans les lipides complexes pourrait déstabiliser les membranes cellulaires. Il est bien établi que le C26:0 change les propriétés physiologiques de membranes. L'étude de **Ho *et al.* (1995)** a révélé que le C26:0 pourrait perturber la structure d'une membrane modèle et augmenter la micro-viscosité membranaire comme démontré dans l'étude de **Knazek *et al.* (1983)** où des mesures de polarisation de fluorescence ont été effectuées en utilisant un hydrocarbure comme fluorophore, le diphénylhexatriène. Ce coposé émet une fluorescence une fois intercalé dans les lipides membranaires. Ainsi, une augmentation fortement significative de la micro-viscosité de membranes érythrocytaires a été démontrée chez des patients affectés par l'X-ALD. De même, le traitement des cellules adrénocorticales humaines avec 5 µM de C26:0 ou de C24:0 a montré aune altération de leur capacité à répondre aux stimulations par l'acétylcholine comparativement aux cellules mises en culture sans apport exogène d'AGs ou en présence du C18:2 (**Whitcomb *et al.*, 1988**).

L'évaluation de la composition du plasma et des érythrocytes en acide gras Trans, qui proviennent soit de l'hydrogénation des huiles soit des produits laitiers, chez les patients déments recrutés dans cette étude a révélé une augmentation de la concentration totale de ces AG aussi bien au niveau érythrocytaire que plasmatique chez les groupes MA et autres démences. Des quantités croissante des acides gras Trans, ont été mises en évidence dans le régime alimentaire humain (**Emken *et al.*, 1984**). Il a été rapporté que ces AGs constituent 4 à 12 % de l'apport total en matière grasse chez la population américaines (**Allison et al., 1995 ; Enig *et al.*, 1990**). Les AGT ont été liés jusqu'ici au risque de développer des maladies cardiovasculaires (**Hu *et al.*, 1997 ; Stender *et al.*, 1995**) ; leur influence sur le développement des troubles neurodégénératives est encore non élucidé. L'étude de **Morris *et al*** a montré que les individus ayant une haute consommation d'AGT (4,8 g/jours) ont un risque relatif élevé de développer une MA (**Morris *et al.*, 2004**). Au contraire, aucune relation significative entre consommation d'AGT et MA n'a été observée lors de l'étude Rotterdam (**Engelhart *et al.*, 2002**). En outre, **Naqvi *et al*** ont récemment rapporté qu'une consommation importante en AGT n'est pas associée au déclin cognitif chez les femmes (**Naqvi *et al.*, 2011**) , tandis qu'une forte consommation a été connue pour augmenter le déclin cognitif dans des femmes ayant le diabète de type 2 (**Devore *et al.*, 2009**) et parmi des personnes âgées sans histoire de diabète (**Morris *et al.*, 2004**). Selon **Grimm *et al.***, les AGT favorisent le clivage de l'APP selon la voie amyloidogénique. La voie non amyloidogénique a

été réprimée en presence des AGT et ceci suite à la diminution de l'expression génique d'ADAM 10 et de l'expression protéique de l'α-sécrétase associée à une augmentation de l'expression de BACE1 et des protéines formant le complexe de la γ-sécrétase. De plus, il a été démontré que les AGT favorisent l'oligomérisation et l'accumulation d'Aß **(Grimm *et al.*, 2012**).

1.3. Etudes des relations stress oxydant – démences

Le stress oxydant semble une composante importante de la neurodégénérescence cérébrale associée aux démences. Il jouerait un rôle majeur aussi bien dans l'hypothèse étiologique liée au peptide amyloïde que dans l'hypothèse inflammatoire ou dans celle des troubles neuronaux en relation avec le métabolisme calcique et/ou les fonctions mitochondriales. Sa²prise en compte était donc indispensable sur les sujets déments étudiés.

Dans l'état actuel des connaissances, le rôle étiologique du stress oxydant dans les maladies neurodégénératives et en particulier la MA a été évoqué par diverses études. Ce stress oxydant a été mis en évidence par une élévation des produits terminaux ou de certains intermédiaires réactifs : élévation intracérébrale du malondialdéhyde (MDA), du 4-hydroxynonénal (4-HNE) qui sont des indices de peroxydation lipidiques, élévation de la 8OH-2-déoxyguanosine et de l'hème-oxydase indiquant des lésions oxydatives de l'ADN (**Pratico, 2005** ; **Solfrizzi *et al*., 2006**). Des taux augmenté de peroxynitrite et de nitrotyrosine ont été également rapportés. Au niveau des agrégats neurofibrillaires, une accumulation des protéines carbonylées et de certains produits de glycosylation est observée. D'autres biomarqueurs du stress oxydant ont été associé à la MA ; les isoprostanes (F2-isoprostane) (produits de la peroxydation de l'acide arachidonique) ont été trouvés à des taux élevés dans le LCR et le cerveau de patients MA (**Practico *et al*., 1998** ; **Montine *et al*., 2007; Pratico *et al*., 2000**). Dans une étude longitudinale, le niveau de ces isoprostanes a été truvé significativement augmenté dans le LCR de patients MA et ils diminuent significativement chez les patients sous traitement antioxydants (**Quinn *et al*., 2004**). **Pratico *et al*. (2002)** ont aussi montré une production significative des de ces isoprostanes au niveau du plasma, du LCR et des urines de sujets ayant une démence modérée.

Au cours de la présente étude, une recherche des marqueurs du stress oxydant a été réalisée tant au niveau plasmatique qu'érythrocytaire. L'utilisation des érythrocytes est complémentaire du plasma car elle fournit des informations relatives aux effets de l'environnement sur la membrane plasmatique. Cette approche plasmatique et érythrocytaire a

révélé un fort stress oxydant chez les malades déments. Ainsi, au niveau plasmatique l'activité GPx diminue ainsi que le taux de GSH diminue et les diènes conjugués ainsi que le MDA augmentent. Au niveau érythocytaire, les activités SOD et catalase sont fortement augmentées alors que la GPx diminue ainsi que le GSH ; par ailleurs, le MDA, les diènes conjugués et les protéines carbonylées augmentent. Les altérations lipidiques (peroxydation lipidiques) et protéiques (carbonylation protéique) suggèrent que la stimulation des défenses anti-oxydantes (augmentation des activités SOD et catalase) est insuffisante pour faire face à une surproduction d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Comme le GSH présent en quantité important au niveau plsamatique diminue aussi cela souligne également l'importance du stress oxydant généré et la rupture d'équilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes de défense.

Les résultats obtenus soulignent donc que le stress oxydant et non seulement stimulé mais qu'il est puissant et délétère chez les malades déments.

Par ailleurs, certains marqueurs du stress oxydant semblent être fonction de la sévérité de la démence et pourraient avoir de l'intérêt pour évaluer le stade et la progression de la démence. Ainsi les taux de MDA et de diènes conjugués érythrocytaires, plus importants à des stades plus avancés de la démence, en particulier pour les patients MA, pourraient constituer des bio-marqueurs utilisables pour appliquer un traitement anti-oxydant au moment opportun de façon à prévenir la peroxydation lipidique et la carbonylation protéique donc les conséquences sur les fonctions cellulaires peuvent être irréversibles et délétères.

Comme les marqueurs du stress oxydant ont été révélés au niveau périphérique, il faudrait s'assurer qu'ils reflètent bien le stress oxydant au niveau du système nerveux central. Des analyses du métabolisme oxydatif au niveau cérébral par imagerie fonctionnelle pourrait répondre à cette question en corrélant les données d'imagerie aux données biochimique.

Au niveau cellulaire, le stress oxydant généré pourrait contribuer à l'altération du profil des acides gras et en particulier des AGPI, qui sont des constituants importants des membranes cellulaires à cause de leur richesse en doubles liaisons (**Montine *et al*., 2004**). La peroxydation des AGPI affecterait alors la fluidité des membranes plasmatiques ainsi que l'activité des enzymes présente en particulier au niveau des radeaux lipidiques comme démontré par **Martin *et al* (2010).** En effet, la détermination de la composition lipidique des radeaux lipidiques purifiés à partir de cerveaux de patients MA et de sujets sains montre une altération du profil lipidique chez les patients MA avec des niveaux faibles d'AGPI n-3 (en

particulier 22:6 n-3) et d'AGMI. Aucun changement au niveau des classes de lipides et d' acides gras n'a été observée dans les radeaux lipidiques de cerveaux de sujets sains (24-85 ans) démontrant que ces modifications ne sont pas liées à l'âge (**Martin *et al*., 2010**). Ces données indiquent donc l'existence de mécanismes qui préservent l'homéostasie du statut des radeaux lipidiques dans le cortex frontal de sujet normal. La perturbation de tels mécanismes conduirait à des changements de la fluidité au niveau des radeaux lipidiques chez les MA ce qui pourrait affecter l'activité des sécrétases et essentiellement celle de la β-sécrétase.

S'opposer au stress oxydant (selon des moyens qui restent à définir) est donc une voie méritant d'être mieux explorée pour traiter les démences. Des molécules ciblant le stress oxydant pourraient présenter un intérêt thérapeutique. Une alimentation contrôlée ou fonctionnelle pourrait sans doute aussi avoir de l'intérêt pour prévenir la neurodégénérescence.

1.4. Etude des relations cytokines (IL-1β, TNF-α) – démences

Une composante inflammatoire de la MA est supposée**.** Les cellules gliales seraient activées et contribueraient à une inflammation locale dont les conséquences sont à préciser **(Tuppo & Arias, 2005)**. Dans la mesure où les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 s'accumulent au niveau des lésions, ceux-ci pourraient favoriser l'inflammation cytokinique comme cela a été rapporté dans certaines peroxysomopathies démyélinisantes (**Singh & Pujol., 2010**). Dans notre étude, seule une augmentation de l'IL-β et du C20:4 érythrocytaire de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β et TNF-α) a été observée au niveau périphérique chez les patients MA. En revanche, ceci ne peut pas exclure la possiblité de développement d'un processus inflammatoire au niveau du système nerveux central. Par ailleurs, la sécrétion de l'IL-β semble s'accentuer proportionellemnt à la sévérité de la démnce.

Pour évaluer l'inflammation cérébrale, il serait en effet préférable de pouvoir disposer de LCR plutôt que de plasma. Malgré l'absence de différence plasmatique au niveau des taux d'IL-1β et de TNF-α entre sujet non déments et déments, des taux plus élevés mais non significatifs de CRP ont été observés chez les MA. L'analyse des cytokines mériterait donc d'être approfondie en prenant en compte le réseau cytokinique complet qui pourrait être abordé via des analyses multiplexes **(Prunet *et al*., 2006)**.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus *in vitro* sur cellules neuronales humaines SK-N-BE cultivées en absence ou en présence d'acide gras C22:0, C24:0, ou C26:0, sur modèle de souris Alzheimer transgénique APP PS1 Δ9 ainsi que sur des malades déments (MA, démences vasculaires, autres démences) versus contrôles apportent des éléments nouveaux sur l'implication des acides gras dans la neurodégénérescence. Ils soulignent le rôle potentiel des lipides et de leur métabolisme, en relation avec l'oxydation, dans le développement de la MA mais aussi des démences vasculaires et autres démences.

- Sur cellules SK-N-BE, les acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 ont montré une lipotoxicité aux concentrations plasmatiques trouvées chez les malades ($\geq$ 5 µM) qui se manifeste sous différentes formes.
    - Arrêt de la croissance cellulaire et perte d'adhésion.
    - Altérations mitochondriales topographiques, morphologiques et biochimiques (chute du potentiel transmembranaire $\Delta\Psi m$, modifications de l'expression de protéines appartenant aux complexes de la phosphorylation oxydative, augmentation du taux d'anions superoxydes).
    - Induction d'un stress oxydant marqué caractérisé par une surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène), diminution du taux de GSH intracellulaire, peroxydation lipidique (augmention de 4-HNE et de dérivés du cholestérol oxydés en C7).
    - Absence d'induction de cytokines (IL-1β, IL-8, IL-6, IL10, IL-1β, IL12p70, TNFα) mais augmentation de la production de LTB4, issu du métabolisme de l'acide arachidonique (inflammation non cytokinique).
    - Désorganisation du cytosquelette et modification des interactions et de l'expression de ses constituants majeurs (actine et tubuline).
    - Induction d'une mort cellulaire non apoptotique (à la plus forte concentration étudiée : 20 µM) caractérisée par la présence de vacuoles plus ou moins nombreuses et d'aspect variables qui ont conduit à évoquer une forme de mort cellulaire associée à l'autophagie.

Ces résultats obtenus *in vitro* montrent que le C22:0, le C24:0 et le C26:0 induisent des modifications cellulaires dont les caractéristiques évoquent les altérations rapportées au

niveau des lésions cérébrales. Ces constatations renforcent l'intérêt porté à ces composés comme facteurs de risque de la MA et suggère qu'ils pourraient éventuellement constituer des biomarqueurs de MA. Les résultats obtenus qui soulignent l'importance du stress oxydant et de l'inflammation non cytokinique (mais aussi d'autophagie) dans la lipotoxicité induite par les AGs (C22:0, C24:0 et C26:0) permettent d'envisager d'explorer de manière plus approfondies ces différents phénomènes en vue d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles en vue de développer des traitements spécifiques et efficaces encore inexistants.

- Sur **s**ouris transgéniques APP PS1 ΔE9 versus souris sauvages, les différentes approches mises en oeuvre pour caractériser la neurodégénérescence sur coupes histologiques (colorations adaptées à la détection d'amyloïdes-β, d'organites (mitochondries, lysosomes, peroxysomes) et de lipides (neutres et polaires) ; immunohistochimie pour révéler les amyloïdes-β, tau phosphorylé ainsi que des marqueurs mitochondriaux, peroxysomaux et des constituants du cytosquelette) et sur extraits lipidiques de cerveaux ont fourni des informations nouvelles qui sont néanmoins à confirmer sur les modifications d'expression antigénique associées à la MA et sur les profils d'acides gras.
    - Les dépôts amyloïdes et la présence de protéine tau hyperphosphorylée, qui reste à préciser, ne sont révélés que chez les souris transgéniques.
    - Les protéines peroxysomales sont exprimées à des niveaux variables dans le cerveau. Au niveau des hémisphères cérébraux, elles sont présentes en quantité importante au niveau de l'hippocampe. Dans cervelet, leur expression est forte au niveau de la couche granulaire et de cellules dont la morphologie évoque des cellules de Purkinje.
    - L'utilisation de fluorochromes permettant une révélation des lipides neutres et polaires donne des signaux positifs malgré le déparaffinage qui entraîne une solubilisation des lipides. Ceci suggère une association de lipides avec des structures protéiques (carbonylation protéique) et une induction de stress oxydant dans les cerveaux de souris transgéniques.
    - Les analyses de lipides, bien que réalisées sur un seul cerveau de souris transgénique versus sauvage, se sont révélés pertinentes. Elles sont non seulement en faveur de dysfonctions peroxysomales mais suggèrent aussi des perturbations simultanées des activités des élongases (ELOV1 et 6).

Ces résultats obtenus sur cerveaux de souris ont fourni des informations nouvelles sur la cartographie de la répartition du peroxysome au niveau cérébral en relation avec l'expression d'autres marqueurs (lysosomes, mitochondries, protéines du cytosquelette). Ces résultats soulignent aussi que les modifications importantes observées au niveau des taux de C22:0, C24:0 et C26:0 pourraient être la résultante de dysfonctions plus larges -peroxysomales et autres (élongases)- du métabolisme de ces acides gras.

- Afin d'évaluer si des perturbations du métabolisme des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 associés à des dysfonctions du métabolisme peroxysomal surviennent dans la MA, des dosages de ces acides gras (combinés à ceux de lipides dont le métabolisme est associé au peroxysome : acide phytanique, DHA, plasmalogènes) ont été réalisés sur les plasmas et les érythrocytes de malades atteints de MA, de démences vasculaires et d'autres démences comparativement à des sujets non déments appartenant à la même tranche d'âge. Les méthodes utilisées sont CPG/SM et CPG (afin d'établir un profil global des acides gras). Des marqueurs du stress oxydant ont aussi été quantifiés.
    - Par CPG/SM, des augmentations des taux d'acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 ont été observées tant au niveau plasmatique qu'érythrocytaire. Les modifications les plus marquées permettant de distinguer malades atteints de MA et sujets non déments ont été obtenues avec le C26:0 qui a été proposé comme biomarqueur de la maladie.
    - Une rupture de l'équilibre RedOx a aussi été mise en évidence chez la malades atteints de MA mais aussi dans les démences vasculaires et autres démences. Celle-ci se caractérise par une augmentation des enzymes anti-oxydantes (catalase, SOD), une diminution de l'activité GPx et du taux de GSH et une augmentation des marqueurs de peroxydation lipidique (MDA et diènes conjugués).
    - Par CPG, le profil général des acides gras plasmatique et érythrocytaire a été réalisé. Ce dernier intègre tous les acides gras y compris ceux apportés par l'alimentation. Dans ce profil, de nombreuses variations intergroupes ont été mise en évidence.

Ces résultats sur plasmas et érythrocytes de sujets déments (MA, démences vasculaires, autres démences) versus sujets non déments confortent l'hypothèse de

dysfonctions du métabolisme des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 en particulier chez les patients atteints de MA.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus *in vitro*, sur souris transgéniques ainsi que sur plasmas et érythrocytes de malades atteints de démences sont en faveur :

i) d'un rôle potentiel des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 dans la neurodégénérescence (lipotoxicité)

ii) de dysfonctions du métabolisme de ces acides gras pouvant impliquer le peroxysome mais aussi des enzymes localisées au niveau du réticulum endoplasmique telles qu'ELOV1 et 6.

Compte tenu des résultats obtenus, plusieurs perspectives de travail peuvent être envisagées.

- Les études *in vitro* seront prolongées en déterminant :
  - la chronologie des évènements conduisant à la mort cellulaire (stress oxydant, autophagie, mort cellulaire) ainsi que les interactions entre ces différents évènements,
  - l'origine du stress oxydant,
  - le rôle de l'autophagie (protecteur ou non),
  - la part prise par le lysosome dans le processus de mort,
  - l'impact de C22:0, C24:0 et C26:0 au niveau cellulaire et membranaire en particulier au niveau des radeaux lipidiques (travaux déjà initiés au laboratoire sur cellules 158N (**Kahn *et al.*, 2011**)). Une approche lipidomique et protéomique est prévue.
  - les voies de signalisation et l'intervention de flux ioniques impliquées dans les effets cytotoxiques (stress oxydant, inflammation, autophagie, mort cellulaire) induits par C22:0, C24:0 et C26:0,
  - l'intervention d'un stress du réticulum associé à la mort cellulaire induite par les AGs sera aussi abordée. Une déficience en Pex2 active en effet un stress du réticulum (**Faust & Kovacs, 2013**). Par ailleurs, dans les souris déficientes en ACOX1, il a été montré qu'un un stress du réticulum endoplasmique progressif contribue à l'hépatotoxicité (**Huang *et al.*, 2011**).

- Les effets des acides gras seront aussi évalués sur cellules nerveuses issues d'hippocampe de souris en absence ou en présence de cellules gliales pour préciser la part prise par ces cellules dans la neurodégénérescence.
- l'identification de molécules naturelles ou de synthèse pouvant s'opposer à la lipotoxicité en vue de développer soit des médicaments, soit des aliments fonctionnalisés.

- Les études sur modèle de souris transgéniques APP PS1 Δ9 ainsi que sur d'autres modèles trangéniques développant à la fois une taupathie et amyloïdopathies seront aussi continuées pour préciser l'implication du métabolisme peroxysomal et l'intervention des élongases ELOV1 et 6 dans le développement de la MA. Pour cela, sur cerveaux de souris:
    - Les profils d'acides gras seront réalisés sur un nombre plus important de souris transgéniques et sauvages,
    - L'expression d'ELOV1 et 4 sera abordée par RT-QPCR,
    - L'expression d'enzymes peroxysomales (ACOX1, enzyme bifonctionnelle, thiolase) impliquées dans la β-oxydation et la synthèse de DHA sera aussi évaluée par RT-QPR,
    - L'expression et l'activité de la catalase, enzyme spécifique du peroxysome et contribuant à la dégradation du peroxyde d'hydrogène, sera précisée,

- Par ailleurs, sur érythrocytes et plasma de souris transgéniques versus sauvages, le profil d'acides gras et le stress oxydant seront évalués en utilisant les mêmes paramètres que ceux utilisés chez l'homme afin de définir si le modèle murin choisi APP PS1 Δ9 est pertinent pour étudier les relations entre le métabolisme des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 et le développement de la MA. Si tel était le cas, ce modèle pourrait avoir plusieurs intérêts :
    - **i**) identifier de nouveaux biomarqueurs de la MA (si possible au niveau périphérique afin qu'ils soient facilement utilisables) ;
    - **ii**) servir de modèle en physiopathologie pour préciser l'impact d'une altération du métabolisme des acides gras au niveau cérébral désordre ;
    - **iii**) servir de modèle en pharmacologie en ciblant des voies du métabolisme des acides gras C22:0, C24:0 et C26:0 ou en tentant de s'opposer à des effets délétères associés à ces acides gras.

Dans sa globalité, l'approche envisagée permettra de consolider, voire de valider, les hypothèses émises concernant l'implication de dysfonctions du métabolisme des acides gras (C22:0, C24:0 et C26:0) dans la neurodégénérescence conduisant à la MA et en particulier le rôle du peroxysome et du réticulum endoplasmique (via certaines élongases) dans le processus neurodégénératif.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abraham CR. Reactive astrocytes and alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2001; 22 (6): 931-936.

Ahlemeyer B, Gottwald M, Baumgart-Vogt E. Deletion of a single allele of the Pex11β gene is sufficient to cause oxidative stress, delayed differentiation and neuronal death in mouse brain. Dis Model Mech. 2012; 5(1): 125-140.

Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim Hy. Docosahexaenoic Acid: A Positive Modulator Of Akt Signaling In Neuronal Survival. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 10858–10863.

Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2000a; 14 Suppl 1:S47-53.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2000b; 21(3): 383-421.

Allison D, Denke M, Dietschy J, Emken E, Kris-Etherton P, Nicolosi R. Trans fatty acids and coronary heart disease risk. Report of the expert panel on trans fatty acids and coronary heart disease. Am J Clin Nutr 1995;62: 655S–708S discussion 518–526.

Anzai K, Ogawa K, Goto Y, Senzaki Y, Ozawa T, Yamamoto H. Oxidation-dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers. Antioxid Redox Signal. 1999;1(3): 339-347.

Arterburn Lm, Hall Eb, Oken H. Distribution, Interconversion, And Dose Response Of N-3 Fatty Acids In Humans. Am J Clin Nutr 2006; 83:1467s-1476s.

Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S. Role of Bai Q, Garver JA, Hukriede NA, et al. Generation of a transgenic zebrafish model of Tauopathy using a novel promoter element derived from the zebrafish eno2 gene. Nucleic Acids Res. 2007; 35: 6501–6516.

Baarine M, Andréoletti P, Athias A, Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Vejux A, Riedinger JM, Kattan Z, Bessede G, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, Lizard G. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid—treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. Neuroscience. 2012; 213: 1-18

Baarine M, Ragot K, Athias A, Nury T, Kattan Z, Genin EC, Andreoletti P, Ménétrier F, Riedinger JM, Bardou M, Lizard G. Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF-α on oligodendrocytes and astrocytes. Neurotoxicology. 2012; 33(2): 212-228.

Baarine M, Ragot K, Genin EC, El Hajj H, Trompier D, Andreoletti P, Ghandour MS, Menetrier F, Cherkaoui-Malki M, Savary S, Lizard G. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. J Neurochem. 2009; 111 (1): 119-131.

Balaraman, Y., Limaye, A. R. And Srinivasan, S. Glycogen Synthase Kinase 3β And Alzheimer's Disease: Pathophysiological And Therapeutic Significance. Cell Mol. Life Sci. 2006; 63, 1226-1235.

Bales KR., Liu F., Wu S., Lin S., Koger D, DeLong C., Hansen J.C., Sullivan P.M., Paul S.M., J. Neurosci, 2009; 29: 6771–6779.

Baloyannis SJ. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2006; 9(2):119-126.

Bass, DA, Parce, JW., Dechatelet, LR., Szejda, P., Seeds, MC., Thomas, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. Journal of immunology, 1983. 130(4), 1910–1917.

Baumgart E, Vanhorebeek I, Grabenbauer M, Borgers M, Declercq PE, Fahimi HD, Baes M. Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse). Am J Pathol. 2001 ;159 (4): 1477-1494.

Bazan, N. G. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. Journal of lipid research, 2009; 50 Suppl: S400–405

Beal MF. Mitochondria and neurodegeneration. Novartis Found Symp. 2007; 287: 183-192.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem. 1971; 44 (1): 276-287.

Bener Bener Aksam E, Jungwirth H, Kohlwein SD, Ring J, Madeo F, Veenhuis M, van der Klei IJ. Absence of the peroxiredoxin Pmp20 causes peroxisomal protein leakage and necrotic cell death. Free Radic Biol Med. 2008; 15; 45 (8): 1115-1124.

Benolken RM, Anderson RE, Wheeler TG. Membrane fatty acids associated with the electrical response in visual excitation. Science. 1973 ;182(4118): 1253-1254.

Beydoun MA, Kaufman JS, Sloane PD, Heiss G, Ibrahim J. n-3 Fatty acids, hypertension and risk of cognitive decline among older adults in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Public Health Nutr. 2008; 11(1): 17-29

Bharti P, Schliebs W, Schievelbusch T, Neuhaus A, David C, Kock K, Herrmann C, Meyer HE, Wiese S, Warscheid B, Theiss C, Erdmann R. PEX14 is required for microtubule-based peroxisome motility in human cells. J Cell Sci. 2011; 15; 124(Pt 10): 1759-1768.

Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. Lancet Neurol. 2006; 5(1):64-74. Review. Erratum in: Lancet Neurol. 2006; 5(2):113.

Birch DG, Birch EE, Hoffman DR, Uauy RD. Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1992; 33(8): 2365-2376.

Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24(5): 806-815.

Blass JP, Sheu RK, Gibson GE. Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. Ann N Y Acad Sci. 2000; 903:204-221.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet 2006; 368(9533):387-403.

Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics, 2004; 1(2): 213-225.

Bodovitz S, Klein WL. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. J Biol Chem 1996; 271: 4436-4440.

Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. J Neurosci. 2008; 28(27):6926-6937

Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. J Neurosci. 2008; 28(16): 4283-4292

Bons N, Rieger F, Prudhomme D, Fisher A, Krause KH. Microcebus murinus: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? Genes Brain Behav. 2006; 5(2):120-130.

Bornstein RA, Starling RC, Myerowitz PD, Haas GJ. Neuropsychological function in patients with end-stage heart failure before and after cardiac transplantation. Acta Neurol Scand, 1995; 91(4): 260-265.

Boss MA. Diagnostic approaches to Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta. 2000; 1502(1): 188-200.

Bottelbergs A, Verheijden S, Hulshagen L, Gutmann DH, Goebbels S, Nave KA, Kassmann C, Baes M. Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes. Glia. 2010; 58(13): 1532-1543.

Bowirrat A, Friedland RP, Farrer L, Baldwin C, Korczyn A. Genetic and environmental risk factors for Alzheimer's disease in Israeli Arabs. J Mol Neurosci. 2002; 19(1-2): 239-245.

Braak H, Braak E. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. Brain Pathol. 1991; 1(3): 213-216.

Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. 1991;82(4): 239-259.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.

Bramblett GT., Goedert M., Jakes R., Merrick S.E., Trajanowski, JQ, Lee VMY., Abnormal Tau Hyperphorylation At Ser396 In Alzheimer's Disease Recapitulates Developpementy And Contributes To Reduces Microtubule Binding. Neuron ,1993; 10, 1089- 1099.

Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. Biochim Biophys Acta. 2012; 1822(9):1442-1452.

Brenner S. Aluminum may mediate Alzheimer's disease through liver toxicity, with aberrant hepatic synthesis of ceruloplasmin and ATPase7B, the resultant excess free copper causing brain oxidation, beta-amyloid aggregation and Alzheimer disease. Med Hypotheses. 2013; 80(3):326-327.

Breuer ME, Koopman WJ, Koene S, Nooteboom M, Rodenburg RJ, Willems PH, Smeitink JA. The role of mitochondrial OXPHOS dysfunction in the development of neurologic diseases. Neurobiol Dis. 2013; 51: 27-34.

Brinton RD. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. Trends Neurosci. 2008; 31(10): 529-537.

Brites P, Waterham HR, Wanders RJ. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. Biochim Biophys Acta. 2004; 1636 (2-3): 219-231.

Broe M, Shepherd CE, Milward EA, Halliday GM. Relationship between DNA fragmentation, morphological changes and neuronal loss in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. Acta Neuropathol. 2001; 101(6): 616-624.

Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging:accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis.Eur J Biochem. 2002; 269(8): 1996-2002

Buee-Scherrer, V, Goedert, M. Phosphorylation Of Microtubule-Associated Protein Tau By Stressactivated Protein Kinases In Intact Cells. Febs Lett, 2002; 515: 151-154.

Bulteau AL, Ikeda-Saito M, Szweda LI. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. Biochemistry. 2003; 42(50): 14846-14855.

Burr GO, Burr, MM. (1929). A New Deficiency Disease Produced By The Rigid Exclusion Of Fat From The Diet. Nutr. Class. J. Biol. Chem. 82, 345-367.

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. Mutat Res. 1999; 424(1-2): 9-21.

Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. Am J Clin Nutr. 2006 ; 83(6 Suppl):1505S-1519S.

Calder, PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. Biochem Soc Trans 2005; 33, 423-427.168

Calon F, Lim GP, Morihara T, Yang F, Ubeda O, Salem N Jr, Frautschy SA, Cole GM. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Eur J Neurosci. 2005; 22(3):617-26.

Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N Jr, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. Neuron. 2004;43(5): 633-645.

Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. Pharmacological Research , 2004; 50, 1e11.

Capra, V., Thompson, M.D., Sala, A., Cole, D.E., Folco, G., Rovati, G.E. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. Medicinal Research Reviews, 2007; 27, 469e527.

Cardoso SM, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. J Neurochem, 2004; 89, 1417–1426.

Cardoso SM., Santana, I., Swerdlow RH, Oliveira, CR. Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. Journal of neurochemistry 2004; 89(6): 1417–1426.

Carrie I., Clement M., De Javel D., Frances H, Bourre JM. Phospholipid Supplementation Reverses Behavioral And Biochemical Alterations Induced By N-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency In Mice. J. Lipid Res, 2000; 41: 473-480.

Carroll Mc. The Role Of Complement And Complement Receptors In Induction And Regulation Of Immunity. Annu Rev Immunol, 1998;16: 545–568.

Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity Annu Rev Immunol. 1998;16: 545-568.

Casado A., Encarnacion Lopez-Fernandez M., Concepcion Casado M., de La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementia. Neurochem. Res. 2008. 33, 450–458.

Cederholm T, Palmblad J. Are omega-3 fatty acids options for prevention and treatment of cognitive decline and dementia? Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010;13(2): 150-155.

Chami L, Buggia-Prévot V, Duplan E, Delprete D, Chami M, Peyron JF, Checler F. Nuclear factor-κB regulates βAPP and β- and γ-secretases differently at physiological and supraphysiological Aβ concentrations. J Biol Chem. 2012; 287(29): 24573-24584.

Chapkin RS,Wang N, FanYY, Lupton JR, Prior IA. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell sur- face microdomains. Biochim Biophys Acta, 2008; 1778, 466-471.

Chen W, Jump DB, Esselman WJ, Busik JV.Inhibition of cytokine signaling in human retinal endothelial cells through modification of caveolae/lipid rafts by docosahex- aenoic acid. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007; 48: 18-26.

Chinnici CM, Yao Y, Praticò D. The 5-lipoxygenase enzymatic pathway in the mouse brain: young versus old. Neurobiol Aging. 2007; 28(9): 1457-1462.

Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. N Engl J Med. 2013; 368(19): 1845-1846.

Chong MF, Hodson L, Bickerton AS, Roberts R, Neville M, Karpe F, Frayn KN, Fielding BA. Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of highcarbohydrate feeding. Am J Clin Nutr. 2008; 87: 817–823.

Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. Am J Clin Nutr. 2000 ;71(2): 621S-629S.

Chu J, Giannopoulos PF, Ceballos-Diaz C, Golde TE, Pratico D. Adeno-associated virus-mediated brain delivery of 5-lipoxygenase modulates the AD-like phenotype of APP mice. Mol Neurodegener. 2012; 7(1):1.

Chu J, Praticò D. 5-lipoxygenase as an endogenous modulator of amyloid β formation in vivo. Ann Neurol. 2011; 69(1): 34-46.

Chu J, Praticò D. Involvement of 5-lipoxygenase activating protein in the amyloidotic phenotype of an Alzheimer's disease mouse model. J Neuroinflammation. 2012 ;9: 127.

Chu J, Praticò D. Pharmacologic blockade of 5-lipoxygenase improves the amyloidotic phenotype of an Alzheimer's disease transgenic mouse model involvement of γ-secretase. Am J Pathol. 2011; 178(4): 1762-1769.

Ciccarelli R, D'Alimonte I, Santavenere C, D'Auro M, Ballerini P, Nargi E, Buccella S, Nicosia S, Folco G, Caciagli F, Di Iorio P. Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway. Eur J Neurosci. 2004;20(6):1514-1524.

Cimini A, Moreno S, D'Amelio M, Cristiano L, D'Angelo B, Falone S, Benedetti E, Carrara P, Fanelli F, Cecconi F, Amicarelli F, Cerù MP. Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes. J Alzheimers Dis 2009; 18: 935-952.

Clairbone A. Catalase activity. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, ,CRC Press, 1985: 283–284

Codogno P, Meijer AJ. Autophagy in the liver. J Hepatol. 2013; 59(2): 389-391.

Cole GM, Frautschy SA. DHA may prevent age-related dementia. J Nutr. 2010; 140(4): 869-874.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 2003; 17(10): 1195-1214.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science. 1993 ; 261(5123): 921-923.

Costa DA, Cracchiolo JR, Bachstetter AD, Hughes TF, Bales KR, Paul SM, Mervis RF, Arendash GW, Potter H. Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. Neurobiol Aging. 2007; 28(6): 831-844.

Cotman CW, Head E. The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. J Alzheimers Dis. 2008;15(4): 685-707.

Couderc R A La Recherche De Marqueurs Biologiques De La Maladie D'alzheimer. Ann Biol Cline, 2000 ; 58(5) :581-593

Couzinet A, Hérines Z, Hueber AO. Régulation De La Mort Cellulaire Programmée : Vers Une Conception Plus Dynamique.2002 ; 18 : 841– 852.

Crisby M, Carlson LA, Winblad B. Statins in the prevention and treatment of Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord 2002; 16: 131-136.

Cuenca-López MD., Brea, D., Segura T., Galindo, MF., Antón-Martínez, D., Agulla, J., Castillo, J., Jordán, J.. Inflammation as a therapeutic agent in cerebral infarction: cellular inflammatory response and inflammatory mediators. Revue Neurologique 2010 ; 50, 349e359.

Cunnane, S. C., Plourde, M., Pifferi, F., Bégin, M., Féart, C., Barberger-Gateau, P. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. Progress in lipid research, 2009; 48(5): 239–256.

Dahlen, S.,. Treatment of asthma with anti leukotrienes: first line or last resort therapy? European Journal of Pharmacology 2006, 533, 40e56.

Daniela, L.K., Norbert, M., Neuroinflammation, microglia and implications for anti-Inflammatory treatment in Alzheimer's disease. International Journal of Alzheimer's Disease. 2010; 10 : 4061e4069

D'autréaux B, Toledano MB. Ros As Signalling Molecules: Mechanisms That Generate Specificity In Ros Homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2007; 8: 813-824.

Davies MJ. Singlet Oxygen –Mediated Damage To Protein And Its Consequences. Biochem Biophys Res Commun, 2003; 304 (3) P: 761-770.

Deacon Sean W, Serpinskaya Anna S, Vaughan Patricia S, Fanarraga Monica Lopez, Vernos Isabelle, Vaughan Kevin T, Gelfand Vladimir I .Dynactin Is Required For Bidirectional Organelle Transport. The Journal Of Cell Biology, 2003; 160 (3): 297–301.

Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en Il, Korkina O, Teng X Et Al.: Identification Of Rip1 Kinase As A Specific Cellular Target Of Necrostatins. Nat Chem Biol, 2008; 4: 313-321,.

Del Rio LA., Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules, Arch. Biochem. Biophys. 506 (2011) 1e11.

Delacourte A. Biochemical and molecular characterization of neurofibrillary degeneration in frontotemporal dementias. Dement Geriatr Cogn Disord. 1999; 10 Suppl 1:75-79.

Den Heijer, T., Vermeer, S. E., van Dijk, E. J., Prins, N. D., Koudstaal, P. J., Hofman, a, & Breteler, M. M. B. (2003). Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia*, *46*(12), 1604–1610.

Dessi F, Colle MA, Hauw JJ, Duyckaerts C. [Brain lesions, pathogenic and etiologic hypotheses of Alzheimer's disease]. Rev Prat. 1998;48(17):1873-1878.

Devore EE, Stampfer MJ, Breteler MM, Rosner B, Hee Kang J, Okereke O, et al. Dietary fat intake and cognitive decline in women with type 2 diabetes. Diabetes Care 2009;32:635–40

Dhenain M, Lehericy S Et Duyckaerts C Le Diagnostic: De La Neuropathologie A L'imagerie Cérébrale. Médecine/Sciences, 2002; 18 (6-7), 697-708.

Diczfalusy U. Beta-oxidation of eicosanoids. Prog Lipid Res. 1994; 33(4):403-428.

Dietschy, J. M. And Turley, S. D. Cholesterol Metabolism In The Brain. Curr. Opin. Lipidol. 2001; 12, 105-112.

Dietschy, J. M. And Turley, S. D. Cholesterol Metabolism In The Central Nervous System During Early Development And In The Mature Animal. J. Lip. Res, 2004; 45: 1375-1397.

Dimakopoulos, A. C., & Mayer, R. J.. Waltham International Symposium : Pet Nutrition Coming of Age Aspects of Neurodegeneration in the Canine Brain, 2002; 1 (2): 1579–1582.

Dirkx R., Vanhorebeek I., Martens K., Schad A., Grabenbauer M., Fahimi D., Baes M. Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. Hepatology (Baltimore, Md.), 2005; 41(4), 868–878.

Dosunmu R, Wu J, Basha Mr, Zawia Nh. Environmental And Dietary Risk Factors In Alzheimer's Disease. Expert Rev Neurother, 2007; 7: 887-900.

Dowling, A. L. S.,Head, E. Antioxidants in the canine model of human aging. Biochimica et biophysica acta, 2012; 1822(5): 685–689.

Duarte L.R., Jimenez M., Syssau A Et Launay M Etude De La Sensibilité D'une Batterie D'épreuves Sémantiques Au Vieillissement Normal Et A L'évolution De La Maladie D'alzheimer. Revue Européenne De Psychologie Appliquée , 2004 ; 54, 143-155.

Dubois,R.N., Abramson,S.B., Crofford,L., Gupta,R.A., Simon,L.S., Van De Putte,L.B., Lipsky,P.E. Cyclooxygenase In Biology And Disease. FASEB J 1998; 12: 1063-1073.

Durand T., Cracowski, JL, Berdeaux, O. [Isoprostanes, biomarkers of lipid peroxidation in humans. Part 1. Nomenclature and synthesis]. *Pathologie-biologie* 2005: *53*(6), 349–355.

Dyrks T, Dyrks E, Harmann R, Masters C, Beyreuther K. Amyloido- genicity of A4 and A4-bearing amyloid protein precursor frag- ments by metal-catalyzed oxidation. J Biol Chem 1992; 267: 18210–1827.

Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schüssel K, Müller WE. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochem Pharmacol. 2003; 66(8): 1627-1634.

Eckert JH, Erdmann R. Peroxisome biogenesis. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2003; 147: 75-121.

Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Nagpal S, Moser AB, Frosch MP, Ransohoff RM. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? Ann Neurol. 2008; 63(6):729-742.

Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Büttner S, Tavernarakis N, Madeo F. Necrosis in yeast. Apoptosis. 2010; 15(3):257-268.

Emken EA. Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. Annu Rev Nutr 1984;4: 339–376.

Emmerling MR, Watson MD, Raby CA, Spiegel K. The role of complement in Alzheimer's disease pathology. Biochim Biophys Acta. 2000; 1502(1):158-171.

Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, Van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, et al. Diet and risk of dementia: does fat matter? The Rotterdam Study. Neurology 2002;59:1915–21.

Enig MG, Atal S, Keeney M, Sampugna J. Isomeric trans fatty acids in the U.S. diet. J Am Coll Nutr 1990;9: 471–486.

Ertekin-Taner N. Genetics of Alzheimer's Disease: A Centennial Review. Neurol Clin. 2007; 25: 611–667.

Esterbauer H , Striegl G, Phul H and Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Free Radical Research Communications. 1989; 6: 67–75.

Fan QW, Yu W, Gong JS, et al. Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. J Neurochem. 2002; 80(1):178–190.

Fan YY, McMurray DN, Ly LH, Chapkin RS. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. J Nutr 133, 2003; 1913-2190.

Fanelli F, Sepe S, D'Amelio M, Bernardi C, Cristiano L, Cimini A, Cecconi F, Ceru' MP, Moreno S. Age-dependent roles of peroxisomes in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2013; 8: 8.

Farooqui AA, Rapoport SI, Horrocks LA. Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. Neurochem Res. 1997; 22(4): 523-527.

Farooqui AA. N-3 fatty acid-derived lipid mediators in the brain: new weapons against oxidative stress and inflammation. Curr Med Chem. 2012; 19(4):532-543.

Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA, 2001; 98: 5856-5861.

Faust PL, Kovacs WJ. Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. Biochimie. 2013 . pii: S0300-9084(13)00390-8. doi:10.1016/j.biochi.2013.10.019.

Feigenbaum V, Gélot A, Casanova P, Daumas-Duport C, Aubourg P, Dubois-Dalcq M. Apoptosis in the central nervous system of cerebral adrenoleukodystrophy patients. Neurobiol Dis. 2000; 7(6 Pt B): 600-612.

Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PA, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA, Wanders RJ. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. J Lipid Res. 2001; 42(12):1987-1995.

Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Marí M, Miranda M, Ardite E. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. Biofactors. 1998; 8(1-2): 7-11.

Fernstrom JD. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function. Lipids. 1999; 34(2): 161-169.

Ferrer I. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. J Bioenerg Biomembr. 2009; 41(5): 425-431.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M; Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet. 2005; 366(9503): 2112-2117.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Biochim Biophys Acta. 2006; 1757(9-10): 1371-1387.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect Immun. 2005; 73(4): 1907-1916.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1984;105: 114-121.

Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanye Mc, Docosahexaenoic Acid Prevents Neuronal Apoptosis Induced By Soluble Amyloid-Beta Oligomers. J Neurochem. 2006; 96: 385–395

Fournel S, Genestier L, Rouault JP, Lizard G, Flacher M, Assossou O, Revillard JP. Apoptosis without decrease of cell DNA content. FEBS Lett. 1995; 367(2): 188-192.

Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O., Role of peroxisomes in ROS/ RNS-metabolism: implications for human disease, Biochim. Biophys. Acta 2012; 1822: 1363e1373.

Fratiglioni L, Paillard-Borg S, Winblad B. An Active And Socially Integrated Lifestyle In Late Life Might Protect Against Dementia. Lancet Neurol, 2004; 3 : 343-353.

Frears ER, Stephens DJ, Walters CE, et al. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. NeuroReport 1999 ; 10 : 1699-1705.

Friedman WJ. Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. Exp Neurol. 2001;168(1): 23-31.

Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. Nat Cell Biol. 2007; 9: 139–148.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science, 2001; 294(5548):1871-1875.

Galea E, Launay N, Portero-Otin M, Ruiz M, Pamplona R, Aubourg P, Ferrer I, Pujol A. Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: a paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? Biochim Biophys Acta. 2012; 1822(9): 1475-1488.

Galino J, Ruiz M, Fourcade S, Schlüter A, López-Erauskin J, Guilera C, Jove M, Naudi A, García-Arumí E, Andreu AL, Starkov AA, Pamplona R, Ferrer I, Portero-Otin M, Pujol A. Oxidative damage compromises energy metabolism in the axonal degeneration mouse model of X-adrenoleukodystrophy. Antioxid Redox Signal. 2011; 15(8): 2095-2107.

Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. Cell. 2008; 135(7): 1161-1163

Gamoh S, Hashimoto M, Hossain S, Masumura S. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2001; 28(4): 266-270.

Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. J Clin Invest. 2005; 115(5): 1121-1129.

Geillon F, Trompier D, Gondcaille C, Lizard G, Savary S. Peroxisomal ABC transporters and X-linked adrenoleukodystrophy. Med Sci (Paris). 2012; 28(12): 1087-1094.

Gerber M , Razanamahefa L, Bougnoux P . Trans fatty acids and cancers: AFSSA recommendations. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007; 109: 954–959

Gibson GE, Starkov A, Blass JP, Ratan RR, Beal MF. Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. Biochim Biophys Acta. 2010 ;1802(1): 122-134

Gibson Wood W, Eckert GP, Igbavboa U, Müller WE. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta. 2003; 1610(2): 281-290.

Ginsberg L, Rafique S, Xuereb JH, Rapoport SI, Gershfeld NL. Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. Brain Res. 1995; 698(1-2): 223-226.

Giordano CR, Terlecky SR. Peroxisomes, cell senescence, and rates of aging. Biochim Biophys Acta. 2012; 1822(9): 1358-1362.

Girzalsky W, Saffian D, Erdmann R. Peroxisomal protein translocation. Biochim Biophys Acta. 2010; 1803(6): 724-731.

Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, Tan J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2008; 5: 51.

Golstein P, Kroemer G. Redundant cell death mechanisms as relics and backups. Cell death and differentiation. 2005; 12 Suppl 2: 1490–1496.

Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends in biochemical sciences. 2007; 32(1): 37–43.

Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Post-translational modifications of tau protein in lzheimer's disease. J Neural Transm. 2005; 112 (6): 813-838.

Gong CX, Liu F, Wu G, Rossie S, Wegiel J, Li L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. J Neurochem. 2004; 88(2): 298-310.

Gorelick PB. Role of inflammation in cognitive impairment: results of observational epidemiological studies and clinical trials. Ann N Y Acad Sci. 2010; 1207:155-162.

Grimm MO, Rothhaar TL, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Haupenthal VJ, Friess P, Kins S, Grimm HS, Hartmann T. Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). J Nutr Biochem. 2012 (10):1214-23.

Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. J Biol Chem. 2008; 283(32):21837-21841.

Grundman M. Vitamine E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. Am J Clin Nutr 2000; 71: 630S–636S.

Guan Z, Wang Y, Cairns NJ, Lantos PL, Dallner G, Sindelar PJ. Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 1999; 58(7): 740-747.

Guriot-Milandre C, Semprez C, Poncet M. Aspects cliniques et diagnostic de la Maladie d'Alzheimer. Médecine Thérapeutique, 1997; 3: 343-352.

Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, 1999; 936.

Hajjem S, Mrabet A. épidémiologie des démences en Tunisie. La Tunisie Médicale. 2008 ; 86 : 744-745.

Hall AM, Roberson ED. Mouse models of Alzheimer's disease. Brain Res Bull. 2012; 88(1): 3-12.

Han X, Holtzman DM, McKeel DW Jr. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. J. Neurochem 2001; 77: 1168–1180.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956; 11(3): 298-300.

Hartman, R.E., Shah, A., Fagan, AM., Schwetye, K.E., Parsadanian, M., Schulman, R. N., Finn, B., Holtzman DM. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease, 2006; 24: 506–515.

Haustgen, T., Sinzelle, J.Emil Kraepelin (1856–1926) – 2. Le Traité. Annales Médico-psychologiques, revue psychiatrique, 2010; 168(9) : 716–719.

Hayashi H, Hara M. 1-Alkenyl group of ethanolamine plasmalogen derives mainly from de novo-synthesized fatty alcohol within peroxisomes, but not extraperoxisomal fatty alcohol or fatty acid. J Biochem. 1997; 121 (5): 978-983.

Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 2002; 360 (9326): 7-22.

Hedley DW., Chow S. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. Cytometry, 1994; 15(4): 349–358.

Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. Hum Mol Genet. 2008; 17(12): 1750-1761.

Hengartner M O. The Biochemistry of Apoptosis .Nature, 2000; 407,770-776.

Hengartner MO, Bryant JA. Apoptotic Cell Death: Form Worms to Wombats But What About The Weeds, S.Ymp. Soc. Exp.Biol, 2000; 52, 1-12.

Heude B, Ducimetière P, Berr C; EVA Study. Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes--The EVA Study. Am J Clin Nutr. 2003; 77(4): 803-808

Heverin M, Bogdanovic N, Lutjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, Diczfalusy U, Winblad B, Björkhem I.. Changes In The Levels Of Cerebral And Extracerebral Sterols In The Brain Of Patients With Alzheimer's Disease. J Lipid Res 2004; 45: 186-193.

Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. Nat Med. 1998 ; 4(1): 97-100

Hompson PM, Vinters HV. Pathologic lesions in neurodegenerative diseases. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012; 107: 1-40.

Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. J Biol Chem. 2003; 278(17): 14677-14687.

Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, Reaume AG, Lang DM, Hirsch JD, Maeda N, Siman R, Greenberg BD, Scott RW, Flood DG. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. J Biol Chem 1998; 273: 16576-16582.

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, et al. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med 1997;337: 1491–1499.

Huang J, Viswakarma N, Yu S, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Cherkaoui-Malki M, Khan M, Singh I, Yang G, Rao MS, Borensztajn J, Reddy JK.Progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty acyl-CoA oxidase 1-deficient mice. Am J Pathol. 2011 Aug;179(2):703-13.

Hughes TM, Kuller LH, Lopez OL, Becker JT, Evans RW, Sutton-Tyrrell K, Rosano C. Markers of Cholesterol Metabolism In The Brain Show Stronger Associations With Cerebrovascular Disease Than Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis 2012; 30: 53-61.

Inestrosa NC, Carvajal FJ, Zolezzi JM, Tapia-Rojas C, Serrano F, Karmelic D, Toledo EM, Toro A, Toro J, Santos MJ. Peroxisome proliferators reduce spatial memory impairment, synaptic failure, and neurodegeneration in brains of a double transgenic mice model of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2013; 33(4): 941-959.

Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. Brain Res. 2008; 1237:35-43.

Islinger M, Grille S, Fahimi HD, Schrader M. The peroxisome: an update on mysteries. Histochem Cell Biol. 2012; 137(5): 547-574.

Iuliano, L. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. Chemistry and physics of lipids, 2011; 164(6), 457–468.

Ivashchenko O, Van Veldhoven PP, Brees C, Ho YS, Terlecky SR, Fransen M. Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk. Mol Biol Cell. 2011; 22(9):1440-1451.

Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Lancet Neurol. 2013; 12: 207-216.

Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol. 2010; 9: 119-128.

Jarvik GP, Wijsman EM, Kukull WA, Schellenberg GD, Yu C, Larson EB. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. Neurology. 1995; 45(6):1092–1096.

Jellinger Ka. Traumatic Brain Injury As A Risk Factor For Alzheimer's Disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 2004, 75, 511-512.

Jick H, Zornberg GL, Jick SS, et al. Statins and the risk of dementia. Lancet 2000; 356: 1627-1631

Johnson EJ, Schaefer EJ. Potential Role of Dietary N-3 Fatty Acids In The Prevention Of Dementia And Macular Degeneration. Am J Clin Nutr 2006; 83:1494s-1498s.

Johnson GV, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. J Cell Sci. 2004; 117(Pt 24): 5721-5729.

Jorm AF. Is depression a risk factor for dementia or cognitive decline? A review. Gerontology. 2000; 46(4): 219-227.

Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Casadesus, G. And Fisher, D.Oxydative Stress And Inflammation In Brain Aging: Nutritional Considerations. Neurochem. Res. 2005; 30: 927-935.

Jungwirth H, Ring J, Mayer T, Schauer A, Büttner S, Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Kuchler K, Madeo F. Loss of peroxisome function triggers necrosis. FEBS Lett. 2008; 582(19): 2882-2886.

Jurevics, H. And Morell, P. Cholesterol For Synthesis Of Myelin Is Made Locally, Not Imported Into Brain. J . Neurochem. 1995; 64: 895-901.

Kaether C, Haass C, Steiner H. Assembly, Trafficking And Function Of Gamma-Secretase. Neurodegener Dis. 2006; (4–5): 275–283

Kahn E, Baarine M, Dauphin A, Ragot K, Tissot N, Seguin A, Ménétrier F, Kattan Z, Bachelet CM, Frouin F, Lizard G. Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via LAURDAN and FAMIS spectral image analysis. Cytometry A. 2011; 79(4): 293-305.

Kalai M, Van Loo G, Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X, Vandenabeele P. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cellsntreated with interferon and dsRNA. Cell Death Differ. 2002; 9(9): 981-994.

Kalaria RN. Microglia and Alzheimer's disease. Curr Opin Hematol. 1999; 6(1):15-24.

Kalaria RN. The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci. 1999; 893: 113-125

Kalmijn S, van Boxtel MP, Ocké M, Verschuren WM, Kromhout D, Launer LJ. Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance a middle age. Neurology. 2004; 62(2): 275-280.

Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. Nat Genet. 2007; 39(8): 969-976.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology. 2000; 149(1): 43-50.

Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. Am J Physiol Cell Physiol. 2003; 284(5): C1309-1318.

Kemoto A, Ohishi M, Sato Y, Hata N, Misawa Y, Fujii Y, Okuyama H. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced alterations of learning behavior in the rat: level of n-6 fatty acids as another critical factor. J Lipid Res. 2001; 42(10): 1655-1663

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26(4): 239-257.

Khan M, Singh J, Gilg AG, Uto T, Singh I. Very long-chain fatty acid accumulation causes lipotoxic response via 5-lipoxygenase in cerebral adrenoleukodystrophy. J Lipid Res. 2010; 51(7): 1685-1695.

Khatoon F, Moinuddin, Alam K, Ali A. Physicochemical and immunological studies on 4-hydroxynonenal modified HSA: implications of protein damage by lipid peroxidation products in the etiopathogenesis of SLE. Hum Immunol. 2012; 73(11): 1132-1139.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Iivonen S, Mannermaa A, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. Ann Intern Med. 2002; 137(3): 149-155.

Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clavé C, Cleveland JL, Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Devenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difiglia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Dröge W, Dron M, Dunn WA Jr, Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fésüs L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, González-Estévez C, Gorski S, Gottlieb RA, Häussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Høyer-Hansen M, Hu X, Huang WP, Iwasaki A, Jäättelä M, Jackson WT, Jiang X, Jin S, Johansen T, Jung JU, Kadowaki M, Kang C, Kelekar A, Kessel DH, Kiel JA, Kim HP, Kimchi A, Kinsella TJ, Kiselyov K, Kitamoto K, Knecht E, Komatsu M, Kominami E, Kondo S, Kovács AL, Kroemer G, Kuan CY, Kumar R, Kundu M, Landry J, Laporte M, Le W, Lei HY, Lenardo MJ, Levine B, Lieberman A, Lim KL, Lin FC, Liou W, Liu LF, Lopez-Berestein G, López-Otín C, Lu B, Macleod KF, Malorni W, Martinet W, Matsuoka K, Mautner J, Meijer AJ, Meléndez A, Michels P, Miotto G, Mistiaen WP, Mizushima N, Mograbi B, Monastyrska I, Moore MN, Moreira PI, Moriyasu Y, Motyl T, Münz C, Murphy LO, Naqvi NI, Neufeld TP, Nishino I, Nixon RA, Noda T, Nürnberg B, Ogawa M, Oleinick NL, Olsen LJ, Ozpolat B, Paglin S, Palmer GE, Papassideri I, Parkes M, Perlmutter DH, Perry G, Piacentini M, Pinkas-Kramarski R, Prescott M, Proikas-Cezanne T, Raben N, Rami A, Reggiori F, Rohrer B, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Sakagami H, Sakai Y, Sandri M, Sasakawa C, Sass M, Schneider C, Seglen PO, Seleverstov O, Settleman J, Shacka JJ, Shapiro IM, Sibirny A, Silva-Zacarin EC, Simon HU, Simone C, Simonsen A, Smith MA, Spanel-Borowski K, Srinivas V, Steeves M, Stenmark H, Stromhaug PE, Subauste CS, Sugimoto S, Sulzer D, Suzuki T, Swanson MS, Tabas I, Takeshita F,Talbot NJ, Tallóczy Z, Tanaka K, Tanaka K, Tanida I, Taylor GS, Taylor JP, Terman A, Tettamanti G, Thompson CB, Thumm M, Tolkovsky AM, Tooze SA, Truant R, Tumanovska LV, Uchiyama Y, Ueno T, Uzcátegui

NL, van der Klei I, Vaquero EC, Vellai T, Vogel MW, Wang HG, Webster P, Wiley JW, Xi Z, Xiao G, Yahalom J, Yang JM, Yap G, Yin XM, Yoshimori T, Yu L, Yue Z, Yuzaki M, Zabirnyk O, Zheng X, Zhu X, Deter RL. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Autophagy. 2008; 4(2): 151-175.

Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science. 2000; 290(5497): 1717-1721.

Knazek RA, Rizzo WB, Schulman JD, Dave JR. Membrane microviscosity is increased in the erythrocytes of patients with adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. J Clin Invest. 1983; 72(1): 245-248.

Knopman D, Boland LL, Mosley T, Howard G, Liao D, Szklo M, McGovern P, Folsom AR; Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. Neurology. 2001; 56(1): 42-48.

Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(10): 5815-5820.

Kölsch H, Heun R, Kerksiek A, Bergmann KV, Maier W, Lütjohann D. Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. Neurosci Lett. 2004; 368(3): 303-308.

Kölsch H, Lütjohann D, Tulke A, Björkhem I, Rao ML. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Brain Res. 1999; 818(1): 171-175.

Kopec KK, Carroll RT. Alzheimer's beta-amyloid peptide 1-42 induces a phagocytic response in murine microglia. J Neurochem. 1998; 71(5): 2123-2131.

Kotti TJ, Ramirez DM, Pfeiffer BE, Huber KM, Russell DW. Brain Cholesterol Turnover Required For Geranylgeraniol Production And Learning In Mice. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 3869-3874.

Kou J, Kovacs GG, Höftberger R, Kulik W, Brodde A, Forss-Petter S, Hönigschnabl S, Gleiss A, Brügger B, Wanders R, Just W, Budka H, Jungwirth S, Fischer P, Berger J. Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 2011; 122(3): 271-283.

Kragh CL, Ubhi K, Wyss-Coray T, Masliah E. Autophagy in dementias. Brain Pathol. 2012; 22(1):99-109. doi: 10.1111/j.1750-3639.2011.00545.x. Review. Erratum in: Brain Pathol. 2012 Mar;22(2):259.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ. 2005; 12 Suppl 2: 1463-1467.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009; 16(1): 3-11.

Kroger J, Zietemann V, Enzenbach C, Weikert C, Jansen EH, Doring F, Joost HG, Boeing H, Schulze MB. Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. Am J Clin Nutr. 2011; 93: 127–142.

Kudo T, Imaizumi K, Tanimukai H, Katayama T, Sato N, Nakamura Y, Tanaka T, Kashiwagi Y, Jinno Y, Tohyama M, Takeda M. Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease? Neurobiol Aging. 2000; 21(2): 215-224.

Kuslansky G, Katz M, Verghese J, Hall Cb, Lapuerta P, Laruffa G, Lipton Rb. Detecting Dementia With The Hopkins Verbal Learning Test And Mini-Mental State Examination. Archives Of Clinical Neuropsychology. 2004; 19, 89-104.

Laakko T, King L, Fraker P. Versatility of merocyanine 540 for the flow cytometric detection of apoptosis in human and murine cells. J Immunol Methods. 2002; 261(1-2): 129-139.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259): 680-685.

Laferla, F. M.; Oddo, S., Alzheimer's Disease: Aβ, Tau And Synaptic Disfunction. Trends Mol. Med. 2005; 11: 170-176.

Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA, Brayne C, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia. Neurology. 1999; 52(1): 78-84.

Launer LJ, White LR, Petrovitch H, et al. Cholesterol and neuropathologic markers of AD. A population-based autopsy study. Neurology 2001; 57: 1447-1452.

Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnics Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnics K, Sisodia SS. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. Cell 2005; 120(5): 701-713.

Lazarow PB. Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. Curr Opin Cell Biol. 2003; 15(4): 489-497

Le Carret N, Auriacombe S, Letenneur L, Bergua V, Dartigues JF, Fabrigoule C. Influence of education on the pattern of cognitive deterioration in AD patients: the cognitive reserve hypothesis. Brain Cogn. 2005; 57(2): 120-126.

Ledoux M, Chardigny JM, Darbois M, et al. Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. J Food Comp Anal 2005; 18: 409–425

Lee JY, Yao TP. Quality control autophagy: a joint effort of ubiquitin, protein deacetylase and actin cytoskeleton. Autophagy. 2010; 6(4): 555-557.

Lemaitre RN, King IB, Sotoodehnia N, Knopp RH, Mozaffarian D, McKnight B, Rea TD, Rice K, Friedlander Y, Lumley TS, Raghunathan TE, Copass MK, Siscovick DS. Endogenous red blood cell membrane fatty acids and sudden cardiac arrest. Metabolism. 2010; 59: 1029–1034.

Leoni V, Caccia C. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. Chem Phys Lipids. 2011; 164(6): 515-524.

Leoni, V, Caccia, C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. Biochimie, 2013; 95(3): 595–612.

Leoni, V, Caccia, C. Potential diagnostic applications of side chain oxysterols analysis in plasma and cerebrospinal fluid. Biochemical pharmacology. 2013; 86(1): 26-36.

Letenneur L, Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group. Am J Epidemiol. 2000; 151(11): 1064-1071

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell. 2008; 132(1): 27-42.

Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free Radic Biol Med. 2002; 32(9): 790-796.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science. 1995; 269(5226): 973-977.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES. Cytochrome C And Datp-Dependent Formation Of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates An Apoptotic Protease Cascade. Cell, 1997; 91(4): 479-489.

Li R, Shen Y, Yang LB, Lue LF, Finch C, Rogers J. Estrogen enhances uptake of amyloid beta-protein by microglia derived from the human cortex. J Neurochem. 2000; 75(4):1447-1454.

Li S, Jin M, Zhang D, Yang T, Koeglsperger T, Fu H, Selkoe DJ. Environmental novelty activates β2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by Aβ oligomers. Neuron. 2013; 77(5): 929-941.

Li Y, Barger SW, Liu L, Mrak RE, Griffin WS. S100beta induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons. J Neurochem. 2000; 74(1): 143-150.

Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature. 2006; 443(7113): 787-795.

Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. Int J Biochem Cell Biol. 2003; 35(11): 1505-1535.

Little SJ, Lynch MA, Manku M, Nicolaou A. Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: a lipidomic analysis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2007; 77(3-4): 155-162.

Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. Cytometry. 1995; 21(3): 275-283

Lizard G, Rouaud O, Demarquoy J, Cherkaoui-Malki M, Iuliano L. Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. J Alzheimers Dis. 2012; 29(2): 241-254.

longitudinal increase in CSF F2-isoprostanes in Alzheimer's disease. J Alzheimers. Dis. 2004; 6(1): 93-97.

Lordan S, Mackrill JJ, O'Brien NM. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. J Nutr Biochem. 2009; 20(5): 321-336.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. Arch Neurol. 2002; 59(8): 1258-1263.

Lukiw WJ, Bazan NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. J Nutr. 2008; 138(12): 2510-2514.

Lukiw WJ, Bazan NG. Survival signalling in Alzheimer's disease. Biochem Soc Trans. 2006; 34(Pt 6):1277-1282.

Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, A Role For Docosahexaenoic Acid-Derived Neuroprotectin D1 In Neural Cell Survival And Alzheimer Disease. J Clin Invest 2005; 115: 2774–2783

Lukiw WJ, Pappolla M, Pelaez RP, Bazan NG. Alzheimer's disease--a dysfunction in cholesterol and lipid metabolism. Cell Mol Neurobiol. 2005; 25(3-4):475-483.

Lukiw, WJ, Bazan, NG. Survival signalling in Alzheimer's disease. Biochemical Society transactions, 2006; 34(Pt 6): 1277–1282.

Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol. 2001; 280(4): C719-741.

Lund EG, Xie C, Kotti T, Turley SD, Dietschy JM, Russell DW. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. J Biol Chem. 2003; 278(25): 22980-22988.

Ma DW, Seo J, Switzer KC, Fan YY, McMurray DN, Lup- ton JR, Chapkin RS. n-3 PUFA and membrane mi- crodomains: a new frontier in bioactive lipid research. J Nutr Biochem, 2003; 15: 700-706.

Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. J Neurosci. 2009; 29: 9078-9089.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol. 1995; 146(1): 3-15.

Malchiodi-Albedi F, Domenici MR, Paradisi S, Bernardo A, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. Astrocytes contribute to neuronal impairment in beta A toxicity increasing apoptosis in rat hippocampal neurons. Glia. 2001; 34(1): 68-72.

Mandybur TI, Chuirazzi CC. Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. Neurology. 1990; 40(4): 635-639.

Mankidy R, Ahiahonu PW, Ma H, Jayasinghe D, Ritchie SA, Khan MA, Su-Myat KK, Wood PL, Goodenowe DB. Membrane plasmalogen composition and cellular cholesterol regulation: a structure activity study. Lipids Health Dis. 2010; 9: 62.

Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, Bazan NG. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. J Biol Chem. 2003; 278(44): 43807-43817.

Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. J Immunol. 1996; 157(11): 4830-4836.

Markesbery WR, Lovell MA. Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. Arch Neurol. 2007; 64(7): 954-956.

Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med 1997; 23: 134–147.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res. 1999; 424(1-2): 83-95.

Martin L, Latypova X, Terro F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. Neurochem Int. 2011; 58(4):458-471.

Martin L, Magnaudeix A, Wilson CM, Yardin C, Terro F. The new indirubin derivative inhibitors of glycogen synthase kinase-3, 6-BIDECO and 6-BIMYEO, prevent tau phosphorylation and apoptosis induced by the inhibition of protein phosphatase-2A by okadaic acid in cultured neurons. J Neurosci Res. 2011; 89(11): 1802-1811

Martín V, Fabelo N, Santpere G, Puig B, Marín R, Ferrer I, Díaz M. Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. J Alzheimers Dis. 2010; 19(2): 489-502.

Martin-Garcia, J. Mitochondria and the heart. Developments in Cardiovascular Medicine. 2005; 256: 400.

Maselli AG, Davis R, Furukawa R, Fechheimer M. Formation of Hirano bodies in Dictyostelium and mammalian cells induced by expression of a modified form of an actin-crosslinking protein. J Cell Sci. 2002; 115(Pt 9): 1939-1949.

Mast FD, Li J, Virk MK, Hughes SC, Simmonds AJ, Rachubinski RA. A Drosophila model for the Zellweger spectrum of peroxisome biogenesis disorders. Dis Model Mech. 2011; 4(5): 659-672.

Mathur J, Mathur N, Hülskamp M. Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. Plant Physiol. 2002; 128(3): 1031-1045.

Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. Physiol Rev. 1997; 77(4): 1081-1132.

Mayatepek E, Tiepelmann B.. Defective degradation of leukotrienes in peroxisomal- deficient human hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 227(1): 131-134.

Mayeux R, Ottman R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H, Chun M, Tycko B, Shelanski M. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. Neurology. 1995; 45: 555-557.

McCann JC, Ames BN. Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. Am J Clin Nutr. 2005; 82(2): 281-295.

McCrimmon RJ, Ryan CM, Frier BM. Diabetes and cognitive dysfunction. Lancet. 2012; 379(9833): 2291-2299.

McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, Skipper L, Murphy M, Beard J, Das P, Jansen K, Delucia M, Lin WL, Dolios G, Wang R, Eckman CB, Dickson DW, Hutton M, Hardy J, Golde T. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. Neuron. 2005; 47(2): 191-199.

McKeith I. Clinical aspects of dementia with Lewy bodies. Handb Clin Neurol. 2008; 89: 307-311.

Medeiros R, Figueiredo CP, Pandolfo P, Duarte FS, Prediger RD, Passos GF, Calixto JB. The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. Behav Brain Res. 2010; 209(1): 165-173.

Meijer AJ , Codogno P: Regulation And Role Of Autophagy In Mammalian Cells. Int J Biochem Cell Biol, 2004; 36: 2445-2462.

Meyer-Luehmann M, Spires-Jones Tl, Prada C, Garcia- Alloza M, De Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht- Talboo J, Holtzman Dm, Bacskai Bj, Hyman Bt. 2008. Rapid Appearance And Local Toxicity Of Amyloid-B Plaques In A Mouse Model Of Alzheimer’s Disease.Nature 451: 720–724.

Michael W. Nestor, Daniel Paull, Samson Jacob, Andrew A. Sproul, Abdulaziz Alsaffar, Brian A. Campos, Scott A. Noggle. Differentiation of serum-free embryoid bodies from human induced pluripotent stem cells into networks. Stem Cell Research, 2013; 10 (3): 454.

Mielke MM, Zandi PP, Sjögren M, Gustafson D, Ostling S, Steen B, Skoog I. High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia.Neurology. 2005; 64(10): 1689-1695.

Minamide LS, Striegl AM, Boyle JA, Meberg PJ, Bamburg JR. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. Nat Cell Biol. 2000; 2: 628– 636.

Minn AJ, Vélez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. Nature 1997; 385(6614): 353-357.

Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jürgens G, Nègre-Salvayre A, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Néel D, Gambert P, Lizard G. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 303(3): 814-824.

Montine TJ, Markesbery WR, Morrow JD, Roberts LJ. Cere-brospinal fluid F2-isoprostane levels are increased in Alzheimer’s disease. Ann Neurol 1998; 44: 410–413.

Montine TJ, Quinn J, Kaye J, Morrow JD. F(2)-isoprostanes as biomarkers of late-onset Alzheimer's disease. J Mol Neurosci. 2007; 33(1): 114-119.

Morgan C, Colombres M, Nuñez MT, Inestrosa NC. Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. Prog Neurobiol. 2004; 74(6): 323-349.

Moriguchi T, Loewke J, Garrison M, Catalan JN, Salem N Jr. Reversal of docosahexaenoic acid deficiency in the rat brain, retina, liver, and serum. J Lipid Res. 2001; 42(3): 419-427.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, et al. Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. Arch Neurol 2003;60: 194–200.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Wilson RS. Dietary fat intake and 6- year cognitive change in an older biracial community population. Neurology 2004;62: 1573–1579.

Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ 2nd, Burk RF. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. J Clin Invest. 1992; 90(6): 2502-2507.

Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al. Reduction of beta-amyloid peptide 42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1995; 38(4): 643-648.

Mulder M, Ravid R, Swaab DF, de Kloet ER, Haasdijk ED, Julk J, van der Boom JJ, Havekes LM. Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E4. Alzheimer Dis Assoc Disord. 1998; 12(3): 198-203.

Müller CC, Nguyen TH, Ahlemeyer B, Meshram M, Santrampurwala N, Cao S, Sharp P, Fietz PB, Baumgart-Vogt E, Crane DI. PEX13 deficiency in mouse brain as a model of Zellweger syndrome: abnormal cerebellum formation, reactive gliosis and oxidative stress. Dis Model Mech. 2011; 4(1): 104-119.

Musiek ES, Yin H, Milne GL, and Morrow JD. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. Lipids 2005; 40: 987–994.

Naqvi AZ, Harty B, Mukamal KJ, Stoddard AM, Vitolins M, Dunn JE. Monounsat- urated, trans, and saturated fatty acids and cognitive decline in women. J Am Geriatr Soc 2011;59:837–843.

Neill D, Hughes D, Edwardson JA, Rima BK, Allsop D. Human IMR-32 neuroblastoma cells as a model cell line in Alzheimer's disease research. J Neurosci Res. 1994; 39(4): 482-493.

Nguyen T, Bjorkman J, Paton BC, Crane DI. Failure of microtubule-mediated peroxisome division and trafficking in disorders with reduced peroxisome abundance. J Cell Sci. 2006; 119(Pt 4): 636-645.

Nishiyama M, Oamoto H, Watanabe T, Hori T, Hada T, Ueda N, Yamamoto S, Tsukamoto H, Watanabe K, Kirino T: Localization of arachidonate 12-lipoxygenase in canine brain tissue. J Neurochem 1992, 58: 1395–1400

Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. J Neuropathol Exp Neurol. 2005; 64(2): 113-122.

Nulton-Persson AC, Szweda LI. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. J Biol Chem. 2001; 276(26): 23357-23361

Nunan J, Small DH. Proteolytic processing of the amyloid-beta protein precursor of Alzheimer's disease. Essays Biochem. 2002; 38: 37-49.

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. J Neurosci. 2006; 26(40): 10129-10140.

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2003; 24(8): 1063-1070.

Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. J Biol Chem. 1987; 262(12): 5488-5491.

Ormerod MG, Collins MK, Rodriguez-Tarduchy G, Robertson D. Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. J Immunol Methods. 1992; 153(1-2): 57-65.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4(7): 552-565.

Owbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76(9): 4350-4354.

Paintlia AS, Gilg AG, Khan M, Singh AK, Barbosa E, Singh I. Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. Neurobiol Dis. 2003; 14(3): 425-439.

Panza F, Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Torres F, Del Parigi A, Capurso S, Capurso A. Mediterranean diet and cognitive decline. Public Health Nutr. 2004; 7(7): 959-963.

Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow EM, Berg S, Hellberg S, Fälting J, Distel M, Köster RW, Schmid B, Haass C. A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. J Clin Invest. 2009; 119(5): 1382-1395.

Parnetti L, Lanari A, Silvestrelli G, Saggese E, Reboldi P. Diagnosing prodromal Alzheimer's disease: role of CSF biochemical markers. Mech Ageing Dev. 2006; 127(2): 129-132.

Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 297: E28–E37.

Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. Biol Psychiatry. 1998; 43(5): 315-319.

Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ; Honolulu-Asia Aging Study. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. Diabetes. 2002; 51(4): 1256-1262.

Pellerin-Massicotte, J. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. Journal of Aquatic Ecosystem Health. 1994; 3(2): 101–111.

Perandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(26): 14376-14381.

Perez JL, Carrero I, Gonzalo P, Arevalo-Serrano J, Sanz-Anquela JM, Ortega J, Rodriguez M, Gonzalo-Ruiz A. Soluble oligomeric forms of beta-amyloid (Abeta) peptide stimulate Abeta production via astrogliosis in the rat brain. Exp Neurol. 2010; 223(2): 410-421.

Petersson H, Basu S, Cederholm T, Riserus U. Serum fatty acid composition and indices of stearoyl-CoA desaturase activity are associated with systemic inflammation: longitudinal analyses in middle-aged men. Br J Nutr. 2008; 99: 1186–1189.

Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ. Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. Neurochem Res. 2001; 26(7):771-782.

Piomelli D, Volterra A, Dale N, Siegelbaum SA, Kandell ER, Schwartz JH, Belardetti F: Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for pre-synaptic inhibition of Aplysia sensory cells. Nature 1987, 328: 38–43

Powers JM, Liu Y, Moser AB, Moser HW. The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. J Neuropathol Exp Neurol. 1992; 51(6): 630-643.

Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H, Markesbery WR. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. Neurochem Res. 1998; 23(1): 81-88.

Prasanthi JR, Huls A, Thomasson S, Thompson A, Schommer E, Ghribi O. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Mol Neurodegener. 2009; 4:1.

Praticò D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. Ann Neurol. 2000; 48(5): 809-812

Praticò D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. Arch Neurol. 2002; 59(6): 972-976.

Praticò D, Zhukareva V, Yao Y, Uryu K, Funk CD, Lawson JA, Trojanowski JQ, Lee VM. 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. Am J Pathol. 2004; 164(5): 1655-1662.

Praticò D. Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead. Neurobiol Aging. 2005; 26(5): 581-583.

Prunet C, Montange T, Véjux A, Laubriet A, Rohmer JF, Riedinger JM, Athias A, Lemaire-Ewing S, Néel D, Petit JM, Steinmetz E, Brenot R, Gambert P, Lizard G. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. Cytometry A. 2006; 69(5): 359-373.

Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. Dialogues Clin Neurosci. 2009; 11(2): 111-128.

Quinn JF, Montine KS, Moore M, Morrow JD, Kaye JA, Montine TJ. Suppression of longitudinal increase in CSF F2-isoprostanes in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2004; 6(1): 93-97.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologicprocess in wound healing. Int J Low Extrem Wounds. 2005; 4(3): 138-144

Ramaroson H, Helmer C, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Dartigues JF; PAQUID. [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. Rev Neurol (Paris). 2003; 159(4): 405-411

Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC Jr, Arnold JT, Rapoport SI, Bazinet RP. n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. Mol Psychiatry. 2007; 12(1): 36-46.

Rapoport SI, Igarashi M, Gao F. Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2010; 82(4-6): 273-276.

Rapoport SI. In vivo approaches to quantifying and imaging brain arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism. J Pediatr. 2003; 143(4 Suppl): S26-34.

Rapp S, Saffrich R, Anton M, Jäkle U, Ansorge W, Gorgas K, Just WW. Microtubule-based peroxisome movement. J Cell Sci. 1996; 109 (Pt 4): 837-849.

Reddy JK, Mannaerts GP. Peroxisomal lipid metabolism. Annu Rev Nutr. 1994; 14: 343-370.

Reddy PH, Manczak M, Mao P, Calkins MJ, Reddy AP, Shirendeb U. Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. J Alzheimers Dis. 2010; 20 Suppl 2: S499-512.

Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. Trends Mol Med. 2001; 7(7): 314-319.

Refolo LM, Malester B, La Francois J, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. Neurobiol Dis 2000; 7: 321-331.

Reitz C, Tang MX, Luchsinger J, Mayeux R. Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. Arch Neurol. 2004; 61(5): 705–714.

Renauld AE, Spengler RN. Tumor necrosis factor expressed by primary hippocampal neurons and SH-SY5Y cells is regulated by alpha (2)-adrenergic receptor activation. J Neurosci Res. 2002; 67(2): 264-274.

Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. Cell Death Differ. 2009; 16(3): 378-385.

Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. Neurochem Int. 2001; 39(5-6):333-340.

Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. Glia. 2002; 40(2): 260-269.

Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E. Caspase-9 Activation And Caspase Cleavage Of Tau In The Alzheimer's Disease Brain. Neurobiol Dis, 2002; 11(2): 341-354.

Román GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A, et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. Neurology. 1993; 43(2): 250-260.

Rosenbaum DM, Degterev A, David J, Rosenbaum PS, Roth S, Grotta JC, Cuny GD, Yuan J, Savitz SI. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model. J Neurosci Res. 2010; 88(7): 1569-1576.

Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'-dichlorofluorescin. J Leukoc Biol. 1990; 47(5): 440-448.

Rothhaar TL, Grösgen S, Haupenthal VJ, Burg VK, Hundsdörfer B, Mett J, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MO. Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting γ-secretase activity in Alzheimer's disease. Scientific World Journal. 2012; 2012:141240.

Roy A, Ferlay A, Chilliard Y. Production of butter fat rich in trans10-C18:1 for use in biomedical studies in rodents. Reprod Nutr Dev. 2006; 46(2): 211-218.

Rucktäschel R, Girzalsky W, Erdmann R. Protein import machineries of peroxisomes. Biochim Biophys Acta. 2011; 1808(3): 892-900.

Sanders RJ, Ofman R, Dacremont G, Wanders RJA & Kemp S. Characterization of the human omegaoxidation pathway for omega-hydroxy-very-long-chain fatty acids. FASEB J 2008; 22: 2064–2071.

Sanders RJ, Ofman R, Duran M, Kemp S & Wanders RJA. Omega-oxidation of very long-chain fatty acids in human liver microsomes. Implications for X-linked adrenoleukodystrophy. J Biol Chem. 2006; 281: 13180–13187.

Santos MJ, Quintanilla RA, Toro A, Grandy R, Dinamarca MC, Godoy JA, Inestrosa NC. Peroxisomal proliferation protects from beta-amyloid neurodegeneration. J Biol Chem. 2005; 280(49): 41057-41068.

Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Ubiquilin-1 immunoreactivity is concentrated on Hirano bodies and dystrophic neurites in Alzheimer's disease brains. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013. doi: 10.1111/nan.12036.

Savary S, Trompier D, Andréoletti P, Le Borgne F, Demarquoy J, Lizard G. Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation. Curr Drug Metab. 2012; 13(10): 1358-1370.

Sayre LM., Perry G, Harris PL, Lui Y, Schubert KA, Smith MA. In Situ Oxidative Catalysis By Neurofibrillar Tangle And Senile Plaques Il Alzheimer's Disease: A Central And New Perspective Role For Bound Transition Metals. J. Neurochem. 2000; 74 (1): 270-279

Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation. Arch Neurol. 2006; 63(12):1709-1717.

Scarmeas N, Stern Y. Cognitive Reserve: Implications For Diagnosis And Prevention of alzheimer’s Disease. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2004; 4: 374-380.

Scarmeas N, Stern Y, Tang MX., Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer’s disease. Annals of Neurology, 2006; 59(6): 912–921.

Schenk D., Hagen M., Seubert P. Current Progress In Beta-Amyloid Immunotherapy. Curr. Opin. Immunol., 2004, 16(5): 599-606.

Schlegel RA, Stevens M, Lumley-Sapanski K, Williamson P. Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes. Immunol Lett. 1993; 36(3): 283-238.

Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. Int J Biochem & Cell Biol 2000; 32(11-12):1123–1136.

Schrader M, Fahimi HD. The peroxisome: still a mysterious organelle. Histochem Cell Biol. 2008; 129(4): 421-440.

Schrader M, King SJ, Stroh TA, Schroer TA. Real time imaging reveals a peroxisomal reticulum in living cells. J Cell Sci. 2000; 113 (Pt 20): 3663-3671.

Schrader M, Thiemann M, Fahimi HD. Peroxisomal motility and interaction with microtubules. Microsc Res Tech. 2003; 61(2): 171-178.

Schroer TA. Dynactin. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004; 20: 759-779.

Schutz Y. Concept of fat balance in human obesity revisited with particular reference to de novo lipogenesis. Int J Obes Relat Metab Disord. 2004; 28 (Suppl 4):S3–S11.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol Rev. 2001; 81(2): 741-766.

Selkoe DJ. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(20): 11039-11041.

Seripa D, D'Onofrio G, Panza F, Cascavilla L, Masullo C, Pilotto A. The genetics of the human APOE polymorphism. Rejuvenation Res. 2011; 14(5): 491-500.

Shafaati M, Marutle A, Pettersson H, Lövgren-Sandblom A, Olin M, Pikuleva I, Winblad B, Nordberg A, Björkhem I. Marked Accumulation Of 27-Hydroxycholesterol In The Brains Of Alzheimer's Patients With The Swedish App 670/671 Mutation. J Lipid Res 2011; 52:1004-1010.

Shen Y, Li R, McGeer EG, McGeer PL. Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. Brain Res.1997; 769(2): 391-395.

Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen EL, Buckley BM, Cobbe SM, Ford I, Gaw A, Hyland M, Jukema JW, Kamper AM, Macfarlane PW, Meinders AE, Norrie J, Packard CJ, Perry IJ, Stott DJ, Sweeney BJ, Twomey C, Westendorp RG. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. Lancet 2002; 360: 1623-1630.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Perkicak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature. 1995; 375(6534): 754-760.

Shi R, Zhang Y, Shi Y, Shi S, Jiang L. Inhibition of peroxisomal β-oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and Aβ generation in the rat brain. Neurosci Lett 2012; 528: 6-10.

Shin RW, Kruck TP, Murayama H, Kitamoto T. A novel trivalent cation chelator Feralex dissociates binding of aluminum and iron associated with hyperphosphorylated tau of Alzheimer's disease. Brain Res. 2003; 961(1): 139-146.

Silva DF, Selfridge JE, Lu JEL, Cardoso SM, Swerdlow RH. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease: possible targets for therapeutic intervention. Adv Pharmacol 2012; 64: 83-126.

Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of β-amyloid in hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(11):6460–6464.

Singh I , Pahan K, Khan M, Singh AK, Cytokine-mediated induction of ceramide production is redox-sensitive. Implications to proinflammatory cytokine-mediated apoptosis in demyelinating diseases, J. Biol. Chem. 1998; 273: 20354-20362.

Singh I, Pujol A. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. Brain Pathol. 2010; 20(4): 838-844.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. Cell Death Differ. 1999; 6(11): 1067-1074.

Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. Lipids. 1991; 26(6): 421-425.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010; 119(1): 7-35.

Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Todarello O, Pellicani V, Capurso SA, Pietrarossa G, Santamato V, Capurso A, Panza F. Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. Clin Chim Acta. 2006; 364(1-2): 91-112.

Solfrizzi V, Panza F, Capurso A. The role of diet in cognitive decline. J Neural Transm. 2003; 110(1): 95-110.

Solomon A, Leoni V, Kivipelto M, Besga A, Oksengård AR, Julin P, Svensson L, Wahlund LO, Andreasen N, Winblad B, Soininen H, Björkhem I. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2009; 462(1): 89-93.

Sparks DL, Martin TA, Gross DR, Hunsaker JC 3rd. Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review. Microsc Res Tech. 2000; 50(4):287-290.

Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. Exp Neurol. 1994; 126(1): 88-94.

Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. J Neurosci 2004; 24(36): 7779-7788.

Stender S, Dyerberg J, Holmer G, Ovesen L, Sandstrom B. The influence of trans fatty acids on health: a report from the Danish Nutrition Council. Clin Sci (Lond) 1995; 88: 375–392.

Streit WJ, Sparks DL. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. J Mol Med 1997; 75 : 130-138.

Sunderland T, Gur RE, Arnold SE. The use of biomarkers in the elderly: current and future challenges. Biol Psychiatry. 2005; 58(4): 272-276.

Svitkina, T.M. And Borisy, G.G. Arp2/3 Complex And Actin Depolymerizing Factor/Cofilin In Dendritic Organization And Treadmilling Of Actin Filament Array In Lamellipodia. J. Cell Biol., 1999; 145, 1009-1026.

Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozawa N, Wanders RJ, Kondo N. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. Brain Dev. 2003; 25(7): 481-487.

Takuma H, Tomiyama T, Kuida K, Mori H. Amyloid Beta Peptide-Induced Cerebral Neuronal Loss Is Mediated By Caspase-3. J Neuropathol Exp Neurol., 2004; 63(3): 255-261.

Tanabe Y, Hashimoto M, Sugioka K, Maruyama M, Fujii Y, Hagiwara R, Hara T, Hossain SM, Shido O. Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with an increase in Fos expression in rat CA1 hippocampus. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004; 31(10): 700-703.

Tanaka M, Yamaguchi K, Tatsukawa T, Theis M, Willecke K, Itohara S. Connexin43 and bergmann glial gap junctions in cerebellar function. Front Neurosci. 2008; 2(2): 225-233

Tatebayashi Y, Haque N, Tung YC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. J Cell Sci. 2004; 117(Pt 9): 1653-1663.

Tatebayashi Y. Neuropsychological and neuropathological interactions in affective and cognitive geriatric syndromes. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. 2004; 24(5): 273-277.

Tenner AJ. Complement in Alzheimer's disease: opportunities for modulating protective and pathogenic events. Neurobiol Aging. 2001; 22(6):849-861.

Terlecky SR, Koepke JI, Walton PA. Peroxisomes and aging. Biochim Biophys Acta. 2006; 1763(12): 1749-1754.

Tomasiewicz HG, Flaherty DB, Soria JP, et al. Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. J Neurosci Res. 2002;70: 734–745.

Touchon J & Portet F. Maladie D'alzheimer : Aspects Cliniques Et Thérapeutiques. Feuillets De Biologie. 41(236), 2000; 53-61.

Tretter L, Adam-Vizi V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005; 360(1464): 2335-2345.

Trompier D, Vejux A, Zarrouk A, Gondcaille C, Geillon F, Nury T, Savary S, Lizard G. Brain peroxisomes. Biochimie. 2013. doi:pii:S0300-9084(13)00323-4.

Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. Int J Biochem Cell Biol. 2005; 37(2): 289-305.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003; 552(Pt 2): 335-344.

Tzourio C, Dufouil C, Ducimetière P, Alpérovitch A. Cognitive decline in individuals with high blood pressure: a longitudinal study in the elderly. EVA Study Group. Epidemiology of Vascular Aging. Neurology. 1999, 10 ;53(9): 1948-1952.

Uauy R, Hoffman DR, Mena P, Llanos A, Birch EE. Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. J Pediatr. 2003; 143(4 Suppl): S17-25.

Valero J, España J, Parra-Damas A, Martín E, Rodríguez-Álvarez J, Saura CA. Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APP(Sw,Ind) transgenic mice. PLoS One. 2011; 6(2): e16832.

Van Wezel-Meijler G, van der Knaap MS, Huisman J, Jonkman EJ, Valk J, Lafeber HN. Dietary supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants: effects on cerebral maturation. Acta Paediatr 2002; 91(9): 942-950.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010; 11(10):700-714.

Vaya J, Schipper HM. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. J Neurochem. 2007; 102(6): 1727-1737.

Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. Mol Aspects Med. 2009; 30(3): 153-170.

Vejux A, Malvitte L, Lizard G. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. Braz J Med Biol Res. 2008; 41(7): 545-556.

Vejux A, Samadi M, Lizard G. Contribution of cholesterol and oxysterols in the physiopathology of cataract: implication for the development of pharmacological treatments. J Ophthalmol. 2011; 2011:471947.

Vercelletto M, Lacomblez L, Renou P. Measurement instruments and assessment scales for frontotemporal dementia. Rev Neurol (Paris). 2006; 162(2): 244-252.

Verri M, Pastoris O, Dossena M, Aquilani R, Guerriero F, Cuzzoni G, Venturini L, Ricevuti G, Bongiorno AI. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimers disease. Int J Immunopathol Pharmacol. 2012; 25(2): 345-353.

Veszelka S, Tóth AE, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger E, Vastag M, Orsolits B, Környei Z, Penke B, Deli MA. Docosahexaenoic acid reduces amyloid-β induced toxicity in cells of the neurovascular unit. J Alzheimers Dis. 2013; 36(3): 487-501.

Viña J, Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. J Alzheimers Dis. 2010; 20 Suppl 2: S527-533

Von Bernhardi R, Eugenín J. Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. Antioxid Redox Signal. 2012; 16(9): 974-1031.

Wagner M, Teichner G, Bachman DL. Diagnostic challenges of using CSF assay of tau and beta-amyloid(42) in atypical degenerative dementias of the Alzheimer type. Arch Clin Neuropsychol. 2003; 18(8): 893-903.

Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. Annu Rev Biochem 2006; 75: 295-332.

Watanabe T, Medina JF, Haeggstrom JZ, Radmark O, Samulesson B: Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. Eur J Biochem 1993, 212: 605–612.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975; 72(5): 1858-1862.

Whalley LJ, Fox HC, Wahle KW, Starr JM, Deary IJ. Cognitive aging, childhood intelligence, and the use of food supplements: possible involvement of n-3 fatty acids. Am J Clin Nutr. 2004; 80(6): 1650-1657.

Whitcomb RW, Linehan WM, Knazek RA. Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. J Clin Invest. 1988; 81(1): 185-188.

Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. Neurology. 2005; 64(2):277–281.

Wiemer EA, Wenzel T, Deerinck TJ, Ellisman MH, Subramani S. Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. J Cell Biol. 1997; 136(1): 71-80.

Wilson R, Sargent JR. Lipid and fatty acid composition of brain tissue from adrenoleukodystrophy patients. J Neurochem. 1993; 61(1): 290-297.

Wolozin B. Cholesterol, statins and dementia. Curr Opin Lipidol. 2004; 15(6): 667-672.

Woodruff-Pak, DS. Animal Models of Alzheimer’s Disease: Therapeutic Implications, 15, 2008; 507–521.

Wu JH, Lemaitre RN, Imamura F, King IB, Song X, Spiegelman D, Siscovick DS, Mozaffarian D. Fatty acids in the de novo lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease: the Cardiovascular Health Study. Am J Clin Nutr 2011; 94: 431–438.

Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. Crit Rev Oncol Hematol. 2012; 82(3): 249-258.

Xiao,Y., Li,X.,. Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation. Brain Res 846, 1999; 112-121

Yaffe K, Barrett-Connor E, Lin F, Grady D. Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women. Arch Neurol. 2002; 59(3): 378-384.

Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y. Diffuse plaques associated with astroglial amyloid beta protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. Acta Neuropathol. 1998; 95(3): 217-222.

Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(34): 14670-14675.

Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Human neurons generate C- reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. Brain Res. 2000; 887(1): 80-89.

Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, and Mostofsky DI. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neu- ronal membrane. Neurobiol Aging 2002; 23: 843–853,

Ying W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. Antioxid Redox Signal. 2008; 10(2): 179-206.

Yip CM, Elton EA, Darabie AA, Morrison MR, McLaurin J. Cholesterol, a modulator of membrane-associated Abeta-fibrillogenesis and neurotoxicity. J Mol Biol. 2001; 311(4): 723-734

Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Am J Obstet Gynecol. 1979; 135(3): 372-376.

Young C, Gean PW, Chiou LC, Shen YZ. Docosahexaenoic acid inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus. Synapse. 2000; 37(2): 90-94.

Young G, Conquer J. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. Reprod Nutr Dev. 2005; 45: 1-28.

Zahm JM, Baconnais S, Monier S, Bonnet N, Bessède G, Gambert P, Puchelle E, Lizard G. Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. Cytometry A. 2003; 52(2): 57-69.

Zambon D, Quintana M, Mata P, et al. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. Am J Med. 2010; 123(3): 267–274

Zheng ZJ, Folsom AR, Ma J, Arnett DK, McGovern PG, Eckfeldt JH. Plasma fatty acid composition and 6-year incidence of hypertension in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Am J Epidemiol 1999; 150: 492–500.

Zhou FQ, Cohan CS. How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets. J Neurobiol 2004; 58(1): 84-91.

Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapyof Alzheimer disease. Cell Adh Migr. 2011; 5(4): 280-292.

Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. Biochim Biophys Acta. 2001; 1551(2): F1-37.

Zuliani G, Donnorso MP, Bosi C, Passaro A, Dalla Nora E, Zurlo A, Bonetti F, Mozzi AF, Cortese C. Plasma 24S-hydroxycholesterol levels in elderly subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia: a case-control study. BMC Neurol. 2011; 11: 121.

ANNEXES

Hindawi Publishing Corporation
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2012, Article ID 623257, 15 pages
doi:10.1155/2012/623257

Research Article

Induction of Mitochondrial Changes Associated with Oxidative Stress on Very Long Chain Fatty Acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-Treated Human Neuronal Cells (SK-NB-E)

Amira Zarrouk,[1,2] Anne Vejux,[1] Thomas Nury,[1] Hammam I. El Hajj,[1] Madouda Haddad,[1] Mustapha Cherkaoui-Malki,[1] Jean-Marc Riedinger,[3] Mohamed Hammami,[2] and Gérard Lizard[1]

[1] *Equipe "Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique" (EA 7270), Faculté des Sciences, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France*
[2] *Faculté de Médecine/Université de Monastir, Laboratoire de Biochimie-UR "Nutrition Humaine et Désordres Métaboliques", Université de Monastir, Avenue Avicenne, 5019 Monastir, Tunisia*
[3] *Centre de Lutte Contre le Cancer GF Leclerc, Laboratoire de Biologie Médicale, 21000 Dijon, France*

Correspondence should be addressed to Gérard Lizard, gerard.lizard@u-bourgogne.fr

Received 23 April 2012; Accepted 5 June 2012

Academic Editor: Christopher Horst Lillig

Copyright © 2012 Amira Zarrouk et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In Alzheimer's disease, lipid alterations point towards peroxisomal dysfunctions. Indeed, a cortical accumulation of saturated very long chain fatty acids (VLCFAs: C22:0, C24:0, C26:0), substrates for peroxisomal β-oxidation, has been found in Alzheimer patients. This study was realized to investigate the effects of VLCFAs at the mitochondrial level since mitochondrial dysfunctions play crucial roles in neurodegeneration. On human neuronal SK-NB-E cells treated with C22:0, C24:0, or C26:0 (0.1–20 μM; 48 h), an inhibition of cell growth and mitochondrial dysfunctions were observed by cell counting with trypan blue, MTT assay, and measurement of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) with $DiOC_6(3)$. A stimulation of oxidative stress was observed with DHE and MitoSOX used to quantify superoxide anion production on whole cells and at the mitochondrial level, respectively. With C24:0 and C26:0, by Western blotting, lower levels of mitochondrial complexes III and IV were detected. After staining with MitoTracker and by transmission electron microscopy used to study mitochondrial topography, mass and morphology, major changes were detected in VLCFAs treated-cells: modification of the cytoplasmic distribution of mitochondria, presence of large mitochondria, enhancement of the mitochondrial mass. Thus, VLCFAs can be potential risk factors contributing to neurodegeneration by inducing neuronal damages via mitochondrial dysfunctions.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD; OMIM #104300) is a neurodegenerative disorder. This is a clinicopathological entity regarded as progressive dementia, which includes episodic memory impairment and the involvement of other cognitive domains or skills that are associated with the reduction of daily activities and behavioral changes [1, 2]. AD is characterized by the presence of two aberrant structures in patients' brains: senile plaques and neurofibrillary tangles [3]. Senile plaques are composed of β-amyloid peptides, particular fragments of the amyloid peptide precursor protein (APP) [4], whereas the main component of neurofibrillary tangles is the cytoskeleton protein interacting with the microtubules known as the tau protein, in its hyperphosphorylated form [5, 6]. Currently, only very few treatments, which minimally impact the disease, are available [1]. Therefore, for a better understanding of the physiopathology of AD, there is a real need to identify the molecules capable of favoring the development of this disease, to determine their biological activities and the associated metabolic pathways in order to discover new therapeutic targets. Some investigations support a linkage between lipid metabolism and AD [7–9]. The most widely studied risk factors are the three common variants of the human apolipoprotein E (apoE) protein, known as E2, E3, and E4. The gene variants underlying

these protein isoforms, known as $\varepsilon 2$, $\varepsilon 3$, and $\varepsilon 4$ are allelic forms of the APOE gene, resulting from different haplotypes at the APOE locus (19q13.31) [10]. As many carriers of the APOE risk allele ($\varepsilon 4$) live into their 90 s, the existence of other late-onset AD genetic and/or environmental risk factors have yet to be identified [11]. Some evidence has accumulated that cholesterol oxide derivatives, also called oxysterols, which are 27 carbon derivatives of cholesterol containing additional oxygen atoms on the steroid's nucleus or on the side chain, can be used as markers of brain atrophy in patients with various neurodegenerative diseases [12, 13]. The accumulation of oxysterols in the body may be due to dietary consumption (dried egg products, powdered milk, cheeses, and dried animal products); they can also be formed enzymatically, mostly by cytochromes P450 (CYPs) [14], and also nonenzymatically by reaction with oxygen [15]. Oxysterols have various biological activities (induction of cell death, activation of inflammation, and/or oxidative processes) and are therefore assumed to play major roles in various pathologies including AD [13, 16]. Potential roles of 7-ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol have been suggested [17, 18], and it was found that reduction of the plasmatic level of 24S-hydroxycholesterol correlated with the severity of dementia or the degree of brain atrophy [19]. 24S-hydroxycholesterol formed by a specific cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1), a cytochrome P450 enzyme expressed in neurons, is considered as a marker of metabolically active neurons [20], and under in vitro conditions, it is an efficient inhibitor of β-amyloid peptide formation, a major component of senile plaques [21, 22]. Therefore, conversion of cholesterol into 24S-hydroxycholesterol in the brain is of critical importance for central cholesterol homeostasis and 24S-hydroxycholesterol could play important roles in the development of AD [23, 24]. Moreover, regarding the decline of peroxisomal function with age [25, 26], peroxisomal dysfunctions associated with aging might favor neurodegenerative diseases, including AD [27, 28]. In agreement with this hypothesis, some lipid alterations observed in AD, concerning docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3), very long chain fatty acids (VLCFAs: C22:0, C24:0 and C26:0), and plasmalogens also point towards peroxisomal dysfunctions given that the β-oxidation or the synthesis of these lipids occurs, at least in part, in the peroxisome [29, 30]. Recently, lipid analyses of cortical regions from patients with AD revealed accumulation of VLCFAs (C22:0, C24:0, and C26:0), three substrates for peroxisomal β-oxidation, in patients with stages V and VI pathology compared with those modestly affected (stages I and II) based on the neuropathological Braak staging for AD [31]. Conversely, the level of plasmalogens, which need intact peroxisomes for their biosynthesis, was decreased in severely affected tissues, in agreement with a peroxisomal dysfunction. In addition, the peroxisomal volume density was increased in some neurons in the gyrus frontalis at advanced AD stages [31]. Based on these later observations, it is tempting to speculate that the accumulation of C22:0, C24:0, and C26:0 in the cortex of patients with AD could contribute to neuron dysfunctions. Indeed, these fatty acids are known to induce various types of cellular damages, in vitro and in vivo, especially at the mitochondrial and lysosomal level, and to trigger oxidative stress and cell death in the cells of the central nervous system [32–35].

In order to evaluate the ability of C22:0, C24:0, and C26:0 to induce neuronal damages, human neuronal cells (SK-NB-E) were cultured in the absence or in the presence of these fatty acids at various concentrations (0.1, 1, 5, 10, and/or 20 μM) for 48 h. We focused on the effects of these fatty acids at the mitochondrial level since mitochondria are assumed to play important roles in the development of AD [36–38], and we observed that C22:0, C24:0, and C26:0 were able to induce morphological and functional modifications of this organelle.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Cell Treatments. Human neuronal cells (SK-NB-E) were seeded at 200,000 cells per well in 12-well microplates containing 1 mL of culture medium constituted by Dulbecco's Modified Eagle Medium with L-gutamine (DMEM) (Lonza) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech) and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) (Pan Biotech). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and passaged twice a week. At each passage, SK-NB-E cells were trypsinized with a (0.05% trypsin-0.02% EDTA) solution (Pan Biotech).

Docosanoic acid (C22:0), tetracosanoic acid (C24:0), and hexacosanoic acid (C26:0) (Sigma-Aldrich) were solubilized in α-cyclodextrin (Sigma-Aldrich) as previously described [39]. The final maximum concentration of α-cyclodextrin (vehicle) in the culture medium was 1 mg/mL [33].

The conditions of treatment with very long chain fatty acids (VLCFAs) (C22:0, C24:0, or C26:0) were the following: after plating SK-NB-E cells for 24 h, the cells were further treated for 48 h with various VLCFA concentrations (0.1, 1, 5, 10, and/or 20 μM) in HAM's F-10 medium (Pan Biotech). The concentrations of VLCFAs were chosen according to measurements made in similar experimental conditions on the plasma of healthy subjects (C22:0, C24:0, or C26:0: less than 1 μM), of patients with X-ALD (C22:0, C24:0, or C26:0: from 1 to 5 μM) (used as positive controls) [34, 40], and of patients with AD. Our preliminary data concern 15 Alzheimer patients from the department of Neurology (University Hospital, Monastir, Tunisia): C22:0 (mean, 4.2 μM; range, 0.8–8.4 μM) and C24:0 (mean, 4.9 μM; range, 0.8–10.6 μM).

2.2. Colorimetric MTT Assay. The MTT assay was carried out as previously described [41] on SK-NB-E cells plated in 12-well flat-bottom culture plates after 48 h of treatment with C22:0, C24:0, or C26:0 (0.1, 1, 5, 10, and 20 μM). The MTT assay was used to evaluate the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on cell proliferation and/or viability. MTT salt is reduced to formazan in the metabolic active cells by dehydrogenase to form NADH and NADPH [42]. The plates were read at 570 nm with a microplate reader.

2.3. Cell Counting with Trypan Blue. After trypsinization, cells were centrifuged and resuspended in culture medium. The total number of viable cells was determined in the presence of trypan blue, which stains dead cells blue, after 48 h of treatment with C22:0, C24:0, and C26:0 (0.1, 1, 5, 10, and 20 μM) under an inverted-phase contrast microscope Diaphot (Nikon).

2.4. Study of Cell Morphology Using Phase Contrast Microscopy. Cell morphology of SK-NB-E cells was observed after 48 h of culture in the absence or the presence of fatty acids (C22:0, C24:0, and C26:0: 0.1, 1, 5, 10, and 20 μM) under an inverted-phase contrast microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Digitalized images were obtained with a camera (Axiocam ICm1, Zeiss).

2.5. Flow Cytometric Measurement of Transmembrane Mitochondrial Potential with $DiOC_6(3)$. Variations of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured with 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$ (Invitrogen), which allows the percentage of cells with low $\Delta\Psi_m$ to be determined.With $DiOC_6(3)$, mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in green fluorescence collected through a 520/10-nm band pass filter. $DiOC_6(3)$ was used at a 40 nM [43]. Flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec). Ten thousand cells were acquired for each sample. Data were analyzed with Flomax software (Partec) or FlowJo software (Tree Star Inc.).

2.6. Flow Cytometric Measurement of the Whole Intracellular Production of Superoxide Anion with Dihydroethidium. The whole intracellular production of superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) was detected with dihydroethidium (DHE; Invitrogen/Life Technologies), which is a nonfluorescent compound that can diffuse through cell membranes, rapidly oxidized in hydroethidine (HE) under the action of $O_2^{\bullet -}$ [44]. DHE was initially prepared at 10 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO) and used at a 2 μM final concentration on cell samples of 1×10^6 cells/mL of HAM'S F10 medium. Cells were incubated for 15 min at 37°C before flow cytometric analysis. The fluorescent signals were collected through a 580 ± 20 nm band pass filter on a logarithmic scale of four decades of log on a GALAXY flow cytometer (Partec). For each sample, 10,000 cells were acquired. Data were analyzed with Flomax software (Partec).

2.7. Flow Cytometric Measurement of Mitochondrial Superoxide Anions with MitoSOX. The mitochondrial production of superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) was detected with MitoSOX (Invitrogen/Life Technologies). MitoSOX Red reagent is a live-cell permeant and is rapidly and selectively targeted to the mitochondria [45]. Once in the mitochondria, MitoSOX Red reagent is oxidized by superoxide and exhibits orange/red fluorescence (λEx = 510 nm; λEm = 580 nm). The oxidation product becomes highly fluorescent upon binding to nucleic acids. MitoSOX was initially prepared at 5 mM in PBS and used at 5 μM on cell samples of 1×10^6 cells/mL of PBS. Cells were incubated for 15 min at 37°C before flow cytometry analysis. The fluorescent signals were collected through a 580 ± 20-nm band pass filter on a Galaxy flow cytometer (Partec). For each sample, 10,000 cells were acquired. Data were analyzed with Flomax software (Partec).

2.8. Labeling of Mitochondria with MitoTracker for the Microscopical Evaluation of Mitochondrial Distribution and Flow Cytometric Evaluation of Mitochondrial Mass. The mitochondrial mass and the cellular distribution of mitochondria were evaluated after staining with MitoTracker Red (Invitrogen) [45].

To evaluate mitochondrial distribution, SK-NB-E cells were cultured on glass coverslips, and after 48 h of culture in the absence or in the presence of fatty acids, they were stained with MitoTracker Red at 1 μM (15 min, 37°C). After labeling, the coverslips were washed in PBS, mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako), and stored in the dark at 4°C until observation under blue light. Observations were made under an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss) using green excitation, and digitalized images were obtained with an Axiocam Zeiss camera.

To determine the mitochondrial mass, SK-NB-E cells were cultured in 12-well microplates, and after 48 h of culture in the absence or in the presence of fatty acids, they were stained with MitoTracker Red (1 μM, 15 min, 37°C). After trypsinization, the cells were washed and resuspended in PBS and immediately analyzed using flow cytometry. The fluorescent signals were collected through a 580 ± 20 nm band pass filter on a Galaxy flow cytometer (Partec). For each sample, 10,000 cells were acquired and the data were analyzed with Flomax software (Partec).

2.9. Western Blot Analysis of Mitochondrial Proteins. SK-NB-E cells were treated with C26:0, C24:0, and C22:0 at 5 and 10 μM for 24 and 48 h. After treatment, cells were trypsinized and incubated with Ripa lysis buffer (0.1% (w/v) SDS, 1% (w/v) NP40, 0.5% (w/v) Na-desoxycholate, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 50 mM TrisHCl pH 8) containing a mixture of protease and phosphatase inhibitors (NaF 50 mM, Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)). After 30 min incubation at 4°C in the lysis buffer, the cell debris were eliminated by centrifugation (20 min, 10,000 g), and the supernatant was collected. The protein concentrations were measured using bicinchoninic acid reagent (Sigma) [46]. Fifty micrograms of protein per slot were diluted in loading buffer (125 mmol/L Tris/HCl, pH 6.8, 10% (w/v) mercaptoethanol, 4.6% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, and 0.003% (w/v) Bromophenol blue), separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking nonspecific binding sites overnight by 5% nonfat milk in TPBS (PBS, 0.1% Tween20), the membranes were incubated for 1 h at room temperature with the anti-OXPHOS mixture (MS601, Abcam/Mitosciences) against structural components of all five oxidative phosphorylation complexes (Complex I subunit NDUFB8 (20 kDa), Complex II subunit (30 kDa), Complex III subunit Core 2 (47 kDa), Complex IV subunit II (24 kDa), and Complex V ATP synthase subunit alpha (53 kDa)) at a 1 : 500 dilution (TPBS with 1% nonfat milk). After three 10-min washes with TPBS,

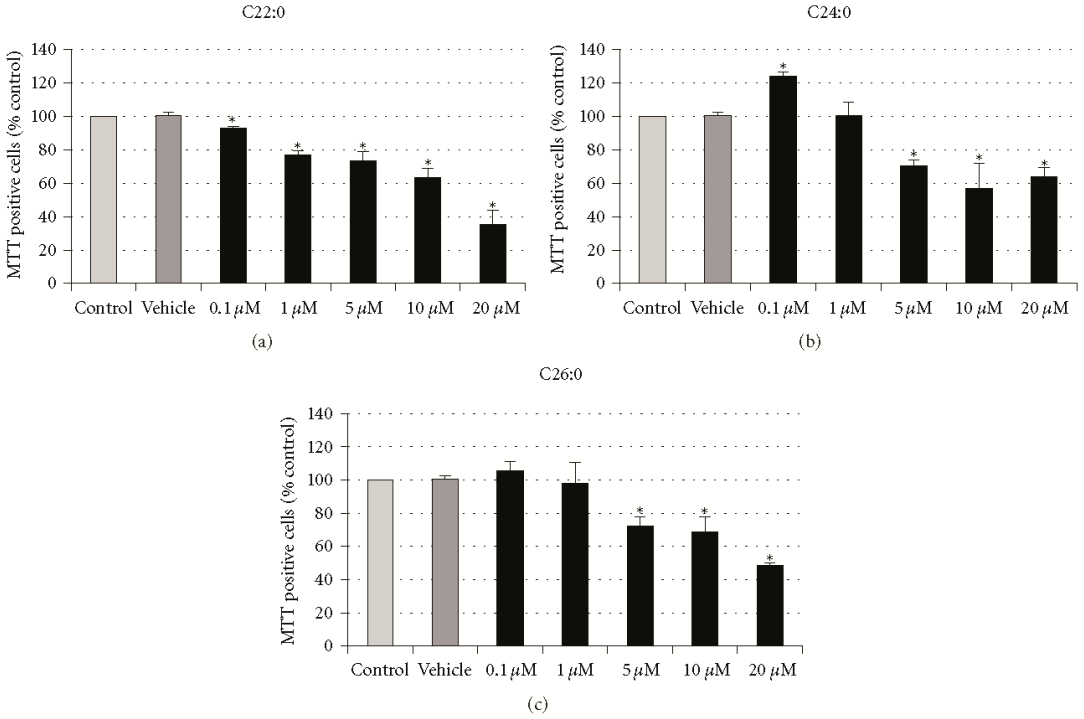


FIGURE 1: Evaluation of the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on cell proliferation and mitochondrial metabolism with the MTT assay. SK-NB-E cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle), or a VLCFA (C22:0, C24:0, or C26:0) used at 0.1–20 μM. Data shown are mean ± SD from two independent experiments conducted in triplicates. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by *(Mann Whitney test; $^*P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) at a 1 : 5000 dilution (TPBS with 5% nonfat milk) for 1 h at room temperature and washed three times in TPBS for 10 min. Autoradiography of the immunoblots was performed using an enhanced chemoluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology) and they were quantified with Image J Software. The results were expressed as a fold change to untreated SK-NB-E cells. Actin was used as a loading control. The monoclonal antibodies in the cocktail were chosen because they are against subunits that are labile when the corresponding complex is not assembled. Moreover, the combination is readily resolved in SDS-PAGE when the appropriate gel conditions are used.

2.10. Transmission Electron Microscopy. Transmission electron microscopy is a valuable tool to evaluate the morphological changes occurring under the action of various physical or chemical agents [47]. It was used to visualize the potential ultrastructural modifications induced especially at the mitochondrial level by fatty acids (C22:0, C24:0, and C26:0 used at 10 μM; 24 h) and α-cyclodextrin (1 mg/mL for 24 h, used as vehicle to dissolve fatty acids) on SK-NB-E cells, and was conducted as previously described [48].

2.11. Statistical Analysis. Statistical analyses were performed using WinSTAT software (Microsoft). The Mann-Whitney *U* test was used to compare the different groups, and data were considered to be statistically different at a *P* value of 0.05 or less.

3. Results

3.1. Evaluation of the Effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on SK-NB-E Cells with the MTT Assay. When SK-NB-E cells were incubated for 48 h with C22:0, C24:0, and C26:0 (0.1–20 μM) a dose-dependent decrease of MTT reduction was observed. The absorbance began to decrease significantly with 0.1 μM of C22:0, and with 5 μM of C24:0 and C26:0, and similar absorbencies were obtained in control and α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells (Figure 1). As MTT is cleaved into a blue color product (formazan) by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase, this assay gives information on cell proliferation and mitochondrial metabolism. In order to determine whether the decrease in formazan production under treatment with C22:0, C24:0, and C26:0 is simply a function of the reduction of the number of viable cells, and/or an induction of mitochondrial dysfunctions, the effects of these VLCFAs on the number of viable cells and

the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured [49].

3.2. Effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on SK-NB-E Cells in Terms of Cell Growth and Cell Morphology. Incubation of SK-NB-E cells with C22:0, C24:0, and C26:0 (0.1–20 μM) resulted in a marked and dose-dependent reduction in the total number of viable cells after 48 h. The decrease in the total number of viable cells determined in the presence of trypan blue became statistically significant with 0.1 μM of C22:0 and 5 μM of C24:0 and C26:0; a similar number of cells were obtained in untreated cells (control) and α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells (Figure 2(a)). With the different fatty acids used, compared to control cells and vehicle-treated cells, the decreased number of viable cells was associated with an increase in the presence of some round cells (recalling less adherent dying cells [50]) in the culture dishes, especially under treatment with C22:0 at 20 μM (Figure 2(b)). The shape index based on the observations performed by phase contrast microscopy (Figure 2(b)) was calculated according to the following formula (number of round cells/total number of cells/mm^2). This index shows a dose-dependent increase of round cells under treatment with the different VLCFAs used, especially with C22:0 (20 μM) (Figure 3).

3.3. Effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on SK-NB-E Cells in Terms of Mitochondrial Transmembrane Potential. Incubation of SK-NB-E cells with C22:0, C24:0, and C26:0 (0.1–20 μM) for 48 h resulted in a marked and dose-dependent increase in the percentage of cells with depolarized mitochondria measured by flow cytometry after staining with $DiOC_6(3)$. The increase in cells with depolarized mitochondria became statistically significant with 1 μM of C22:0 and C24:0, and with 0.1 μM of C26:0. Similar percentages of cells with depolarized mitochondria were obtained between control and α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells (Figure 4).

3.4. Effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on Superoxide Anion Production in Whole Cells and at the Mitochondrial Level. The effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on oxidative stress, mainly on superoxide anion production, were investigated at concentrations inducing modifications on cell growth and on mitochondrial transmembrane potential. To this end, SK-NB-E cells were incubated with C22:0, C24:0, and C26:0 (5–20 μM) for 48 h and the production on superoxide anions on whole cells and at the mitochondrial level was determined after staining with DHE and MitoSOX, respectively. After staining with DHE, whatever the fatty acid considered, a marked increase of cells overproducing superoxide anions (HE-positive cells) was observed at 10 and 20 μM (Figure 5(a)). With MitoSOX, whatever the fatty acid considered, our data show an increase of superoxide anion production at the mitochondrial level at 10 and 20 μM with C22:0 and C24:0, and at 20 μM with C26:0 (Figure 5(b)). As the increase of MitoSOX positive cells was lower than those of HE-positive cells, these data suggest that the mitochondria contribute in part to the increase of superoxide anion production on whole cells.

3.5. Effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on the Expression of Mitochondrial Complex Subunits. The effect of C22:0, C24:0, and C26:0 (5 and 10 μM; 48 h) was studied on SK-NB-E cells in terms of the expression of proteins belonging to the different mitochondrial Complexes (Complex I subunit NDUFB8 (20 kDa), Complex II subunit (30 kDa), Complex III subunit Core 2 (47 kDa), Complex IV subunit II (24 kDa), and Complex V ATP synthase subunit alpha (53 kDa)) using Western blotting (Figure 6(a)) associated with a quantitative densitometry analysis (Figure 6(b)). In these conditions, when compared to untreated cells (control), similar values of the different complexes were observed in α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells, and under treatment with C22:0. However, some changes were observed especially under treatment with C24:0 and C26:0, mainly on Complexes III and IV, which are proton pumps contributing to the proton gradient by an asymmetric absorption/release of protons. Thus, C24:0 (5 μM) reduced the level of Complex III subunit core 2, whereas C24:0 (10 μM) increased it, and the opposite was shown for C26:0. However, both C24:0 and C26:0 (5 and 10 μM) reduced the level of Complex IV subunit II (Figure 5(b)).

3.6. Effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on Mitochondrial Topography, Mitochondrial Mass, and Ultrastructural Mitochondrial Characteristics. The effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on mitochondrial topography, mitochondrial mass, and ultrastructural mitochondrial characteristics were investigated at concentrations inducing mitochondrial transmembrane potential modifications and an overproduction of superoxide anions at the mitochondrial level. To this end, SK-NB-E cells were incubated with C22:0, C24:0, and C26:0 (5, 10 and 20 μM) for 48 h and the cells were stained with MitoTracker Red. Whereas a few fluorescent dots were most often observed in untreated cells (control) and in α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells, showing a regular cytoplasmic distribution of mitochondria, a diffuse staining pattern was frequently detected in fatty acid-treated cells, suggesting either modifications of the mitochondrial distribution and/or of the mitochondrial membrane characteristics (Figure 7(a)). It is noteworthy that these mitochondrial changes revealed by fluorescence microscopic observations were associated with an enhancement of the mitochondrial mass measured by flow cytometry (Figure 7(b)). In agreement with the data obtained with MitoTracker Red, the observations made using transmission electron microscopy also showed substantial mitochondrial changes. Whereas the distribution (Figures 8(a) and 8(b) and the aspects (size and shape) (Figures 8(f) and 8(g)) of mitochondria were similar in control and α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells, major changes were found in fatty acid-treated cells. Thus, in C22:0-, C24:0-, and C26:0-treated cells, clusters of mitochondria were often detected in various areas of the cytoplasm (Figures 8(c), 8(d) and 8(e)), suggesting mitochondrial biogenesis. Moreover, some of these mitochondria have different sizes and shapes than in the control and α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells: indeed, some elongated (Figure 8(h), 8(i)) and round (Figure 8(j)) mitochondria were very often observed in VLCFA-treated cells.

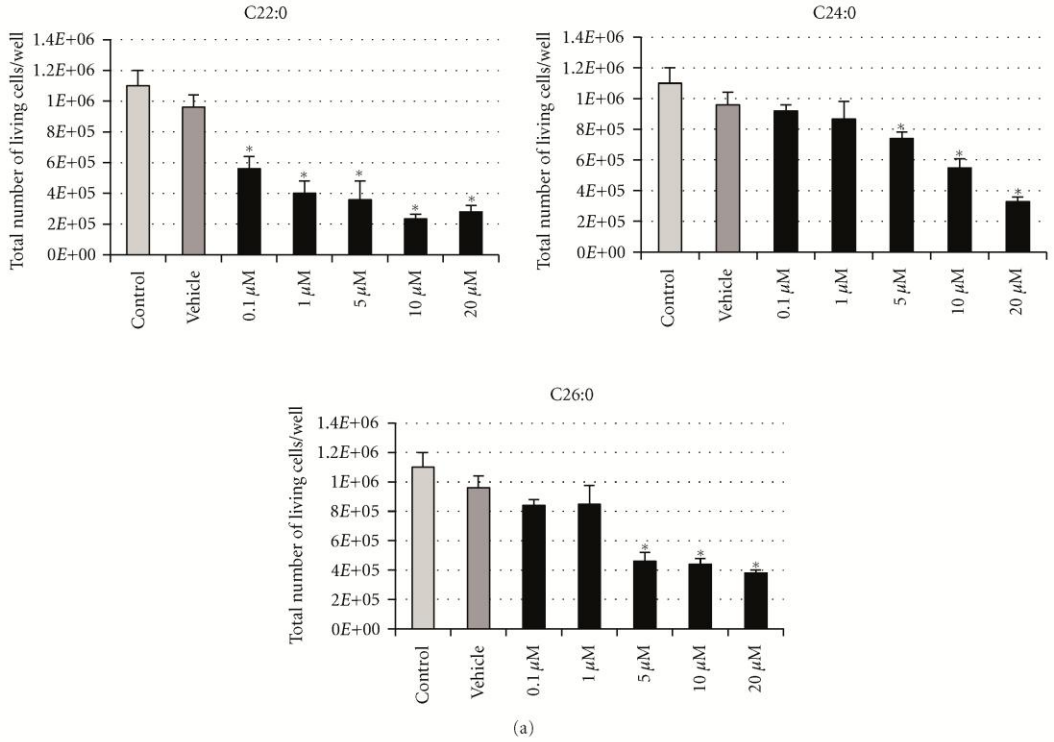


Figure 2: Evaluation of the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on SK-NB-E cells in terms of cell growth and cell morphology. SK-NB-E cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle), or a VLCFA (C22:0, C24:0, or C26:0) used at 0.1–20 μM. (a) Number of viable cells per well of 12 well plates determined in the presence of trypan blue; (b) observation with phase contrast microscopy. The arrows point towards aggregates of round cells. Data shown are mean ± SD from at least three independent experiments conducted in duplicates. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by * (Mann-Whitney test; $^*P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

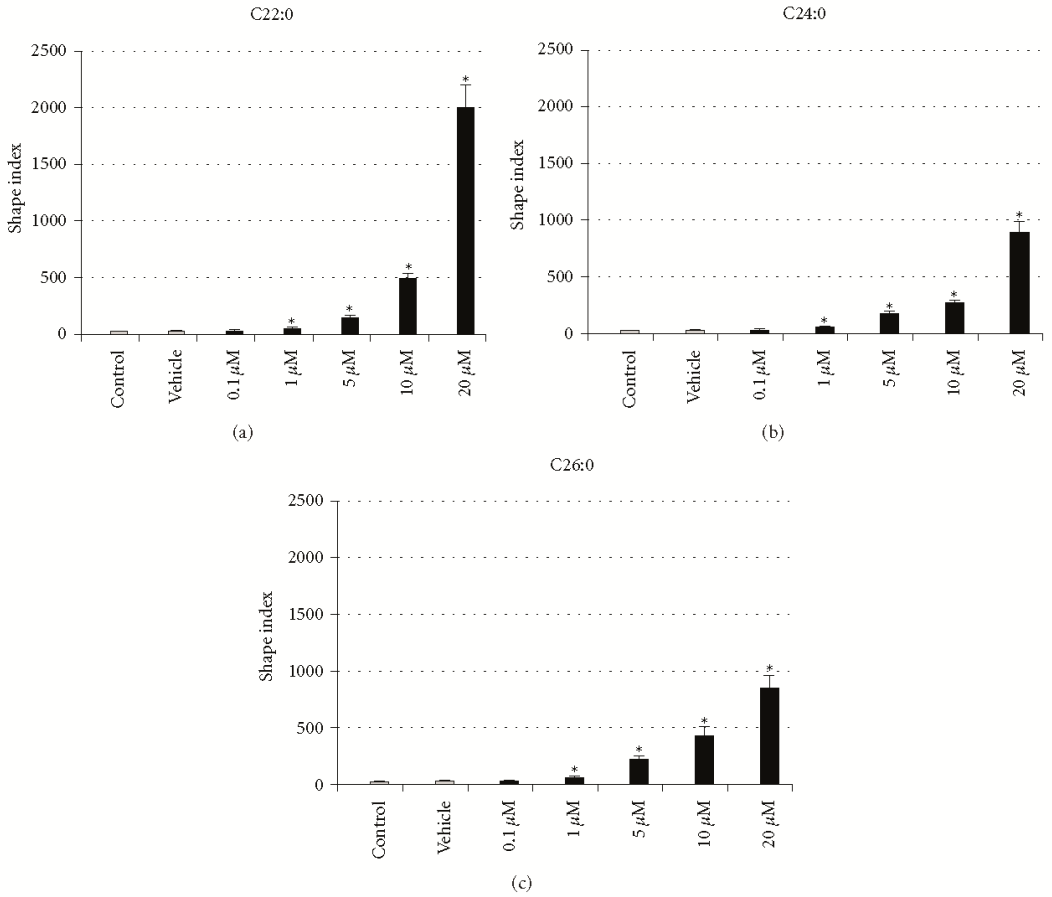


Figure 3: Quantification of morphological changes induced by C22:0, C24:0, and C26:0 on SK-NB-E cells. SK-NB-E cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle), or a VLCFA (C22:0, C24:0, or C26:0) used at 0.1–20 μM. The induction of morphological changes associated with the presence of round cells observed under treatment with VLCFA was quantified according to the shape index (number of round cells/total number of cells/mm^2). Data shown are mean ± SD from three independent experiments. Significance of the difference between vehicle- and fatty-acid-treated cells is indicated by * (Mann-Whitney test; $^*P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

4. Discussion

Brain aging leading to cognitive decline, including AD, is an incompletely understood process that different hypotheses attempt to explain. Currently, the agents contributing to brain aging-associated dysfunctions are not well known; nor are the possible underlying mechanisms involved in cognitive decline [38]. The increased accumulation of VLCFAs (C22:0, C24:0, and C26:0) found in cortical regions from patients with AD [31], the important roles played by various lipids, including different types of fatty acids, in the physiopathology of AD [7], and the mitochondrial changes occurring with advancing age [51, 52] led us to attempt to characterize the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 at the mitochondrial level on human neuronal cells (SK-NB-E). We observed that these different fatty acids induced important morphological and functional changes at the mitochondrial level.

Since mitochondria are unlikely to play a significant role in cellular MTT reduction, the MTT assay, which gives information on mitochondrial activity and cell growth, was used to evaluate the sensitivity of SK-NB-E cells to C22:0, C24:0, and C26:0. With the MTT assay, the lower ability of SK-NB-E cells to reduce MTT to formazan blue in the presence of these fatty acids revealed the cytotoxic effects of these compounds in concentrations 5 μM and higher, which was similar to those previously described on glial cells [34]. Compared to untreated and vehicle-treated cells, the higher MTT value observed under treatment with C24:0 (0.1 μM) suggests mitochondrial hyperactivity (previously reported with cytotoxic compounds [53]), which could take place to counteract early mitochondrial dysfunctions. We cannot exclude that a similar effect occurs with C22:0 and C26:0 used at 0.1 μM before or after 48 h of treatment. Moreover, in agreement with data obtained on glial cells

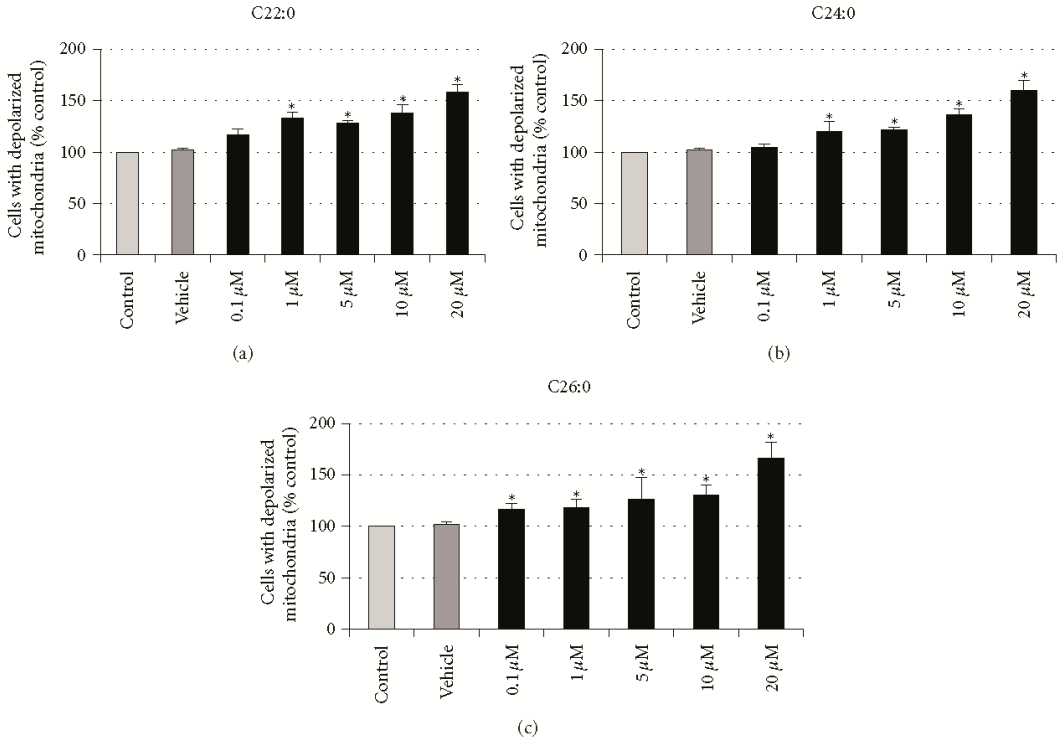


Figure 4: Flow cytometric evaluation of the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on mitochondrial transmembrane potential. SK-NB-E cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle), or a VLCFA (C22:0, C24:0, or C26:0) used at 0.1–20 μM. The mitochondrial transmembrane potential was determined after staining with $DiOC_6(3)$ in order to quantify the cells with depolarized mitochondria. Data shown are mean ± SD from three independent experiments conducted in duplicate. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by *(Mann-Whitney test; $^*P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

(oligodendrocytes, astrocytes), C22:0 and VLCFAs (C24:0, C26:0) also inhibit cell growth in a dose-dependent manner and favor cell detachment, as suggested by the presence of an increased number of clusters of round cells detected under treatment with these fatty acids [34]. The neurotoxic effects of C22:0, C24:0, and C26:0, via alterations of mitochondrial activity suggested by the MTT assay, were confirmed with the use of $DiOC_6(3)$, which is a reliable fluorescent probe used to measure the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) [54]. With this probe, the higher percentages of cells with depolarized mitochondria found under treatment with C22:0, C24:0, and C26:0 demonstrate that there is a significant impact of these fatty acids on mitochondrial activity, which can contribute to triggering cell death [34, 48]. This mitochondrial disturbance was also observed on rat C6 glioma cells, murine oligodendrocytes 158 N [34], normal fibroblasts, and fibroblasts of X-ALD patients [55] as well as oligodendrocytes and astrocytes of rat brain [33] treated with C24:0 or C26:0 used at 20 μM and higher, indicating that a decrease of $\Delta\Psi_m$ is common to neural cells and fibroblasts and provides evidence that mitochondrial-dependent cellular dysfunctions are triggered by elevated VLCFA concentrations. Therefore, when the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 were evaluated with the MTT assay by cell counting in the presence of trypan blue or after staining with $DiOC_6(3)$, since similar activities of these fatty acids were found on glial cells and neural cells, these different data suggest that these compounds may have dramatic consequences on various brain functions and that they can trigger neurodegeneration.

Currently, some investigations support that oxidative damage can favor brain senescence and neurodegeneration via mitochondrial dysfunctions [36, 37, 52] and that oxidative-stress-mediated energetic failure may be at the core of multifactorial neurodegenerative diseases [56]. There is also some evidence that accumulation of VLCFAs in different tissues and biological fluids simultaneously stimulates oxidative stress leading to lipid peroxidation and decreases the antioxidant defenses [57–60]. Moreover, VLCFAs are known to favor overproduction of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) on various types of cells, including neuronal cells [35, 55], and VLCFA-induced oxidative damage could further compromise energy metabolism [61]. It was therefore useful to specify the ability

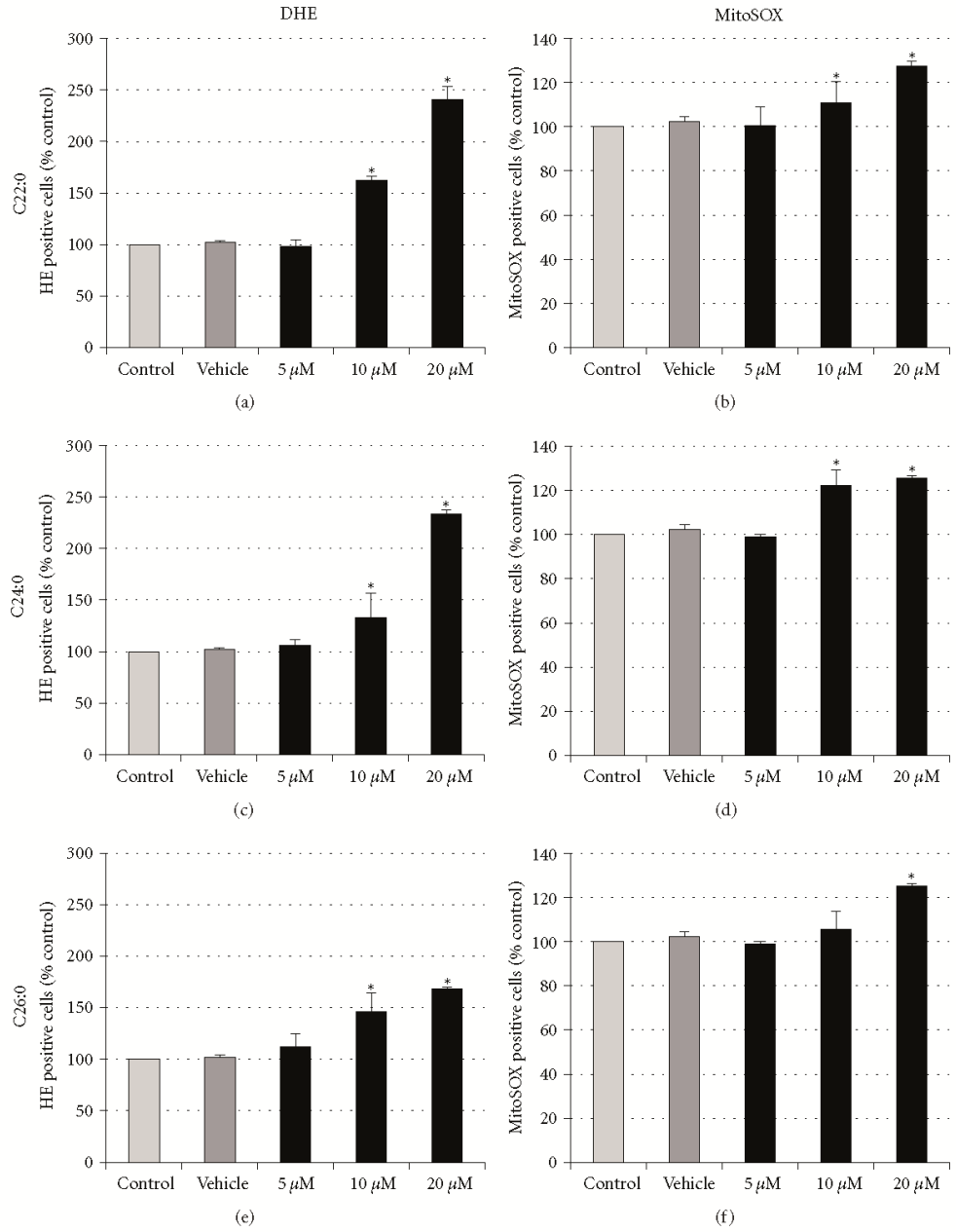


Figure 5: Flow cytometric evaluation of the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on superoxide anion production in whole cells and at the mitochondrial level. SK-NB-E cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle) or a VLCFA (C22:0, C24:0, or C26:0) used at 5, 10, and 20 μM. The production of superoxide anion on whole cells (HE-positive cells) (a) and at the mitochondrial level (MitoSOX-positive cells) (b) was determined after staining with DHE and MitoSOX, respectively. Data shown are mean ± SD from three independent experiments conducted in duplicates. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by *(Mann-Whitney test; $*P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

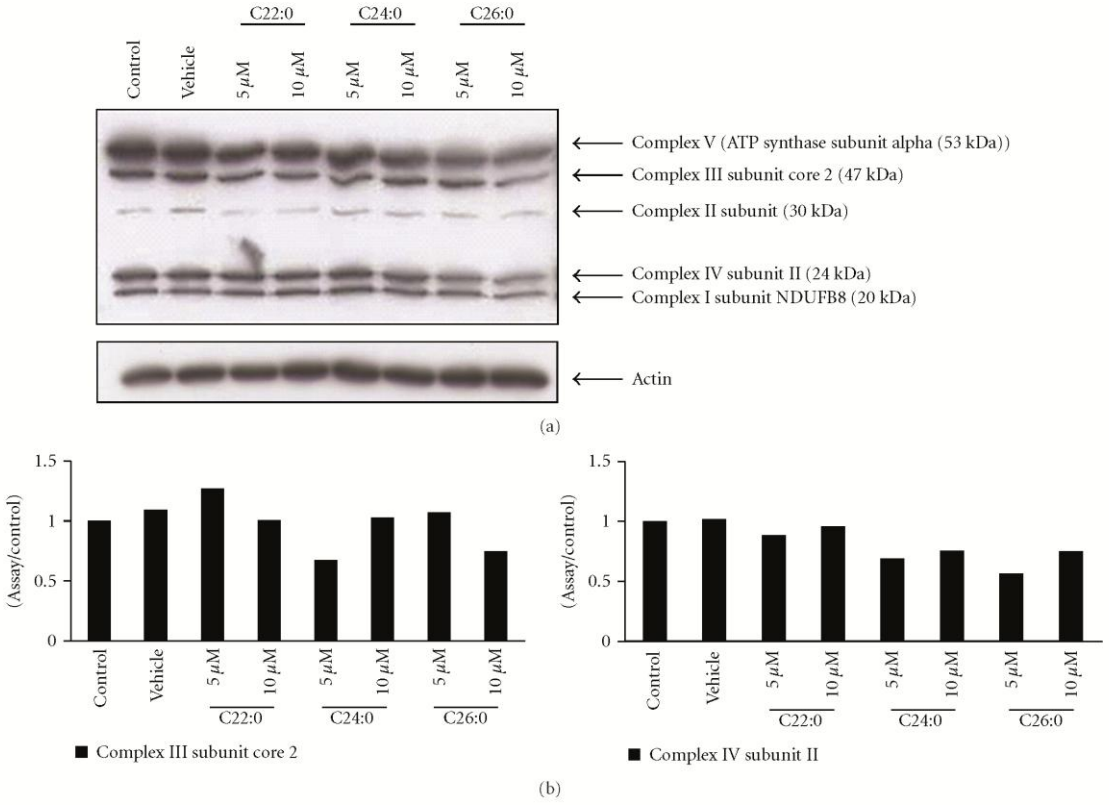


FIGURE 6: Analysis of the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on the expression of mitochondrial complex subunits. SK-NB-E cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle), or a VLCFA (C22:0, C24:0, or C26:0) used at 10 μM. The Complex I subunit NDUFB8 (20 kDa), Complex II subunit (30 kDa), Complex III subunit Core 2 (47 kDa), Complex IV subunit II (24 kDa), and Complex V ATP synthase subunit alpha (53 kDa) involved in oxidative phosphorylation obtained from whole cellular extracts were analyzed with specific antibodies (MitoProfile Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail, Abcam/Mitosciences) by Western blotting (a). Quantification was carried out with Image J Software; each complex was normalized versus actin, and for each complex data were expressed as [(normalized value of the assay)/(normalized value of the control)]. Similar values were obtained between control, vehicle, and C22:0-treated cells, and differences were observed especially under treatments with C24:0 and C26:0, mainly for Complex III subunit Core 2 and Complex IV subunit II (b). Data shown are representative of two independent experiments.

of C22:0, C24:0, and C26:0 to favor the overproduction of ROS on whole SK-NB-E cells and at the mitochondrial level. Data obtained on SK-NB-E cells confirm the potential prooxidative activity of VLCFAs and show similar effects with C22:0. Indeed, when ROS overproduction, especially superoxide anion production, was measured with DHE [44], higher percentages of cells overproducing superoxide anions were found under treatment with C22:0, C24:0, and C26:0 compared to untreated cells and α-cyclodextrin-treated cells. As it has been postulated that oxidative stress in mitochondria can reduce their activities and contribute to decreasing the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) [52, 61], the overproduction of superoxide anions at the mitochondrial level was investigated with the fluorescent probe MitoSOX [45]. In these conditions, our data show that mitochondrial dysfunctions were associated with an increase of superoxide anion production at the mitochondrial level. However, as the increase of MitoSOX-positive cells was lower than those of HE-positive cells, we can assume that C22:0, C24:0, and C26:0 have other targets than mitochondria to stimulate superoxide anion production. It is therefore tempting to speculate that extramitochondrial sources of ROS production, especially superoxide anion, could be activated by C22:0, C24:0, and C26:0 and could in turn contribute to inducing mitochondrial damage [62]. Indeed, the accumulation of VLCFAs in X-ALD lymphoblasts has been described to increase the level of NADPH oxidase $gp91^{PHOX}$ observed in total cell homogenate and membrane fractions of those cells [63, 64]. Therefore, C24:0 and C26:0 might favor the activation of NADPH oxidase activity, leading to an overproduction of ROS, which might further contribute to modifying mitochondrial activity and to triggering cell death [65]. Since it has been demonstrated that excess C26:0 generates ROS, which results in oxidation

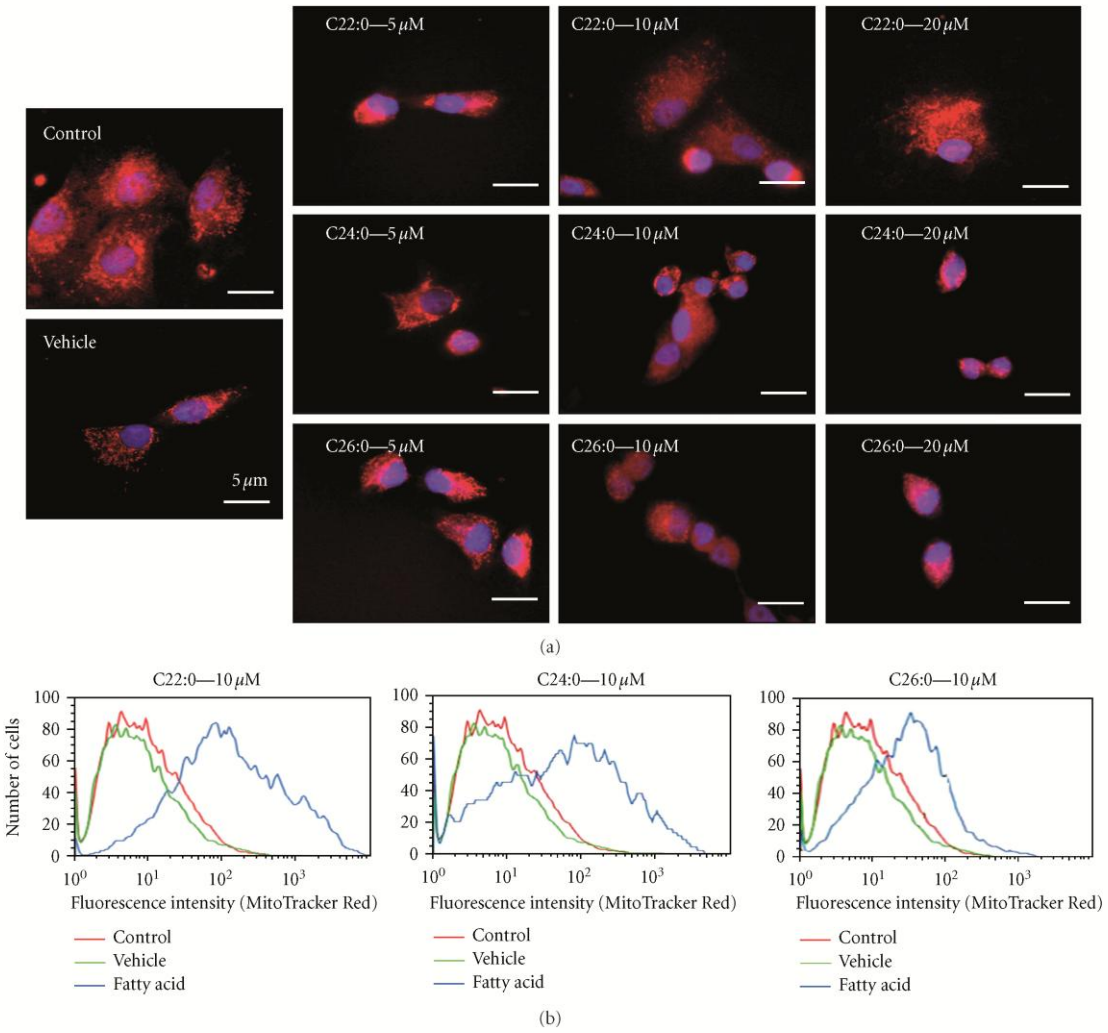


FIGURE 7: Analysis by fluorescence microscopy and flow cytometry of the effects of C22:0, C24:0, and C26:0 on mitochondrial topography and mitochondrial mass. SK-NB-E cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle), or a VLCFA (C22:0, C24:0, or C26:0) used at 10 μM. Mitochondria were identified by staining with MitoTracker Red. (a) Evaluation of mitochondrial topography by fluorescence microscopy; whereas some fluorescent dots are often observed in the cytoplasm of untreated (control) and α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells, a more diffuse and irregular staining pattern is detected under treatment with VLCFAs. (b) Quantification of mitochondrial mass by flow cytometry. Data shown are representative of at least two independent experiments.

of mitochondrial enzymes (glycolysis and tricarboxylic acid cycle enzymes) and reduces their activity, contributing in turn to enhancing mitochondrial ROS production [60, 61], C22:0 and C24:0 may activate similar mechanisms. Although by Western blotting, under treatment with C22:0, we did not observe quantitative modifications of the Complex I subunit NDUFB8 (20 kDa), Complex II subunit (30 kDa), Complex III subunit Core 2 (47 kDa), Complex IV subunit II (24 kDa), and Complex V ATP synthase subunit alpha (53 kDa) involved in oxidative phosphorylation, whose defect may result in nonfunctional synapses, axonal degeneration, and cell death [66], this does not exclude oxidative modifications of these complexes, which may not affect the reactivity with the antibodies used. This also does not exclude oxidative modifications on other proteins of these complexes as well as decreased activities of these complexes as observed in hepatocytes of PEX5-deficient mice (a model of peroxisome biogenesis disorders), where a peroxisomal defect leads to lower β-oxidation and accumulation of C24:0 and C26:0 [67]. It is noteworthy that under treatment with C24:0 and C26:0 the decrease of Complex III subunit Core 2 (only with C24:0 (5 μM) and C26:0 (10 μM)) and Complex IV subunit II

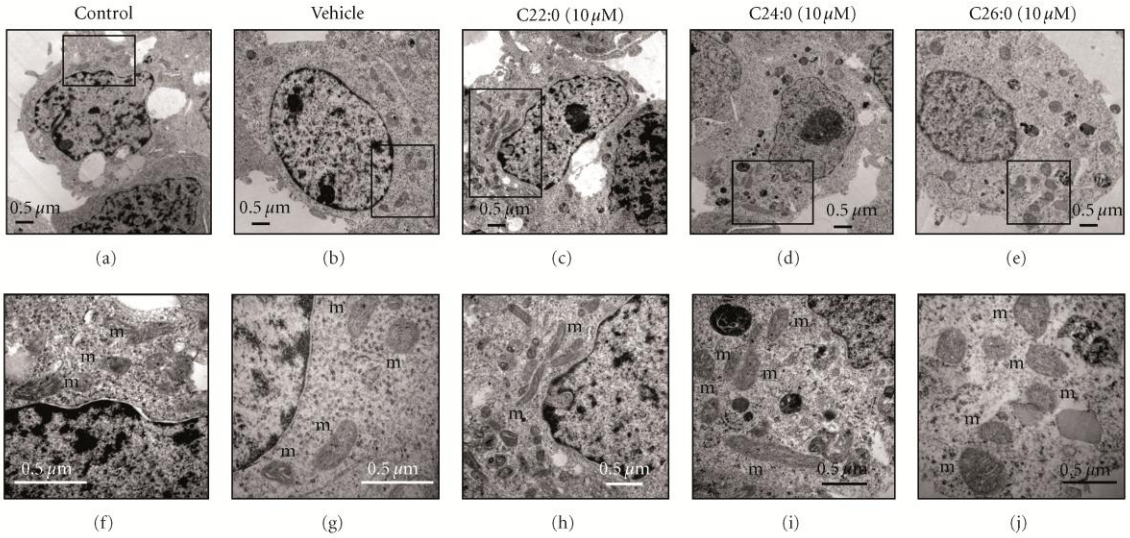


Figure 8: Evaluation by transmission electron microscopy of the ultrastructural characteristics of human neuronal cells (SK-NB-E) treated with C22:0, C24:0, or C26:0 and of their mitochondrial characteristics. Transmission electron microscopy of SK-NB-E cells cultured for 48 h in the absence (control cells) (a, f) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle) (b, g), C22:0 (10 μM) (c, h), C24:0 (10 μM) (d, i), or C26:0 (10 μM) (e, j). The insets in Figures (a, b, c, d, and e) correspond to Figures (f, g, h, i, and j), respectively. No differences were observed between control (a, f) and vehicle-treated cells (b, g). In C22:0-, C24:0- and C26:0-treated cells, no signs of apoptosis (cells with perinuclear chromatin, with condensed and/or fragmented nuclei) were detected [47, 48], but some mitochondrial modifications were observed. In C22:0- (h), C24:0- (i), and C26:0- (j) treated SK-NB-E cells, when compared to control and vehicle-treated cells, higher numbers of mitochondria, often larger in size, were found.

(both with C24:0 and C26:0 (5 and 10 μM)) observed on SK-NB-E cells was in agreement with observations on fibroblast primary cultures of PEX5-deficient mice where a reduction of the core I subunit of Complex III and subunit I of Complex IV was found [68]. It remains to be determined whether the different effects between C24:0 and C26:0 on Complex III subunit Core 2 are characteristic of these fatty acids or whether they depend not only on their concentrations, but also on the time of treatment considered.

In addition to these functional mitochondrial dysfunctions, some topographical, quantitative, and morphological modifications of the mitochondria were also observed under treatment of SK-NB-E cells with C22:0, C24:0, and C26:0. Thus, using MitoTracker Red, which identifies the cytoplasmic distribution of mitochondria by fluorescence microscopy [45], important changes were found under treatment with C22:0, C24:0, and C26:0. In contrast to the fluorescent dots often observed in control and α-cyclodextrin-treated cells, a more diffuse and irregular staining pattern was detected in the presence of C22:0, C24:0, and C26:0. Moreover, with flow cytometry the higher fluorescence intensity of MitoTracker Red observed under treatment with C22:0, C24:0, and C26:0, compared to control and α-cyclodextrin-treated cells, favors the hypothesis of an increase of the mitochondrial mass, recently reported with the use of this fluorochrome on cells submitted to chemical or physical stresses [69, 70], which could correspond to either a higher number of mitochondria and/or the presence of mitochondria of larger sizes. Interestingly, these two possibilities are supported by the observations from transmission electron microscopy. Since fusion and fission of mitochondria are strictly controlled in neurons, malfunction in this process triggered by VLCFAs may contribute to activating neuronal death [48, 71]. In addition, as described on cardiac myocytes in stress conditions [72], the biogenesis of mitochondria under treatment with C22:0, C24:0, and C26:0 could occur to compensate the loss of mitochondrial activity and to maintain the stability of mitochondrial metabolism. Moreover, in agreement with this hypothesis, on eicosapentaenoic acid-treated rat glioma C6 cells, it has been suggested that enhancement of mitochondrial biogenesis through enhanced PGC1-α and Tfam transcriptional activities may provide partial protection against cytotoxicity [73].

Altogether, our data indicate that VLCFAs (C22:0, C24:0, and C26:0) could constitute potential risk factors in AD. They could favor neurodegeneration by inducing neuronal damages via their ability to induce mitochondrial dysfunctions. Therefore, as C22:0, C24:0, and C26:0 have been identified in the brain of patients with AD, they could contribute to the development of this pathology, and the mitochondria may constitute a rational target for therapeutic intervention [74]. Therefore, the ability to counteract the associated mitochondrial dysfunctions might help identify new therapeutic targets and develop efficient treatments in AD.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the INSERM, the Université de Bourgogne (Dijon, France), the Université de Monastir (Monastir, Tunisia), and the Conseil Régional de Bourgogne.

References

[1] A. Burns and S. Iliffe, "Alzheimer's disease," *British Medical Journal*, vol. 338, article b158, 2009.

[2] H. W. Querfurth and F. M. LaFerla, "Alzheimer's disease," *The New England Journal of Medicine*, vol. 362, no. 4, pp. 329–344, 2010.

[3] J. Hardy, "A hundred years of Alzheimer's disease research," *Neuron*, vol. 52, no. 1, pp. 3–13, 2006.

[4] R. J. O'Brien and P. C. Wong, "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 34, pp. 185–204, 2011.

[5] C. Hooper, R. Killick, and S. Lovestone, "The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 104, no. 6, pp. 1433–1439, 2008.

[6] F. Hernández, E. Gómez de Barreda, A. Fuster-Matanzo, J. J. Lucas, and J. Avila, "GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein," *Experimental Neurology*, vol. 223, no. 2, pp. 322–325, 2010.

[7] T. Hartmann, J. Kuchenbecker, and M. O. Grimm, "Alzheimer's disease: the lipid connection," *Journal of Neurochemistry*, vol. 103, pp. 159–170, 2007.

[8] S. Grösgen, M. O. W. Grimm, P. Frieß, and T. Hartmann, "Role of amyloid beta in lipid homeostasis," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1801, no. 8, pp. 966–974, 2010.

[9] H. Hayashi, "Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 34, no. 4, pp. 453–461, 2011.

[10] D. - Seripa, G. D'Onofrio, F. Panza, L. Cascavilla, C. Masullo, and A. Pilotto, "The genetics of the human APOE polymorphism," *Rejuvenation Research*, vol. 14, no. 5, pp. 491–500, 2011.

[11] L. M. Bekris, C. E. Yu, T. D. Bird, and D. W. Tsuang, "Review article: genetics of Alzheimer disease," *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, vol. 23, no. 4, pp. 213–227, 2010.

[12] N. B. Javitt, "Oxysterols: novel biologic roles for the 21st century," *Steroids*, vol. 73, no. 2, pp. 149–157, 2008.

[13] V. Leoni and C. Caccia, "Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 164, no. 6, pp. 515–524, 2011.

[14] D. W. Russell, "Oxysterol biosynthetic enzymes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1529, no. 1–3, pp. 126–135, 2000.

[15] G. J. Schroepfer Jr., "Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes," *Physiological Reviews*, vol. 80, no. 1, pp. 361–554, 2000.

[16] A. Vejux and G. Lizard, "Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 30, no. 3, pp. 153–170, 2009.

[17] T. J. Nelson and D. L. Alkon, "Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory and neurodegeneration," *Biochemical Society Transactions*, vol. 33, no. 5, pp. 1033–1036, 2005.

[18] J. Vaya and H. M. Schipper, "Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 102, no. 6, pp. 1727–1737, 2007.

[19] A. Solomon, V. Leoni, M. Kivipelto et al., "Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease," *Neuroscience Letters*, vol. 462, no. 1, pp. 89–93, 2009.

[20] D. W. Russell, R. W. Halford, D. M. O. Ramirez, R. Shah, and T. Kotti, "Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 78, pp. 1017–1040, 2009.

[21] J. Brown III, C. Theisler, S. Silberman et al., "Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 33, pp. 34674–34681, 2004.

[22] J. R. P. Prasanthi, A. Huls, S. Thomasson, A. Thompson, E. Schommer, and O. Ghribi, "Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on β-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 4, no. 1, article 1, 2009.

[23] I. Björkhem, "Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain," *Journal of Internal Medicine*, vol. 260, no. 6, pp. 493–508, 2006.

[24] I. Björkhem, A. Cedazo-Minguez, V. Leoni, and S. Meaney, "Oxysterols and neurodegenerative diseases," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 30, no. 3, pp. 171–179, 2009.

[25] S. R. Terlecky, J. I. Koepke, and P. A. Walton, "Peroxisomes and aging," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1763, no. 12, pp. 1749–1754, 2006.

[26] V. I. Titorenko and S. R. Terlecky, "Peroxisome metabolism and cellular aging," *Traffic*, vol. 12, no. 3, pp. 252–259, 2011.

[27] M. J. Santos, R. A. Quintanilla, A. Toro et al., "Peroxisomal proliferation protects from β-amyloid neurodegeneration," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 49, pp. 41057–41068, 2005.

[28] A. Cimini, S. Moreno, M. D'Amelio et al., "Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 18, no. 4, pp. 935–952, 2009.

[29] R. J. A. Wanders and H. R. Waterham, "Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 75, pp. 295–332, 2006.

[30] G. Lizard, O. Rouaud, J. Demarquoy, M. Cherkaoui-Malki, and L. Iuliano, "Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type," *Journal of Alzheimer's disease*, vol. 29, no. 2, pp. 241–254, 2012.

[31] J. Kou, G. G. Kovacs, R. Höftberger et al., "Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease," *Acta Neuropathologica*, vol. 122, no. 3, pp. 271–283, 2011.

[32] F. S. Eichler, J. Q. Ren, M. Cossoy et al., "Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy?" *Annals of Neurology*, vol. 63, no. 6, pp. 729–742, 2008.

[33] S. Hein, P. Schönfeld, S. Kahlert, and G. Reiser, "Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture," *Human Molecular Genetics*, vol. 17, no. 12, pp. 1750–1761, 2008.

[34] M. Baarine, K. Ragot, A. Athias et al., "Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF-α on

oligodendrocytes and astrocytes," *Neurotoxicology*, vol. 33, no. 2, pp. 212–228, 2012.

[35] M. Baarine, P. Andréoletti, A. Athias et al., "Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid—treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins," *Neuroscience*, vol. 213, pp. 1–18, 2012.

[36] M. Dumont and M. F. Beal, "Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 51, no. 5, pp. 1014–1026, 2011.

[37] R. H. Swerdlow, "Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1812, no. 12, pp. 1630–1639, 2011.

[38] E. Lezi and R. H. Swerdlow, "Mitochondria in neurodegeneration," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 942, no. 2, pp. 269–286, 2012.

[39] I. Singh and Y. Kishimoto, "Effect of cyclodextrins on the solubilization of lignoceric acid, ceramide, and cerebroside, and on the enzymatic reactions involving these compounds," *Journal of Lipid Research*, vol. 24, no. 5, pp. 662–665, 1983.

[40] Y. Takemoto, Y. Suzuki, R. Horibe et al., "Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders," *Brain and Development*, vol. 25, no. 7, pp. 481–487, 2003.

[41] G. Lizard, S. Gueldry, V. Deckert, P. Gambert, and L. Lagrost, "Evaluation of the cytotoxic effects of some oxysterols and of cholesterol on endothelial cell growth: methodological aspects," *Pathologie Biologie*, vol. 45, no. 4, pp. 281–290, 1997.

[42] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55–63, 1983.

[43] S. Lemaire-Ewing, C. Prunet, T. Montange et al., "Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 21, no. 2, pp. 97–114, 2005.

[44] G. Rothe and G. Valet, "Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2′,7′-dichlorofluorescin," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 47, no. 5, pp. 440–448, 1990.

[45] R. P. Haugland, *Molecular Probes Handbook, a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies, 11th edition, 2010, edited by I. Johnson and M. T. Z. Spence.

[46] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson et al., "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Analytical Biochemistry*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, 1985.

[47] G. Lizard, S. Fournel, L. Genestier et al., "Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis," *Cytometry*, vol. 21, no. 3, pp. 275–283, 1995.

[48] E. Kahn, M. Baarine, A. Dauphin et al., "Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via LAURDAN and FAMIS spectral image analysis," *Cytometry A*, vol. 79, no. 4, pp. 293–305, 2011.

[49] N. J. Marshall, C. J. Goodwin, and S. J. Holt, "A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function," *Growth Regulation*, vol. 5, no. 2, pp. 69–84, 1995.

[50] G. Lizard, V. Deckert, L. Dubrez, M. Moisant, P. Gambert, and L. Lagrost, "Induction of apoptosis in endothelial cells treated with cholesterol oxides," *American Journal of Pathology*, vol. 148, no. 5, pp. 1625–1638, 1996.

[51] G. Lenaz, M. D'Aurelio, M. Merlo Pich et al., "Mitochondrial bioenergetics in aging," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1459, no. 2-3, pp. 397–404, 2000.

[52] A. Navarro and A. Boveris, "Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease," *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 2, article 34, 2010.

[53] J. M. Zahm, S. Baconnais, S. Monier et al., "Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy," *Cytometry A*, vol. 52, no. 2, pp. 57–69, 2003.

[54] C. Cottet-Rousselle, X. Ronot, X. Leverve, and J. F. Mayol, "Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes," *Cytometry A*, vol. 79, no. 6, pp. 405–425, 2011.

[55] S. Fourcade, J. López-Erauskin, J. Galino et al., "Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy," *Human Molecular Genetics*, vol. 17, no. 12, pp. 1762–1773, 2008.

[56] E. Galea, N. Launay, M. Portero-Otin et al., "Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: a paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases?" *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1822, no. 9, pp. 1475–1488, 2012.

[57] C. R. Vargas, M. Wajner, L. R. Sirtori et al., "Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1688, no. 1, pp. 26–32, 2004.

[58] M. Deon, A. Sitta, A. G. Barschak et al., "Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 266, no. 1-2, pp. 79–83, 2008.

[59] M. Deon, A. Sitta, A. G. Barschak et al., "Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 25, no. 7, pp. 441–444, 2007.

[60] J. Galino, M. Ruiz, S. Fourcade et al., "Oxidative damage compromises energy metabolism in the axonal degeneration mouse model of X-adrenoleukodystrophy," *Antioxid Redox Signal*, vol. 15, no. 8, pp. 2095–2107, 2011.

[61] A. C. Nulton-Persson and L. I. Szweda, "Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 26, pp. 23357–23361, 2001.

[62] S. Fourcade, M. Ruiz, C. Guilera et al., "Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy," *Human Molecular Genetics*, vol. 19, no. 10, pp. 2005–2014, 2010.

[63] A. Pujol, C. Hindelang, N. Callizot, U. Bartsch, M. Schachner, and J. L. Mandel, "Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy," *Human Molecular Genetics*, vol. 11, no. 5, pp. 499–505, 2002.

[64] T. Uto, M. A. Contreras, A. G. Gilg, and I. Singh, "Oxidative imbalance in nonstimulated X-adrenoleukodystrophy-derived lymphoblasts," *Developmental Neuroscience*, vol. 30, no. 6, pp. 410–418, 2009.

[65] A. Pujol, I. Ferrer, C. Camps et al., "Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy," *Human Molecular Genetics*, vol. 13, no. 23, pp. 2997–3006, 2004.

[66] M. E. Breuer, W. J. Koopman, S. Koene et al., "The role of mitochondrial OXPHOS dysfunction in the development of neurologic diseases," *Neurobiology of Disease*. In press.

[67] R. Dirkx, I. Vanhorebeek, K. Martens et al., "Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and

ER abnormalities," *Hepatology*, vol. 41, no. 4, pp. 868–878, 2005.

[68] E. Baumgart, I. Vanhorebeek, M. Grabenbauer et al., "Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse)," *American Journal of Pathology*, vol. 159, no. 4, pp. 1477–1494, 2001.

[69] W. Chowanadisai, K. A. Bauerly, E. Tchaparian, A. Wong, G. A. Cortopassi, and R. B. Rucker, "Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1α expression," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 1, pp. 142–152, 2010.

[70] T. F. Tornatore, A. P. Dalla Costa, C. F. M. Z. Clemente et al., "A role for focal adhesion kinase in cardiac mitochondrial biogenesis induced by mechanical stress," *American Journal of Physiology*, vol. 300, no. 3, pp. H902–H912, 2011.

[71] D. T. W. Chang and I. J. Reynolds, "Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons," *Progress in Neurobiology*, vol. 80, no. 5, pp. 241–268, 2006.

[72] P. Ahuja, P. Zhao, E. Angelis et al., "Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 5, pp. 1494–1505, 2010.

[73] J. Y. Jeng, W. H. Lee, Y. H. Tsai, C. Y. Chen, S. Y. Chao, and R. H. Hsieh, "Functional modulation of mitochondria by eicosapentaenoic acid provides protection against ceramide toxicity to C6 glioma cells," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 24, pp. 11455–11462, 2009.

[74] P. H. Reddy, "Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease," *CNS Spectrums*, vol. 14, no. 8, supplement 7, pp. 8–13, 2009.

Biochimie xxx (2013) 1–9

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Mini-review

Brain peroxisomes

D. Trompier [a], A. Vejux [a], A. Zarrouk [a, b], C. Gondcaille [a], F. Geillon [a], T. Nury [a], S. Savary [a], G. Lizard [a, *]

[a] Université de Bourgogne, Laboratoire «Bio-PeroxIL» de Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique (EA7270)/INSERM, 6 Bd Gabriel, Dijon F-21000, France
[b] Université de Monastir, Faculté de Médecine, LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition – Functional Food & Vascular Health', Avenue Avicenne, Monastir, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 May 2013
Accepted 12 September 2013
Available online xxx

Keywords:
Peroxisome disorders
Demyelination
Oxidative stress
Inflammation
Alzheimer's disease

ABSTRACT

Peroxisomes are essential organelles in higher eukaryotes as they play a major role in numerous metabolic pathways and redox homeostasis. Some peroxisomal abnormalities, which are often not compatible with life or normal development, were identified in severe demyelinating and neurodegenerative brain diseases. The metabolic roles of peroxisomes, especially in the brain, are described and human brain peroxisomal disorders resulting from a peroxisome biogenesis or a single peroxisomal enzyme defect are listed. The brain abnormalities encountered in these disorders (demyelination, oxidative stress, inflammation, cell death, neuronal migration, differentiation) are described and their pathogenesis are discussed. Finally, the contribution of peroxisomal dysfunctions to the alterations of brain functions during aging and to the development of Alzheimer's disease is considered.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

Peroxisomes are DNA free organelles present in nearly all eukaryotic cells (with the exception of erythrocytes) including unicellular eukaryotes and higher plant cells [1]. They are morphologically characterized by a single limiting membrane and a finely granular matrix with a range in size from 0.1 to 1 μm in diameters (Fig. 1). However, peroxisome shape, size, and cellular content show considerable variations in response to fission, fusion, and proliferation mechanisms. Among the different organs, peroxisomes are numerous in liver (hepatocytes) and peroxisomal proteins expression has been detected in different areas of the brain (especially cerebellum, hippocampus) and in all neural cell types with a preponderance for glial cells (oligodendrocytes, astrocytes) [2]. In the cytoplasm, peroxisomes are highly dynamic organelles with marked plasticity that have been shown to move in a motor protein-dependent manner along microtubules in mammals [3] or actin filaments in plants and fungi [4]. As peroxisomes lack DNA, most of the peroxisomal membrane and matrix proteins are synthesized on free polyribosomes in the cytoplasm and are then transported post-translationally to the organelle. So, specific proteins import pathways are required. They include two classes of matrix targeting signals for peroxisomal proteins [PTS1 (Peroxisomal Targeting Signal 1) and PTS2] which are recognized by cytosolic receptors [PEX5 (peroxin 5) and PEX7, respectively] escorting their cargo proteins to, or possibly across, the peroxisome membrane.

The crucial roles of peroxisomes in human health became obvious when some peroxisomal abnormalities, which are often not compatible with life or normal development, were identified in severe neurodegenerative and demyelinating brain diseases. This review describes the metabolic role of peroxisomes with a special focus on the brain and lists the human brain peroxisomal disorders resulting from a peroxisome biogenesis defect or from a single peroxisomal enzyme defect. We focused on the abnormalities of myelination, oxidative stress, inflammation, cell death and neuronal migration problems observed in brain peroxisomal disorders and discussed the causes of these abnormalities. Finally, the potential role of peroxisomes in brain degeneration is considered with the involvement of peroxisomes in cell aging and in the development of Alzheimer's disease.

Abbreviations: ABC, ATP-Binding Cassette; ACOX, acyl-CoA oxidase; AD, Alzheimer's disease; AMACR, α-methyl-acyl-CoA-racemase; RD, Refsum disease; Aβ, amyloid β peptide; DBPD, D-bifunctional protein deficiency; DHA, docosahexaenoic acid; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; DHCA, dihydroxycholestanoic acid; IRD, infantile Refsum disease; MUFA, monounsaturated fatty acid; NALD, neonatal adrenoleukodystrophy; NO, nitric oxide; PBD, peroxisome biogenesis disorders; PEX, peroxin; PNALD, pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy; PUFA, polyunsaturated fatty acid; RCDP, rhizomelic chondrodysplasia punctata; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; THCA, trihydroxycholestanoic acid; VLCFA, very-long-chain fatty acid; X-ALD, X-linked adrenoleukodystrophy; ZSS, Zellweger syndrome spectrum; ZS, Zellweger syndrome.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)380396256; fax: +33 (0)380396250.
E-mail address: gerard.lizard@u-bourgogne.fr (G. Lizard).

0300-9084/$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier Masson SAS.
http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

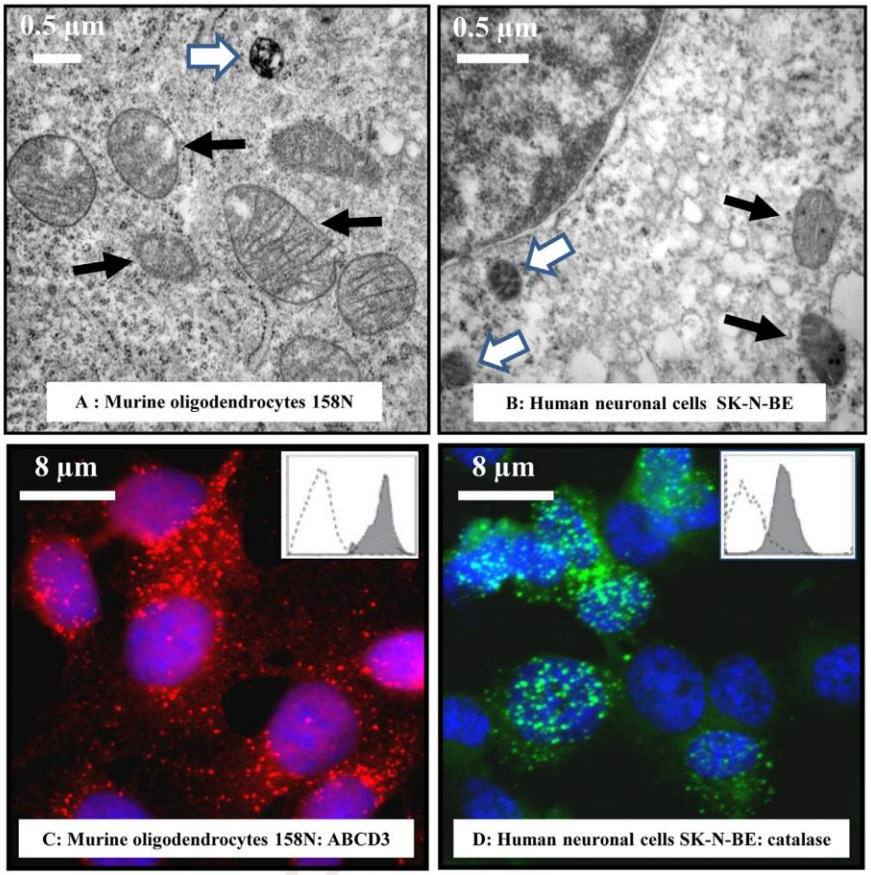


Fig. 1. Identification of peroxisomes in neural cells. Peroxisomes can be identified in brain cells by various techniques: transmission electron microscopy (A, B), conventional and confocal fluorescence microscopy by using antibodies recognizing specific peroxisomal proteins as ABCD3 and catalase (C, D), and by flow cytometry (insets: C, D) [55]. Dark arrows point towards mitochondria and white arrows point towards peroxisomes.

1. Metabolic role of peroxisomes in brain

More than 50 enzymes participating in various metabolic pathways, especially lipid and oxidative metabolic pathways, have been identified [5]. The main peroxisomal functions concern lipid metabolism with the β-oxidation of diverse compounds and the α-oxidation of phytanic acid [6]. Peroxisomes are also crucial for hydrogen peroxide detoxification, via catalase activity and are also involved in the degradation of purines, D-amino acids, polyamines, eicosanoids and uric acid (in non-primates). In brain, one of the main roles of peroxisomes is to degrade saturated very-long-chain fatty acids (VLCFA) like C24:0 and C26:0 and to participate in the equilibrium of these compounds particularly enriched in the myelin. Peroxisomal β-oxidation of VLCFA consists in 4 enzymatic steps: dehydrogenation, hydration, dehydrogenation again, thiolytic cleavage releasing a shortened fatty acid and acetyl-CoA [6]. The released fatty acid undergoes subsequent rounds of β-oxidation till the formation of octanoyl-CoA. Carnitine octanoyltransferase catalyzing the exchange of acyl groups between carnitine and coenzyme A (CoA) contributes to connect peroxisomes with mitochondria, octanoyl-carnitine being transported to the mitochondria to be fully degraded. Peroxisomal β-oxidation also concerns monounsaturated (MUFA), polyunsaturated fatty acids (PUFA) and their derivatives (eicosanoids and docosanoids), 2-methyl branched-chain fatty acids and dicarboxilic acids whose excesses can be as toxic as the accumulation of saturated VLCFA [6]. Degradation of eicosanoids is of particular importance given the inflammatory pathways that depend on these molecules. Arachidonic (C20:4 n-6) and eicosapentaenoic (C20:5 n-3) acids, and their derivatives (prostaglandins, leukotrienes, prostacyclins, thromboxanes) are the known mediators of a broad range of inflammatory reactions [7].

Peroxisomal β-oxidation may not be considered as a simple catabolic pathway since the last step of the synthesis of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) involves one turn of β-oxidation from C24:6 n-3 [8]. DHA is the best represented PUFA in brain and nervous tissues. In addition to its structural role in membrane lipids, DHA has been shown to act at different levels in brain for neurotransmission, synaptic plasticity, gene expression, calcium concentration homeostasis [7,9]. Its enzymatic conversion to resolvins, neuroprotectins and maresins provides very active anti-inflammatory molecules that can inhibit the generation of prostaglandins, leukotrienes, and thromboxanes [10,11]. The brain concentration of DHA depends on both dietary content in n-3 PUFA and liver synthesis [12]. Another important function of peroxisomes in the brain concerns the synthesis of plasmalogens since the first 2 steps of this anabolic pathway take place in peroxisomes [13]. After the acylation of dihydroxyacetone phosphate, which forms a 1-acyl-DHAP, the acyl group is replaced by a fatty alcohol synthetized within peroxisomes from acyl-CoA [14]. The 1-alkyl-DHAP is

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

then reduced to yield a 1-alkyl-phosphoglycerol which is further processed in the endoplasmic reticulum. The major predicted roles of plasmalogens are to contribute to membrane fluidity, to buffer oxidative stress and to serve as reservoirs for second messengers [15].

Beyond their role in lipid metabolism, peroxisomal functions are involved in the control of oxidative stress homeostasis [5]. Peroxisomal enzymes such as acyl-CoA oxidases (ACOX) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) [16] are known to generate oxidative stress with reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). ROS molecules, especially superoxide anions ($O_2^{\bullet}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and RNS molecules with nitric oxide (NO), are produced in part in peroxisomes [17]. In the same time, peroxisomes possess enzymatic components which counteract the oxidative and nitrosative stress. These enzymes include catalase, superoxide dismutase 1, or glutathione S-transferase [17].

2. Human brain peroxisome disorders

Peroxisomes contribute to central metabolic pathways in the brain and their functional importance in human health is highlighted by peroxisomal disorders. Currently, these disorders are classified into two groups: i) peroxisome biogenesis disorders (PBDs) and ii) single peroxisomal enzyme deficiencies (Table 1).

2.1. Peroxisome biogenesis disorders

The PBDs result from a failure in organelle formation leading to multiple metabolic abnormalities. The PBDs can be divided into two subtypes; i) the Zellweger syndrome spectrum (ZSS) disorders and ii) the rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) type 1.

The ZSS is a group of inherited diseases which consists of at least three different but overlapping clinical phenotypes with variable severity of neurologic symptoms [18]. The Zellweger syndrome (ZS) is the most severe form, the neonatal adrenoleukodystrophy (NALD) is intermediate and the infantile Refsum disease (IRD) is the less severe phenotype. PBDs are autosomal recessive disorders all caused by a defect in *PEX* genes which encode for peroxins, proteins necessary for peroxisome biogenesis and involved in the import process of peroxisomal integral membrane and matrix proteins. It is not possible to predict the defective *PEX* gene from the biochemical or clinical phenotype. However, the type of mutation of the defective *PEX* gene correlates with the clinical severity and with the impact on peroxisome function and assembly. Biochemical abnormalities are less severe in patients with milder form of PBDs whose skin fibroblasts contain residual peroxisome activity. Cells from patients with severe ZS are devoid of peroxisomes.

RCDP type 1 is clinically clearly distinct from the ZSS disorders. Patients with RCDP type 1 have mutations in *PEX7* gene which encodes a cytosolic receptor that directs PTS2 peroxisomal matrix enzymes to the peroxisomes. Three PTS2 enzymes are transported by PEX7: the ACAA1 thiolase of the β-oxidation pathway, the phytanoyl-CoA hydroxylase of the α-oxidation pathway, and the alkyl-DHAP synthase involved in the synthesis of plasmalogens. The function of ACCA1 can be taken over by a second thiolase (SCPx) transported to the peroxisomes by PEX5, explaining why plasma VLCFA levels are normal in RCDP patients. However, defective targeting of the alkyl-DHAP synthase and the phytanoyl-CoA hydroxylase leads to plasmalogen deficiency and also to phytanic acid accumulation [19].

2.2. Single peroxisomal enzyme deficiencies

The second category of peroxisomal disorders includes disorders which result from the deficiency of a single peroxisomal enzyme involved in β-oxidation, α-oxidation or ether lipid synthesis.

Four main defined disorders of peroxisomal β-oxidation have been identified; i) X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), ii) acyl-CoA oxidase 1 deficiency (or PNALD; pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy), iii) D-bifunctional protein deficiency (DBPD) and iv) α-methyl-acyl-CoA-racemase (AMACR) deficiency. X-ALD is the most common peroxisomal disorder with impaired β-oxidation of saturated VLCFA resulting in the accumulation of VLCFA in plasma and tissues, which is a reliable diagnostic marker of the disease. In X-ALD brain, increased VLCFA levels are found especially in the cholesterol ester fraction but also in cerebrosides, phosphatidylcholine, sphingomyelin and sulfatides [20]. This complex neurodegenerative disorder is characterized by a huge clinical variability both in the age of onset and in symptoms. The responsible gene for X-ALD is the *ABCD1* gene which encodes for a peroxisomal ATP-Binding Cassette (ABC) transporter involved in the transport of VLCFA-CoA into the peroxisomes for their β-oxidation [21,22]. The clinical presentation of PNALD and DBPD resembles that of the disorders of peroxisome biogenesis although there are defects in only one single enzymatic process. ACOX1 catalyzes the α, β-dehydrogenation of a range of acyl-CoA esters among which saturated VLCFA, resulting in elevated VLCFA levels in plasma of patients although peroxisomes were present and even of enlarged sizes. The D-bifunctional protein deficiency causes abnormal oxidation of VLCFA, pristanic acid and di- and trihydroxycholestanoic acids (DHCA, THCA) resulting in their accumulation in plasma of patients. The AMACR deficiency is a rare autosomal recessive disorder that was reported in ten adults and four infants worldwide. The enzyme catalyzes the interconversion of (2R)- and (2S)-stereoisomers of α-methyl branched-chain fatty acids (such as pristanic acid), DHCA and THCA, which explains the accumulation of pristanic acid and bile-acid intermediates in patients.

The absence of the first enzyme involved in the α-oxidation pathway, the phytanoyl-CoA hydroxylase, is responsible for Refsum disease (RD). All patients accumulate phytanic acid in blood and tissues. Rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) of type 2 and of type 3 are lethal disorders, respectively associated with mutation in the *GNPAT* and *AGPS* genes that encode for the two enzymes (DHAP acyltransferase and alkyl DHAP synthase) catalyzing the first steps of ether lipid biosynthesis in peroxisomes. The clinical phenotypes are indistinguishable from that of patients with RCDP of type 1 and these disorders are characterized by decreased levels of plasmalogens.

3. Physiopathological consequences of peroxisomal dysfunctions

3.1. Differentiation and neuronal migration abnormalities

Abnormalities in neuronal migration are classically seen in ZS, NALD and DBPD patients [23]. The neuronal migration defects are less prominent in NALD patients and often indistinguishable between ZS and DBPD patients. Only few cases among IRD and RCDP patients have displayed cerebral neuronal migration problems [23]. ZS neuropathological features include impaired brain neuronal migration leading to characteristic cytoarchitectonic abnormalities in the cerebral cortex and in the cerebellum [24]. The malformation of the cerebral cortex is most severe, encountered postnatally and on fetuses, and results from an impaired migration of neuroblasts to form the cerebral cortical plate. The cerebellum contains heterotopic Purkinje cells in the white matter or combinations of abnormally arranged Purkinje cells and granule neurons. In addition, defects in neuronal differentiation, proliferation and survival may also contribute to the malformations, as assessed by in vivo

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

ARTICLE IN PRESS

BIOCHI4300_proof ■ 23 September 2013 ■ 4/9

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

UNCORRECTED PROOF

Table 1
Human brain peroxisome deficiencies and their pathologies. A plus sign (+) denotes presence; absence of sign means either there is no defect or that the defect has not been described (yet); a +/− sign denotes that the symptom may or may not be present. For biochemical features, the presence (+) of increased and decreased levels of fatty acids/lipids are indicated.

Disease	Peroxisome biogenesis disorders (PBD)				Single peroxisomal enzyme deficiency						
	Zellweger syndrome spectrum			RCDP type 1	X-ALD	PNALD	DBP deficiency	AMACR deficiency	Refsum disease	RCDP type 2	RCDP type 3
	ZS	NALD	IRD								
OMIM				215100	300100	264470	261515	614307	266500	222765	600121
Gene defect	*PEX 1,2,3,5,6,10,12, 13, 14,16,19 or 26*	*PEX 1,5,6,10, 12, 13, or 26*	*PEX 1,2,12 or 26*	*PEX 7*	*ABCD1*	*ACOX1*	*HSD17B4*	*AMACR*	*PHYH*	*GNPAT*	*AGPS*
Peroxisomes	Absence (or "ghost")	Absence (or "ghost")	Absence (or "ghost")	+	+	+ (abnormal)	+ (abnormal)	+	+	+	+
Clinical features											
Hypotonia	+	+	+	+		+	+			+	+
Craniofacial dysmorphy	+	+	+	+		+	+			+	+
Skeletal defect	+	+	+	+		+	+		+	+	+
Growth retardation	+	+	+	+		+	+			+	+
Mental retardation	+	+	+	+	+/−	+	+	+/−		+	+
Spasticity	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Seizure	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Retinopathy/vision failure	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Hearing failure	+	+	+		+	+			+	+	+
Anosmia									+		
Neurological abnormalities											
Brain development											
Cortex malformation	+	+	+	+		+	+	+			
Neuronal migration defect	+	+	+	+			+				
Cerebellum malformation	+	+	+	+			+	+	+		
Brain degeneration											
Leukodystrophy	+	+	+		+	+	+	+/−			
Peripheral neuropathy	+	+	+		+/−	+	+	+	+		
Biochemical features											
Ether lipids (plasmalogens) ↓	+	+	+	+	+					+	+
DHA ↓	+	+	+	+		+					
VLCFA ↑	+	+	+		+	+	+				
Branched-chain fatty acids ↑	+	+	+	+		+	+	+	+		
Bile-acid intermediates ↑	+	+	+				+	+			
	Multiple impaired metabolic pathways				Impaired β-oxidation				Impaired α-oxidation	Impaired ether lipid biosynthesis	
Survival (-year-old)	<1	<10	Up to adulthood	<10	<10	<5	<2		Normal (under diet)	<10	<10
Approximative onset	Newborn[a]	Newborn[a]	Newborn[a]	Newborn[a]	Childhood	Newborn[a]	Newborn[a]	Adulthood	Childhood	Childhood[b]	Childhood[b]

Abbreviations: ZS, Zellweger syndrome; NALD, neonatal adrenoleukodystrophy; IRD, infantile Refsum disease; RCDP, rhizomelic chondrodysplasia punctata; X-ALD, X-linked adrenoleukodystrophy; PNALD, pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy; DBP, D-bifunctional protein; AMACR, α-methyl-acyl-CoA-racemase; PEX, peroxin; ABCD1, ATP-Binding Cassette D1; ACOX, acyl-CoA oxidase; PHYH, phytanoyl-CoA hydroxylase; GNPAT, glycerone-phosphate O-acyltransferase; AGPS, alkylglycerone-phosphate synthase; DHA, docosahexaenoic acid; VLCFA, very-long-chain fatty acid.

[a] In patients affected at birth, the onset is actually already during intrauterine development.

[b] RCDP type 2 and 3 can start as early as RCDP type 1.

studies in *Pex2* $^{/}$ Zellweger mice [24]. The neuronal migration abnormalities in DBPD are similar to those in ZS [25,26] and more extensive than the abnormalities seen in NALD [27]. The precise molecular mechanisms causing the neuronal migration and differentiation defects remains obscure. The peroxisomal metabolism in brain as well as in extraneuronal tissues influence the neuronal migration process in *Pex5* knock-out mice, a model for Zellweger syndrome [28]. It seems unlikely that VLCFA accumulation, plasmalogens depletion or DHA deficiency by themselves cause the migration defect in peroxisomal disorders but they may rather contribute to the defects.

3.2. Abnormal myelination

In humans, *myelin production* begins in the fifth month of fetal *development* in the motor roots of peripheral nervous system, and is followed by myelination of the spinal cord and the brain. Although normal myelination occurs mainly in the first two years of life, myelination continues for 20–30 years in the human cerebral white matter. Myelin defects in brain peroxisomal disorders include delayed myelination (with increasing content of myelin over time), hypomyelination (with unchanged lack of myelin over time), demyelination (degenerative loss of myelin) and dysmyelination (abnormally formed myelin). The clear distinction between demyelination and abnormal myelination is often rendered difficult before the first two years of life when the two processes can occur simultaneously [29].

Within the ZSS patients displaying a mild and severe phenotype, the disturbed function of peroxisomes is associated with brain white matter abnormalities that can be demyelinative and/or dysmyelinative [29]. All ZS patients have impaired myelination which appears to be primarily a hypomyelination [30]. In NALD patients, the progressive demyelination seen is diffuse and affects cerebral and cerebellar hemispheres. In IRD patients, myelination is abnormal, but there is no active demyelination. White matter may be morphologically normal in ZSS patients surviving the first year [31]. The severity of myelin abnormalities is correlated with the plasmalogen level in RCDP spectrum [32]. Indeed, no myelin abnormalities were seen in the patients with mild phenotype, and delay in supratentorial white matter myelination was observed in patients with the severe phenotype of both RCDP type 1 and 3. In DBPD patients, magnetic resonance imaging studies may show cerebral and cerebellar demyelination [33]. While demyelination in the peripheral nervous system is documented in Refsum disease patients, no myelin abnormalities have been evidence in the brain [29]. X-ALD is a severe *demyelinating* disease characterized by a progressive inflammatory demyelination in the brain, the progression being slower in the adolescent and adult forms compared to the childhood form [34]. The most frequent pattern is the characteristic symmetrical demyelination that occurs in the parieto-occipital region.

The lack of myelination seen in PBD and RCDP type 2 and 3 patients may result from the depletion of plasmalogen levels (major component of the normal myelin membrane). Abnormal myelination may also be due to VLCFA accumulation in membrane lipids. VLCFA are particularly enriched in myelin along with other specific lipids [35,36]. VLCFA may contribute to myelin stability and insulating properties. However, their excess is thought to physically destabilize myelin sheath [23,37] and/or become toxic for nervous cells in charge of myelin synthesis (oligodendrocytes) and brain survey (microglia) [38,39]. VLCFA accumulation is more pronounced in the center of X-ALD demyelination plaques, and is therefore suspected to initiate the destabilization of the myelin organization leading to cerebral demyelination [34]. Peroxisomes are found in all neural cell types and their abundance decreases from birth to adulthood. Alteration of peroxisomal functions in oligodendrocytes appears to be the main pathogenic factor leading to demyelination [34]. However, alteration of peroxisomal functions in other brain cell types may contribute to aggravate the pathological phenotype [40].

3.3. Inflammation

The part taken by peroxisomes in cytokinic inflammation was established in the 90s, on brain lesions of patients with X-ALD which revealed increased expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1, TNF-α) and ICAMs (Intercellular Adhesion Molecules) by astrocytes and microglial cells [41–43]. To understand the role of inflammation in X-ALD, the expression of inflammatory cytokines in different regions of brain with the childhood form has been investigated [44]. An increase of mRNA expression of different cytokines (IL-1α, IL-2, IL-3, IL-6, TNF-α, GM-CSF), chemokines (CCL2, -4, -7, -11, -21, -22, CXCL1, CX3CL1 and SDF-2) and iNOS was observed in the active edge of demyelinating plaques of the brain compared to normal looking area [44]. In addition, a spatial relationship between VLCFA accumulation and inflammation has been evidenced [44]. Similar observations were obtained in mutant mice where *Pex5* is selectively inactivated in oligodendrocytes with neuroinflammation characterized by an increase of pro-inflammatory (TNF-α, IFN-γ) and anti-inflammatory (IL-10) factors, and chemoattractants for lymphomononuclear cells (MIP-1α, MCP-1, MCP-5 and IP-10) [45]. In the mouse model with neural peroxisome dysfunction (*Nestin-Pex5* knock-out mice) or in *Pex1* mutant *Drosophila*, an induction of innate immunity was observed in brain with up regulation of pathways related to immune responses: transendothelial migration, antigen processing and presentation (C1q, subcomponent of classical complement system, is up-regulated in corpus callosum), cytokine–cytokine receptor interaction and toll-like receptor signaling pathways (TNF-α, TLR2 and Cxcl-1 up-regulated in corpus callosum before demyelination) [46,47]. In mice with peroxisome deficiency in neural cells (*Nestin-Pex5* $^{/}$), the innate immune system is early activated (3 weeks after birth), with strong and persistent inflammatory response [46]. Noteworthy, in X-ALD patients, a relationship between inflammation and oxidative stress has been suggested [48]. Indeed, some redox sensors can be present in key regulators of inflammation, for example NF-κB, which has redox-active cysteine residues, Nrf2. It was proposed that high levels of ROS release by neural cells (glial cells, neurons) may favor an inflammatory response [48].

Some studies also support that non cytokinic inflammation also depends on peroxisomal activity since 5-lipoxygenase (5-LOX) and cycloxygenase-2 (COX-2) are induced in *Abcd1*/*Abcd2*-silenced astrocytes [49]. Moreover, 5-LOX-derived leukotrienes were significantly elevated in all the areas of white matter in the brain of the cerebral form of X-ALD. Unlike COX-2 expression, which was moderately high only in the plaque area, expression of 5-LOX and cytosolic phospholipase A2 was prominent in all the areas [49].

In the three hit hypothesis it is suggested that oxidative stress triggers neuroinflammation contributing to cell death and demyelination [50].

4. Consequences of peroxisomal dysfunction at the cellular level

4.1. Oxidative stress

The disturbance of redox homeostasis is thought to initiate and/or amplify the progression of neurological diseases. Alterations of peroxisomal functions contribute by themselves to this stress but they have also consequences on the mitochondrial redox status

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

UNCORRECTED PROOF

[51]. These consequences on mitochondria are apparently not restricted to oxidative stress but would be also associated with bioenergetic and metabolic failure [48]. Oxidative damages have been documented in human X-ALD brain tissue with the childhood form: increase mRNA expression of iNOS [44] and presence of lipid peroxidation products (4-hydroxynonenal and malonedialdehyde) [52]. Oxidative stress can also be observed in the case of deletion of a single allele of the *Pex11β* gene in mice; this deletion in mice leads to oxidative damage of the nucleic acid and to an increase of manganese superoxide dismutase in cerebellum and neocortex [53]. In *Pex11β* $^{-/-}$ mice, a decrease in catalase is observed in neocortex [53]. In a mouse model of Zellweger syndrome (*Pex13* null mice), mitochondria-mediated oxidative stress in cultured cerebellar neurons and in cerebellum sections was also reported [54]. On murine oligodendrocyte 158N cells, by using siRNAs raised against *Abcd1* and *Acox1*, an increased overproduction of ROS and RNS potentiated by VLCFA was also observed [38,55]. Gene silencing leads to lipid peroxidation, enhanced accumulation of lipids, and induction of cell death.

4.2. Cell death

In pathologies involving peroxisome dysfunction in brain, VLCFA accumulation, oxidative stress and inflammation are associated with cell death. The type of cell death is not well characterized: necrosis or apoptosis are mentioned. Apoptosis (DNA ladder pattern and terminal deoxynucleotidyl transferase staining) associated with high level of ceramide and low level of GSH has been described in X-ALD brain [56]. In the brain of X-ALD patients with the cerebral phenotype, apoptosis mainly concerns oligodendrocytes with presence of activated-caspase-3 and fragmented DNA [57]. Apoptosis is observed in brain areas with microglial activation and can represent an early stage in lesion evolution in X-ALD disease [58]. However, Ito et al. [59] suggest the major mode of oligodendrocytic death in the brain of X-ALD patients is cytolysis, rather than apoptosis.

In a model of Zellweger syndrome (*Pex-13* null mice), neuronal cell death and mitochondria-mediated oxidative stress have been evidenced in cerebellum sections and in cultured cerebellar neurons [54]. Both in primary neuronal cultures from the neocortex and cerebellum of *Pex11β*$^{+/-}$ and *Pex11β* $^{-/-}$ mice and in the brain of these mice, neuronal cell death with typical characteristics of apoptosis is observed: caspase-3 activation, membrane leakage [53].

Several in vitro studies provided more information about the processes involved in cell death induced by VLCFA accumulation (C22:0, C24:0 and C26:0) on mixed primary culture of glial and neural cells [39]. This cell death is characterized by mitochondrial dysfunction and Ca^{2+} perturbation [39]. In murine 158N oligodendrocyte cells treated with VLCFA (C24:0; C26:0), no sign of apoptosis was observed [60] but mitochondrial depolarization associated with an overproduction of superoxide anions and a loss of lysosomal membrane integrity have been described [55]. Similar results were observed on human neuronal cells SK-N-BE treated with C22:0, C24:0 or C26:0 [61].

5. Potential role of peroxisomes in brain degeneration

5.1. Peroxisomes and aging

The implication of peroxisomes in cell aging and in the development and progression of specific age-related degenerative diseases is supported by the dysregulation of ROS and RNS- production occurring in these organelles [62].

Human patients suffering from an inherited deficiency of catalase (hypocatalasemia), face an increased risk of developing age-related diseases including diabetes, atherosclerosis, and cancer [63]. Furthermore, cells from hypocatalasemic patients accumulate hydrogen peroxide and harbor signs of age-associated pathologies [64]. In hypocatalasemic conditions, the ability of peroxisomes to import proteins, to regulate its growth and division and to process ROS is altered [65]. Moreover, catalase is suspected to play role in lifespan since longevity is positively impacted by reduced cellular oxidative stress [62]. When cells enter senescence (described as a loss of the ability of metabolically active cells to replicate), catalase is translocated from the peroxisomes to the cytosol. Since restoration of catalase into the peroxisomes slows down senescence, catalase may represent a

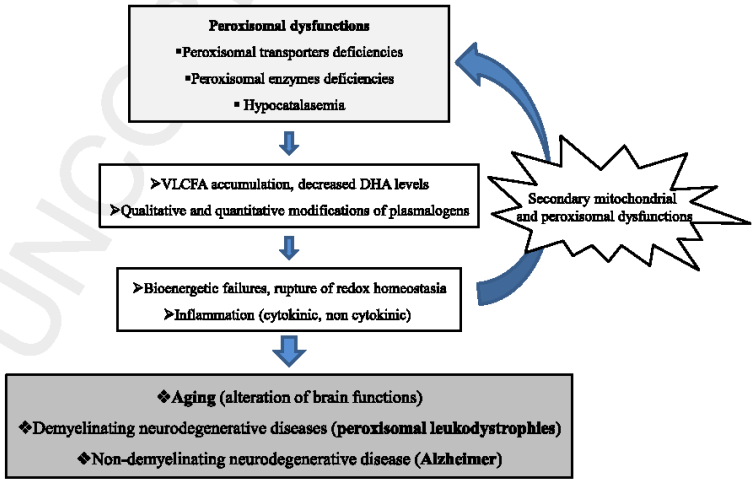


Fig. 2. Incidence of peroxisomal dysfunction on physiopathological events involved in neurodegeneration. The schematic illustrates that common factors resulting from peroxisomal dysfunctions can contribute to alteration of brain functions during aging and to the development of demyelinating and non-demyelinating diseases (peroxisomal leukodystrophies, Alzheimer's disease). Peroxisomal dysfunctions converge on a condition of bioenergetic failure, overproduction of ROS and activation of inflammatory processes. In turn, these events can contribute to amplify brain damages via secondary mitochondrial and peroxisomal dysfunctions. This hypothesis is in agreement with that suggested by Galea et al. [48].

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

UNCORRECTED PROOF

therapeutic target in the context of age-related diseases associated with oxidative stress [62]. Interestingly, the efficiency of the mitochondrial redox balance, a required condition to counteract aging processes, is perturbed in catalase-deficient cells and upon generation of excess ROS inside peroxisomes [51]. In addition, peroxisome life cycle may also be implicated in cellular aging. After peroxisome division, heterogeneous population of peroxisomes is observed in cells. Young and vital nascent organelles are present as well as old mature ones in which dysfunctional components accumulate due to damages caused by products of peroxisomal metabolism [66]. These old peroxisomes are eliminated by autophagy to maintain organelle homeostasis and to prevent accumulation of damaged peroxisomal compounds. Noteworthy, the deletion of the protein ATG1, required for autophagy, results in a significant increase in peroxisome numbers, accompanied with a decrease in cell viability in Hansenula polymorpha [67]. Moreover, in cells of advancing age, peroxisomal import of PTS1 proteins is reduced [68]. Collectively, a wide number of data support that peroxisomes are integrated into a system that governs cellular aging, and that peroxisomal dysfunctions might favor the occurrence of age-related diseases.

5.2. Peroxisomes and Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, characterized by progressive neurodegeneration, particularly affecting the hippocampal formation [69]. Impairment of cognitive and memory functions associated with accumulation of intracellular neurofibrillary tangles (NFT), extracellular amyloid β (Aβ) peptide plaques and synaptic loss are the main important characteristic of this disease [70]. Based on the decline of peroxisomal activities with age [71], peroxisomal dysfunctions associated with aging and dementia including decreased catalase activity [72], lower plasmalogen synthesis [73], and increased sensitivity to cell death, especially necrosis [74,75], might also favor neurodegenerative diseases such as AD [76,77].

The first evidence of the potential role of peroxisomes in the development of AD was established on primary rat hippocampal neuron cultures. In these cells, peroxisomal proliferation, induced by Wy-14.463, which is a potent peroxisome proliferator-activated receptor α agonist, was shown to protect against cell death induced by the Aβ peptide [78]. Moreover, on the Tg2576 mouse model of AD, significant peroxisome alterations were observed in the absence of apparent neuroanatomical or cytological signs of the disease [79]. In a transgenic mouse model, harboring the human Swedish familial AD mutation, the expression of ABCD3 and ACOX-1 was found induced, possibly reflecting the need for efficient fatty acid β-oxidation, as a compensatory response to mitochondrial dysfunctions [80]. In rat, impaired peroxisome activity triggered by thioridazine also favors increased amyloid precursor protein (APP) and β-secretase (BACE1) expression and Aβ generation at least partially by enhancing the VLCFA concentration [81].

In addition, substantial peroxisome-related alterations, which may contribute to the progression of AD pathology, were reported in humans. Several studies described a reduction of ethanolamine plasmalogen and choline plasmalogen levels in brain regions and erythrocyte of AD patients; this reduction was positively correlated with disease severity [82,83]. Moreover, based on the neuropathological Braak staging for AD, in stage V–VI patients, increased levels of C22:0 and VLCFA (C24:0, C26:0), which are specific substrates of peroxisomal β-oxidation, a decrease of plasmalogens, an increased peroxisome volume density in neuronal cells and a decreased peroxisome number in neurites in AD brain were reported [84]. A reduction of DHA level was also observed in brain and liver of AD patients [85].

These results strengthen the hypothesis of the involvement of peroxisomal dysfunctions in the physiopathology of AD. Altogether, these data support a potential role of peroxisomes in neurodegeneration (Fig. 2).

References

[1] M. Islinger, S. Grille, H.D. Fahimi, M. Schrader, The peroxisome: an update on mysteries, Histochem. Cell Biol. 137 (2012) 547–574.
[2] N. Troffer-Charlier, N. Doerflinger, E. Metzger, F. Fouquet, J.L. Mandel, P. Aubourg, Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines, Eur. J. Cell. Biol. 75 (1998) 254–264.
[3] M. Schrader, M. Thiemann, H.D. Fahimi, Peroxisomal motility and interaction with microtubules, Microsc. Res. Tech. 61 (2003) 171–178.
[4] J. Mathur, N. Mathur, M. Hulskamp, Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants, Plant Physiol. 128 (2002) 1031–1045.
[5] M. Fransen, M. Nordgren, B. Wang, O. Apanasets, Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease, Biochim. Biophys. Acta 1822 (2012) 1363–1373.
[6] R.J. Wanders, H.R. Waterham, Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited, Annu. Rev. Biochem. 75 (2006) 295–332.
[7] R.S. Chapkin, W. Kim, J.R. Lupton, D.N. McMurray, Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 81 (2009) 187–191.
[8] S. Ferdinandusse, S. Denis, P.A. Mooijer, Z. Zhang, J.K. Reddy, A.A. Spector, R.J. Wanders, Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid, J. Lipid Res. 42 (2001) 1987–1995.
[9] N. Salem Jr., B. Litman, H.Y. Kim, K. Gawrisch, Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system, Lipids 36 (2001) 945–959.
[10] A.A. Farooqui, n-3 fatty acid-derived lipid mediators in the brain: new weapons against oxidative stress and inflammation, Curr. Med. Chem. 19 (2012) 532–543.
[11] A.A. Farooqui, L.A. Horrocks, T. Farooqui, Modulation of inflammation in brain: a matter of fat, J. Neurochem. 101 (2007) 577–599.
[12] S.I. Rapoport, M. Igarashi, F. Gao, Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 82 (2010) 273–276.
[13] P. Brites, H.R. Waterham, R.J. Wanders, Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease, Biochim. Biophys. Acta 1636 (2004) 219–231.
[14] H. Hayashi, M. Hara, 1-Alkenyl group of ethanolamine plasmalogen derives mainly from de novo-synthesized fatty alcohol within peroxisomes, but not extraperoxisomal fatty alcohol or fatty acid, J. Biochem. 121 (1997) 978–983.
[15] N.E. Braverman, A.B. Moser, Functions of plasmalogen lipids in health and disease, Biochim. Biophys. Acta 1822 (2012) 1442–1452.
[16] P.A. Loughran, D.B. Stolz, S.R. Barrick, D.S. Wheeler, P.A. Friedman, R.A. Rachubinski, S.C. Watkins, T.R. Billiar, PEX7 and EBP50 target iNOS to the peroxisome in hepatocytes, Nitric Oxide 31 (2013) 9–19.
[17] L.A. Del Rio, Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules, Arch. Biochem. Biophys. 506 (2011) 1–11.
[18] H.R. Waterham, M.S. Ebberink, Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders, Biochim. Biophys. Acta 1822 (2012) 1430–1441.
[19] S.J. Steinberg, G. Dodt, G.V. Raymond, N.E. Braverman, A.B. Moser, H.W. Moser, Peroxisome biogenesis disorders, Biochim. Biophys. Acta 1763 (2006) 1733–1748.
[20] R. Wilson, J.R. Sargent, Lipid and fatty acid composition of brain tissue from adrenoleukodystrophy patients, J. Neurochem. 61 (1993) 290–297.
[21] F. Geillon, D. Trompier, C. Gondcaille, G. Lizard, S. Savary, Peroxisomal ABC transporters and X-linked adrenoleukodystrophy, Med. Sci. (Paris) 28 (2012) 1087–1094.
[22] C. Wiesinger, M. Kunze, G. Regelsberger, S. Forss-Petter, J. Berger, Impaired very long-chain acyl-CoA beta-oxidation in human X-linked adrenoleukodystrophy fibroblasts is a direct consequence of ABCD1 transporter dysfunction, J. Biol. Chem. 288 (2013) 19269–19279.
[23] J.M. Powers, H.W. Moser, Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis, Brain Pathol. 8 (1998) 101–120.
[24] P.L. Faust, D. Banka, R. Siriratsivawong, V.G. Ng, T.M. Wikander, Peroxisome biogenesis disorders: the role of peroxisomes and metabolic dysfunction in developing brain, J. Inherit. Metab. Dis. 28 (2005) 369–383.
[25] S. Ferdinandusse, S. Denis, P.A. Mooyer, C. Dekker, M. Duran, R.J. Soorani-Lunsing, E. Boltshauser, A. Macaya, J. Gartner, C.B. Majoie, P.G. Barth, R.J. Wanders, B.T. Poll-The, Clinical and biochemical spectrum of D-bifunctional protein deficiency, Ann. Neurol. 59 (2006) 92–104.
[26] W.E. Kaufmann, C. Theda, S. Naidu, P.A. Watkins, A.B. Moser, H.W. Moser, Neuronal migration abnormality in peroxisomal bifunctional enzyme defect, Ann. Neurol. 39 (1996) 268–271.
[27] R.I. Kelley, N.S. Datta, W.B. Dobyns, A.K. Hajra, A.B. Moser, M.J. Noetzel, E.H. Zackai, H.W. Moser, Neonatal adrenoleukodystrophy: new cases, biochemical studies, and differentiation from Zellweger and related peroxisomal polydystrophy syndromes, Am. J. Med. Genet. 23 (1986) 869–901.

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

[28] A. Janssen, P. Gressens, M. Grabenbauer, E. Baumgart, A. Schad, I. Vanhorebeek, A. Brouwers, P.E. Declercq, D. Fahimi, P. Evrard, L. Schoonjans, D. Collen, P. Carmeliet, G. Mannaerts, P. Van Veldhoven, M. Baes, Neuronal migration depends on intact peroxisomal function in brain and in extra-neuronal tissues, J. Neurosci. 23 (2003) 9732–9741.
[29] M. Baes, P. Aubourg, Peroxisomes, myelination, and axonal integrity in the CNS, Neuroscientist 15 (2009) 367–379.
[30] A.J. Barkovich, W.W. Peck, MR of Zellweger syndrome, AJNR Am. J. Neuroradiol. 18 (1997) 1163–1170.
[31] P.G. Barth, C.B. Majoie, J. Gootjes, R.J. Wanders, H.R. Waterham, M.S. van der Knaap, J.B. de Klerk, J. Smeitink, B.T. Poll-The, Neuroimaging of peroxisome biogenesis disorders (Zellweger spectrum) with prolonged survival, Neurology 62 (2004) 439–444.
[32] A.M. Bams-Mengerink, C.B. Majoie, M. Duran, R.J. Wanders, J. Van Hove, C.D. Scheurer, P.G. Barth, B.T. Poll-The, MRI of the brain and cervical spinal cord in rhizomelic chondrodysplasia punctata, Neurology 66 (2006) 798–803.
[33] S. Ferdinandusse, M.S. Ylianttila, J. Gloerich, M.K. Koski, W. Oostheim, H.R. Waterham, J.K. Hiltunen, R.J. Wanders, T. Glumoff, Mutational spectrum of D-bifunctional protein deficiency and structure-based genotype-phenotype analysis, Am. J. Hum. Genet. 78 (2006) 112–124.
[34] D. Trompier, S. Savary, X-linked Adrenoleukodystrophy, Morgan & Claypool Life Sciences, vol. 2, 2013, pp. 1–134.
[35] R. Chrast, G. Saher, K.A. Nave, M.H. Verheijen, Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models, J. Lipid Res. 52 (2011) 419–434.
[36] N. Baumann, D. Pham-Dinh, Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system, Physiol. Rev. 81 (2001) 871–927.
[37] J.K. Ho, H. Moser, Y. Kishimoto, J.A. Hamilton, Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy, J. Clin. Invest. 96 (1995) 1455–1463.
[38] M. Baarine, P. Andreoletti, A. Athias, T. Nury, A. Zarrouk, K. Ragot, A. Vejux, J.M. Riedinger, Z. Kattan, G. Bessede, D. Trompier, S. Savary, M. Cherkaoui-Malki, G. Lizard, Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid – treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins, Neuroscience 213 (2012) 1–18.
[39] S. Hein, P. Schonfeld, S. Kahlert, G. Reiser, Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture, Hum. Mol. Genet. 17 (2008) 1750–1761.
[40] A. Bottelbergs, S. Verheijden, L. Hulshagen, D.H. Gutmann, S. Goebbels, K.A. Nave, C. Kassmann, M. Baes, Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes, Glia 58 (2010) 1532–1543.
[41] J.M. Powers, Y. Liu, A.B. Moser, H.W. Moser, The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 51 (1992) 630–643.
[42] M.C. McGuinness, D.E. Griffin, G.V. Raymond, C.A. Washington, H.W. Moser, K.D. Smith, Tumor necrosis factor-alpha and X-linked adrenoleukodystrophy, J. Neuroimmunol. 61 (1995) 161–169.
[43] J.M. Powers, The pathology of peroxisomal disorders with pathogenetic considerations, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54 (1995) 710–719.
[44] A.S. Paintlia, A.G. Gilg, M. Khan, A.K. Singh, E. Barbosa, I. Singh, Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies, Neurobiol. Dis. 14 (2003) 425–439.
[45] C.M. Kassmann, C. Lappe-Siefke, M. Baes, B. Brugger, A. Mildner, H.B. Werner, O. Natt, T. Michaelis, M. Prinz, J. Frahm, K.A. Nave, Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes, Nat. Genet. 39 (2007) 969–976.
[46] A. Bottelbergs, S. Verheijden, P.P. Van Veldhoven, W. Just, R. Devos, M. Baes, Peroxisome deficiency but not the defect in ether lipid synthesis causes activation of the innate immune system and axonal loss in the central nervous system, J. Neuroinflamm. 9 (2012) 61.
[47] F.D. Mast, J. Li, M.K. Virk, S.C. Hughes, A.J. Simmonds, R.A. Rachubinski, A Drosophila model for the Zellweger spectrum of peroxisome biogenesis disorders, Dis. Model Mech. 4 (2011) 659–672.
[48] E. Galea, N. Launay, M. Portero-Otin, M. Ruiz, R. Pamplona, P. Aubourg, I. Ferrer, A. Pujol, Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: a paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? Biochim. Biophys. Acta 1822 (2012) 1475–1488.
[49] M. Khan, J. Singh, A.G. Gilg, T. Uto, I. Singh, Very long-chain fatty acid accumulation causes lipotoxic response via 5-lipoxygenase in cerebral adrenoleukodystrophy, J. Lipid Res. 51 (2010) 1685–1695.
[50] I. Singh, A. Pujol, Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis, Brain Pathol. 20 (2010) 838–844.
[51] O. Ivashchenko, P.P. Van Veldhoven, C. Brees, Y.S. Ho, S.R. Terlecky, M. Fransen, Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk, Mol. Biol. Cell 22 (2011) 1440–1451.
[52] J.M. Powers, Z. Pei, A.K. Heinzer, R. Deering, A.B. Moser, H.W. Moser, P.A. Watkins, K.D. Smith, Adreno-leukodystrophy: oxidative stress of mice and men, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 64 (2005) 1067–1079.
[53] B. Ahlemeyer, M. Gottwald, E. Baumgart-Vogt, Deletion of a single allele of the Pex11beta gene is sufficient to cause oxidative stress, delayed differentiation and neuronal death in mouse brain, Dis. Model Mech. 5 (2012) 125–140.
[54] C.C. Muller, T.H. Nguyen, B. Ahlemeyer, M. Meshram, N. Santrampurwala, S. Cao, P. Sharp, P.B. Fietz, E. Baumgart-Vogt, D.I. Crane, PEX13 deficiency in mouse brain as a model of Zellweger syndrome: abnormal cerebellum formation, reactive gliosis and oxidative stress, Dis. Model Mech. 4 (2011) 104–119.
[55] M. Baarine, K. Ragot, A. Athias, T. Nury, Z. Kattan, E.C. Genin, P. Andreoletti, F. Menetrier, J.M. Riedinger, M. Bardou, G. Lizard, Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF-alpha on oligodendrocytes and astrocytes, Neurotoxicology 33 (2012) 212–228.
[56] I. Singh, K. Pahan, M. Khan, A.K. Singh, Cytokine-mediated induction of ceramide production is redox-sensitive. Implications to proinflammatory cytokine-mediated apoptosis in demyelinating diseases, J. Biol. Chem. 273 (1998) 20354–20362.
[57] V. Feigenbaum, A. Gelot, P. Casanova, C. Daumas-Duport, P. Aubourg, M. Dubois-Dalcq, Apoptosis in the central nervous system of cerebral adrenoleukodystrophy patients, Neurobiol. Dis. 7 (2000) 600–612.
[58] F.S. Eichler, J.Q. Ren, M. Cossoy, A.M. Rietsch, S. Nagpal, A.B. Moser, M.P. Frosch, R.M. Ransohoff, Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? Ann. Neurol. 63 (2008) 729–742.
[59] M. Ito, B.M. Blumberg, D.J. Mock, A.D. Goodman, A.B. Moser, H.W. Moser, K.D. Smith, J.M. Powers, Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adreno-leukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 60 (2001) 1004–1019.
[60] E. Kahn, M. Baarine, A. Dauphin, K. Ragot, N. Tissot, A. Seguin, F. Menetrier, Z. Kattan, C.M. Bachelet, F. Frouin, G. Lizard, Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via LAURDAN and FAMIS spectral image analysis, Cytometry A 79 (2011) 293–305.
[61] A. Zarrouk, A. Vejux, T. Nury, H.I. El Hajj, M. Haddad, M. Cherkaoui-Malki, J.M. Riedinger, M. Hammami, G. Lizard, Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E), Oxid. Med. Cell. Longev. 2012 (2012) 623257.
[62] C.R. Giordano, S.R. Terlecky, Peroxisomes, cell senescence, and rates of aging, Biochim. Biophys. Acta 1822 (2012) 1358–1362.
[63] L. Goth, J.W. Eaton, Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes, Lancet 356 (2000) 1820–1821.
[64] C.S. Wood, J.I. Koepke, H. Teng, K.K. Boucher, S. Katz, P. Chang, L.J. Terlecky, I. Papanayotou, P.A. Walton, S.R. Terlecky, Hypocatalasemic fibroblasts accumulate hydrogen peroxide and display age-associated pathologies, Traffic 7 (2006) 97–107.
[65] J.I. Koepke, C.S. Wood, L.J. Terlecky, P.A. Walton, S.R. Terlecky, Progeric effects of catalase inactivation in human cells, Toxicol. Appl. Pharmacol. 232 (2008) 99–108.
[66] A. Beach, M.T. Burstein, V.R. Richard, A. Leonov, S. Levy, V.I. Titorenko, Integration of peroxisomes into an endomembrane system that governs cellular aging, Front. Physiol. 3 (2012) 283.
[67] E.B. Aksam, A. Koek, J.A. Kiel, S. Jourdan, M. Veenhuis, I.J. van der Klei, A peroxisomal lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of Hansenula polymorpha cells, Autophagy 3 (2007) 96–105.
[68] J.E. Legakis, J.I. Koepke, C. Jedeszko, F. Barlaskar, L.J. Terlecky, H.J. Edwards, P.A. Walton, S.R. Terlecky, Peroxisome senescence in human fibroblasts, Mol. Biol. Cell 13 (2002) 4243–4255.
[69] M.W. Marlatt, P.J. Lucassen, Neurogenesis and Alzheimer's disease: biology and pathophysiology in mice and men, Curr. Alzheimer Res. 7 (2010) 113–125.
[70] H.W. Querfurth, F.M. LaFerla, Alzheimer's disease, N. Engl. J. Med. 362 (2010) 329–344.
[71] V.I. Titorenko, S.R. Terlecky, Peroxisome metabolism and cellular aging, Traffic 12 (2011) 252–259.
[72] D.L. Marcus, C. Thomas, C. Rodriguez, K. Simberkoff, J.S. Tsai, J.A. Strafaci, M.L. Freedman, Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease, Exp. Neurol. 150 (1998) 40–44.
[73] D.B. Goodenowe, L.L. Cook, J. Liu, Y. Lu, D.A. Jayasinghe, P.W. Ahiahonu, D. Heath, Y. Yamazaki, J. Flax, K.F. Krenitsky, D.L. Sparks, A. Lerner, R.P. Friedland, T. Kudo, K. Kamino, T. Morihara, M. Takeda, P.L. Wood, Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia, J. Lipid Res. 48 (2007) 2485–2498.
[74] S. Manivannan, C.Q. Scheckhuber, M. Veenhuis, I.J. van der Klei, The impact of peroxisomes on cellular aging and death, Front. Oncol. 2 (2012) 50.
[75] J. Lopez-Erauskin, I. Ferrer, E. Galea, A. Pujol, Cyclophilin D as a potential target for antioxidants in neurodegeneration: the X-ALD case, Biol. Chem. 394 (2013) 621–629.
[76] S.R. Terlecky, J.I. Koepke, P.A. Walton, Peroxisomes and aging, Biochim. Biophys. Acta 1763 (2006) 1749–1754.
[77] G. Lizard, O. Rouaud, J. Demarquoy, M. Cherkaoui-Malki, L. Iuliano, Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type, J. Alzheimers Dis. 29 (2012) 241–254.
[78] M.J. Santos, R.A. Quintanilla, A. Toro, R. Grandy, M.C. Dinamarca, J.A. Godoy, N.C. Inestrosa, Peroxisomal proliferation protects from beta-amyloid neurodegeneration, J. Biol. Chem. 280 (2005) 41057–41068.
[79] A. Cimini, S. Moreno, M. D'Amelio, L. Cristiano, B. D'Angelo, S. Falone, E. Benedetti, P. Carrara, F. Fanelli, F. Cecconi, F. Amicarelli, M.P. Ceru, Early

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes, J. Alzheimers Dis. (2009).

[80] F. Fanelli, S. Sepe, M. D'Amelio, C. Bernardi, L. Cristiano, A. Cimini, F. Cecconi, M.P. Ceru, S. Moreno, Age-dependent roles of peroxisomes in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, Mol. Neurodegener. 8 (2013) 8.

[81] R. Shi, Y. Zhang, Y. Shi, S. Shi, L. Jiang, Inhibition of peroxisomal beta-oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and Abeta generation in the rat brain, Neurosci. Lett. 528 (2012) 6–10.

[82] M. Igarashi, K. Ma, F. Gao, H.W. Kim, S.I. Rapoport, J.S. Rao, Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex, J. Alzheimers Dis. 24 (2011) 507–517.

[83] P.L. Wood, R. Mankidy, S. Ritchie, D. Heath, J.A. Wood, J. Flax, D.B. Goodenowe, Circulating plasmalogen levels and Alzheimer disease assessment scale-cognitive scores in Alzheimer patients, J. Psychiatry Neurosci. 35 (2010) 59–62.

[84] J. Kou, G.G. Kovacs, R. Hoftberger, W. Kulik, A. Brodde, S. Forss-Petter, S. Honigschnabl, A. Gleiss, B. Brugger, R. Wanders, W. Just, H. Budka, S. Jungwirth, P. Fischer, J. Berger, Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease, Acta Neuropathol. 122 (2011) 271–283.

[85] G. Astarita, K.M. Jung, N.C. Berchtold, V.Q. Nguyen, D.L. Gillen, E. Head, C.W. Cotman, D. Piomelli, Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease, PLoS One 5 (2010) e12538.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: D. Trompier, et al., Brain peroxisomes, Biochimie (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

Cytometry, Part A

Characterization of Actin and Microtubule Interaction in C24:0 – treated SK-N-BE cells after Staining with Rhodamine Phalloidin and Tubulin Tracker Green by FRET Monophoton Spectral Imaging Confocal Microscopy

Journal:	*Cytometry: Part A*
Manuscript ID:	13-151
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	20-Sep-2013
Complete List of Authors:	Kahn, Edmond; INSERM, U678 UMR-S UPMC Zarrouk, Amira; Inserm, EA7270 / INSERM Nury, Thomas; Inserm, EA7270 / INSERM Dauphin, Aurelien; UPMC, PICPS Frere, Perrine; UPMC, PICPS Riedinger, Jean-Marc; Centre de Lutte contre le Cancer, Biologie Médicale Bachelet, Claude-Marie; UPMC, Plateforme d'Imagerie Cellulaire Frouin, Frédérique; INSERM, U678 UMR-S UPMC Hammami, Mohamed; Université de Monastir, LR12ES05 LIZARD, GERARD; Inserm, Inserm U866
Key Words:	Actin, C24:0, confocal microscopy, FRET, microtubule, Rhodamine-Phalloidine, Tubulin Tracker, very long chain fatty acid

SCHOLARONE™
Manuscripts

Characterization of Actin and Microtubule Interaction in C24:0 – treated SK-N-BE cells after Staining with Rhodamine Phalloidin and Tubulin Tracker Green by FRET Monophoton Spectral Imaging Confocal Microscopy

Edmond Kahn,[1*] Amira Zarrouk,[2,3*] Thomas Nury,[2] Aurélien Dauphin,[4] Perrine Frere,[4] Jean-Marc Riedinger,[5] Claude-Marie Bachelet,[4] Frédérique Frouin,[1] Mohamed Hammami,[3] Gérard Lizard,[2*]

[1] INSERM U678 / UMR - S UPMC, IFR 14, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie – CHU Pitié Salpétrière, 91 Bd de l'Hôpital 75634 Paris Cedex 13, France

[2] Université de Bourgogne, Equipe 'Biochimie du peroxysome, inflammation et métabolisme lipidique'EA7270 / INSERM, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

[3] Université de Monastir, Faculté de Médecine, LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition - Functional Food & Vascular Health', Avenue Avicenne, Monastir, Tunisia

[4] Plateforme d'Imagerie Cellulaire de la Pitié Salpêtrière, UPMC, 47 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

[5] Centre de Lutte Contre le Cancer GF Leclerc, Laboratoire de Biologie Médicale, Dijon, France

Correspondence to: Dr Edmond Kahn (for confocal microscopy), INSERM U678/UMR-S UPMC, CHU Pitié- Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13, France. and Dr Gérard Lizard (for cell biology and flow cytometry), Laboratoire BIO-peroxIL, EA7270 / INSERM, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France
(kahn@imed.jussieu.fr ; gerard.lizard@u-bourgogne.fr)

* Edmond Kahn, Amira Zarrouk and Gérard Lizard made equal contribution to this work

For Peer Review

Abstract

Human neuronal cells SK-N-BE were used to evaluate the impact of tetracosanoic acid (C24:0) on cell viability and on expression, topography, clustering and interaction of cytoskeleton proteins (actin and tubulin). Indeed, disorganization of the cytoskeleton of neuronal cells can have major consequences on their functions including peroximal activity and transferring of neurotransmitters via the microtubules network. To emphasize the impact of C24:0 on actin and tubulin, human neuronal cells SK-N-BE were treated with C24:0 (from 0.1 to 20 µM; 48 h). Mitochondrial dysfunctions and cell death induction were observed under treatment with C24:0 after staining with $DiOC_6(3)$ and propidium iodide, respectively. No sign of apoptosis was detected after nuclei staining with Hoechst 33342 or by transmission electron microscopy. To determine the effects on the cytoskeleton, microscopical, flow cytometric and biochemical methods were used. By conventional fluorescence microscopy a cell size reduction associated with cell shape modifications and perinuclear condensation of actin and tubulin was observed. By flow cytometry, after staining with Rhodamine-Phalloidin and with an antibody raised against α/β tubulin, modifications of F-actin and α/β tubulin levels were detected. By western blotting, lower levels of α-tubulin were found whereas no modification of β-actin was observed. In C24:0-treated cells, spectral analysis provided by confocal microscopy proved the existence of FRET when actin and tubulin are stained with Tubulin Tracker (Oregon Green: donor) and Rhodamine-Phalloidin (Rhodamine: acceptor). No FRET was observed in untreated cells. These data demonstrated actin and tubulin colocalization/interaction under treatment with C24:0. Therefore, our data established the possibility to state actin and tubulin interaction after staining with Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker with the simultaneous use of FRET Monophoton Spectral Imaging Confocal

For Peer Review

Microscopy. Moreover, available spectral imaging processing (FAMIS) provided visualization of such a colocalization.

- **Key terms**

Actin; C24:0; confocal microscopy; FRET; microtubule; Rhodamine-Phalloidin; Tubulin Tracker; very long chain fatty acid.

For Peer Review

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD; OMIM # 104300) is the most common cause of dementia among neurodegenerative diseases in the elderly population. Its impact and cost are predicted to increase due to the increasing life expectancy and average age (1). Hence it is estimated that the number of AD patients will double every 20 years (2), it is important to make the etiology of the disease more precise in order to develop efficient treatments. Currently, it is well admitted that the initiating event in AD is related to the excessive production of β-amyloid (Aβ) peptides constituting the senile plaques in the brain (3, 4). In the presence of amyloidogenic Aβ peptides, a cascade of toxic events is activated including a hyperphosphorylation of tau, a neural associated protein involved in microtubules stabilization contributing in microtubule dynamics and axonal transport (5, 6). The pathogenic hyperphosphorylated form of tau, which is a major component of neurofibrillary tangles, favors a disorganization of microtubules (7). As clinical symptoms are more closely related to neurofibrillary tangles than to senile plaque formation (8), it is of interest to identify the molecules capable to favor microtubule disorganization.

Regarding the decline of peroxisomal function with age (9), which can affect lipid and oxidative stress homoeostasia (10, 11), it is suggested that peroxisome can play a critical part in regulating cellular aging and in the development of neurodegenerative diseases, including AD (12). In agreement with this hypothesis, some lipid modifications resulting from peroxisomal dysfunctions are observed in the brain of Alzheimer patients: reduced levels of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) and plasmalogens, and increased levels of C22:0 and very long chain fatty acids (VLCFA: C24:0 and C26:0) (13). Moreover, treatment of hippocampal neurons with the peroxisome proliferator Wy-14.463 is able to prevent the neuronal cell death and neurotic network loss induced by the Aβ peptide (14). In addition, in the cerebral cortex of rats treated with thioridazine, a selective peroxisomal β-oxidation

For Peer Review

inhibitor, the following events are observed: VLCFA accumulation, increased in Aβ40 content and APP mRNA expression (15). A correlation analysis also shows that the Aβ40 levels are positively correlated with the cortex C24:0 and C26:0 levels (15). In the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease (Tg2576 mouse model of AD), early biochemical and morphological modifications also support a part for peroxisomes (16). In the hippocampus of these transgenic mice, harboring the human Swedish familial AD mutation, the peroxisomal membrane protein of ABCD3 and ACOX1 are induced, possibly reflecting the need for efficient fatty acid β-oxidation, as a compensatory response to mitochondrial dysfunctions (17). In human, lipid analyses of cortical regions from patients with AD reveal accumulation of C22:0, C24:0, and C26:0, three substrates for peroxisomal *β*-oxidation, in patients with stages V and VI pathology compared with those modestly affected (stages I and II) based on the neuropathological Braak & Braak staging for AD (18). Therefore, as a consequence of peroxisomal dysfunctions, accumulation of VLCFA in the cortex of AD patients can favor neuronal alterations.

On glial and neuronal cells (19, 20, 21), we previously reported that VLCFA are able to trigger mitochondrial dysfunctions and oxidative stress associated with cell death which are considered as important events contributing to the development of AD (22, 23, 24). Therefore, as various fatty acids are also able to favor important disorganization of the cytoskeleton (25, 26, 27, 28), we ask whether a similar effect can also occur in the presence of VLCFA on neuronal cells. In the context of AD, microtubules (constituted of α- and β-tubulin subunits) and actin microfilaments, which are major filaments of the cytoskeleton of neurons contributing to organelle trafficking and to the transport of neurotransmitters (29, 30), are frequently altered (31). The structure of the paired helical filament from tangles analyzed by electron microscopy has been shown to contain disorganized microtubules associated with tau protein under its hyperphosphorylated form (32). Moreover, Hirano bodies, which are

For Peer Review

eosinophilic intracellular aggregates composed of actin and actin-associated proteins (33, 34), can be identified in the hippocampal CA1 region of patients with AD (35). It is therefore of interest to determine whether VLCFA can induce microtubules and actin modifications, and consequently contribute to the formation of characteristic lesions of AD, neurofibrillary tangles, neuritic plaques, and Hirano bodies which are sites of accumulation of abnormal fibrillar material (36). In this context, to evaluate the impact of lipids, such as VLCFA, on microtubule and actin organization, there is a need to develop appropriate cytometric methods. Indeed, whereas microtubule and actin expression can be studied by various conventional methods of biochemistry and flow cytometry, microscopical methods are required to determine the impact of various compounds on the cytoskeleton organization and especially the interaction between microtubules and actin microfilaments. As various fluorescent tools are available to stain microtubules and actin filaments, the interaction between these microfilaments inside cells can be determined by fluorescence resonance energy transfer （FRET) by means of spectral sequences of images obtained by confocal laser scanning microscopy (CLSM). FRET is currently a major technique for interaction analysis as mentioned in recent reviews which describe several methods to apply it, and provide their strengths and limitations, and avoiding pitfalls for using them (37, 38). Indeed, FRET is a distance-dependent interaction between two fluorescent molecules where excitation is transferred from a donor molecule to an acceptor molecule (39, 40). It thus provides a complementary tool to point out possible colocalizations of stained molecules. These conditions enable us to characterize the possible action of various molecules, including lipids, on the cytoskeleton organization. These conditions enabled us to determine the effects and the interactions of 7-Ketocholesterol (7KC) with cellular lipids stained with Nile Red during 7KC-induced apoptosis (41, 42). Characterization of FRET can be performed by means of spectral signatures of fluorochromes, which show different spectra emissions when excitation

For Peer Review

of the donor has an effect or has no effect on the acceptor. It can also be shown by means of a fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) on the acceptor in a selected region (43). Such an action increases the intensity of the donor when FRET is involved. In the case of spectral observations in which emissions of fluorochromes are collected via image sequences, factor analysis of medical image sequences (FAMIS) can be used to unmix sequences and provide factor curves and images of fluorescent structures inside cells when necessary (44).

In the present study, we focus on the activity of tetracosanoic acid (C24:0) which is found at higher concentrations than C22:0 and C26:0 in the plasma and tissues of patients with peroxisomopathies (most often rare genetic diseases associated with peroxisome deficiency or peroxisomal dysfunctions) (20, 45), and which has also been detected at increased levels in the plasma and cortex of patients with AD (18, 21). This fatty acid has pronounced side effects (mitochondrial depolarization, overproduction of reactive oxygen species, cell death induction) on various neural cells (19, 20, 21). To provide precisions on the impact of C24:0 on the cytoskeleton, different complementary microscopical, flow cytometric and biochemical methods are used. We bring evidence that the combined use of Tubulin Tracker, Rhodamine-Phalloidin and FRET confocal fluorescence microscopy associated with FAMIS (44) which unmixes emissions of fluorochromes in stained samples can constitute a useful method to evaluate the cytoskeleton disorganization and modification of interactions between microtubules and actin, especially.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Cell Treatments

Human neuronal cells (SK-N-BE) were seeded at 400,000 cells per well in 12 wells microplates containing 1 mL of culture medium (or at 800,000 cells per well in 6 wells

For Peer Review

microplates containing 2 mL of culture medium) constituted by Dulbecco's modified Eagle medium with L-Glutamine (DMEM) (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) (Pan Biotech). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2, and passaged twice a week. At each passage, SK-N-BE cells were trypsinized with a (0.05% trypsin-0.02% EDTA) solution (Pan Biotech).

Tetracosanoic acid (C24:0) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was solubilized in α-cyclodextrin (Sigma-Aldrich) as previously described (46). The conditions of treatment with C24:0 were the following: after plating SK-N-BE cells for 24 h, the cells were further treated for 48 h with various C24:0 concentrations (0.1, 1, 5, 10, and/or 20 µM) in HAM's F-10 medium (Pan Biotech). The maximal final concentration of α-cyclodextrin (vehicle) in the culture medium was 1 mg/mL when C24:0 is used at 20 µM (19).

Analysis of cell morphology by phase contrast microscopy

Cell morphology of SK-NB-E cells was observed after 48 h of culture in the absence or the presence of fatty acids (C24:0: 0.1, 1, 5, 10, and 20 μM) under an inverted-phase contrast microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Digitized images were obtained with a camera (Axiocam ICm1, Zeiss).

Flow cytometric measurement of cells with depolarized mitochondria with $DiOC_6(3)$

Variations of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured with 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$) (Life Technologies, St Aubin, France), which allows the percentage of cells with low $\Delta\Psi_m$ (cells with depolarized mitochondria) to be determined. To this end, adherent and non-adherent cells were pooled, and stained with

For Peer Review

$DiOC_6(3)$. With this fluorochrome, mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in green fluorescence collected through a 520/10 nm band pass filter. $DiOC_6(3)$ was used at a 40 nM (47). Flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec, Münster, Germany) equipped with a 488 nm blue laser. Ten thousand cells were acquired for each sample. Data were analyzed with Flomax software (Partec) or FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, USA).

Flow cytometric quantification of dead cells by staining with propidium iodide

Adherent and non-adherent cells were pooled and stained with propidium iodide (PI; 5 µg/mL, 5 min), which enters dead cells only (48). The cells were then immediately analyzed with a Galaxy flow cytometer (Partec). Red fluorescence of PI was detected through a 625 ± 20 nm band-pass filter, and fluorescent signals were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired, and data were analyzed with Flomax software (Partec) or FlowJo software (Tree Star Inc.).

Morphological characterization of cell death by nuclei staining with Hoechst 33342

Nuclear morphology was characterized by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 (1 µg/mL) (49). Cell deposits of about 40,000 cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,500 rpm) with a cytospin 2 (Shandon, Cheshire, UK), mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark) and stored in the dark at 4°C until observation. The morphological aspect of the cell nuclei allowing distinguishing between viable, apoptotic and necrotic cells was determined with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany). Viable cells are characterized by round and regular nuclei. Apoptotic cells are characterized by condensed and/or fragmented nuclei, and

For Peer Review

necrotic cells, by nuclei with irregular sizes and shapes (49). For each sample, 300 cells were examined.

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy is a valuable tool for characterizing various cytotoxic effects (49). It was used to visualize the possible ultrastructural modifications induced by C24:0 on SK-N-BE cells, and was conducted as previously described (22).

Microscopical and flow cytometric evaluation of actin organization and polymerization after staining with Rhodamine-Phalloidin

The organization of actin network was evaluated by fluorescence microscopy and flow cytometry after staining with Rhodamine-Phalloidin, which stains F-actin (50). Microscopical observations were performed on SK-N-BE cells grown on glass coverslips. At the end of the treatment, cells were washed with PBS, fixed with a 2% paraformaldehyde / PBS solution (10 min, room temperature), washed in PBS, and permeabilized with PBS/0.05% saponin/10% FCS (30 min, room temperature) and incubated (30 min, room temperature, in the dark) in a 0.1 µM Rhodamine-Phalloidin solution prepared in PBS/0.05% saponin/10% FCS. Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1 µg/mL). The slides were then mounted in fluorescent mounting medium (Dako Cytomation), and stored in the dark at 4°C until microscopical examination. By conventional fluorescence microscopy, pictures were taken with an Axioskop fluorescent Zeiss microscope, and digitized images were obtained with an AxioCam digital camera (Zeiss).

Flow cytometric analyses were performed in order to quantify F-actin content. To this end, cells were trypsinized, washed and mixed in PBS and fixed in 2%

For Peer Review

paraformaldehyde/PBS solution (15 min, room temperature). After washing in PBS, cells were permeabilized with PBS/0.05% saponin/10% FCS (30 min, room temperature). Further, cells were incubated in a 0.1 µM Rhodamine-Phalloidin solution prepared in PBS/0.05% saponin/10% FCS (30 min, room temperature, in the dark). After washing in PBS, cells were resuspended in PBS and immediately analyzed by flow cytometry on a Galaxy flow cytometer (Partec). Fluorescence was collected through a 580±10 nm bandpass filter. For each sample, fluorescence was quantified on 10,000 cells, and data were analyzed with the Flomax software (Partec).

Analysis of microtubule network organization by conventional fluorescence microscopy

The organization of the microtubule network was evaluated by fluorescence microscopy with an antibody raised against α- and β-tubulin subunits (Abcam, ab59680) or after staining with Tubulin Tracker™ Green (Oregon Green® 488 Taxol, bis-acetate; Life Technologies), which provides green-fluorescent staining of polymerized tubulin in the cells. For microscopical observations SK-N-BE cells were grown on glass coverslips. For immunofluorescence staining procedure, at the end of the treatment, cells were washed in PBS and fixed in absolute cold methanol (90% / PBS solution)(3-5 min, 4°C). After washing in PBS, cells were permeabilized with PBS/0.05% saponin/10% FCS (30 min, room temperature), and incubated with the primary antibody (rabbit polyclonal recognizing α/β tubulin (Abcam, ab59680)) diluted at 1/100 in PBS/0.05% saponin/10% FCS (1 h, room temperature). Further, cells were washed in PBS and incubated with a 488-Alexa fluor goat anti-rabbit (Life Technologies) used at 1/40 prepared in PBS/0.05% saponin/10% FCS (30 min, room temperature, in the dark). Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1 µg/mL). The slides were then mounted in fluorescent mounting medium (Dako Cytomation), and stored in the dark at 4°C until microscopical examination.

For Peer Review

For staining procedure with Tubulin Tracker™ Green, at the end of the treatment, cells were washed with PBS, fixed with cold methanol 90% / PBS solution (3-5 min, room temperature), and washed in PBS. Cells were then stained with Tubulin Tracker (200 nM, 5-10 min, room temperature). After washing in PBS, the nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1 µg/mL, 5 min, room temperature). The slides were then mounted in fluorescent mounting medium (Dako Cytomation), and stored in the dark at 4°C until microscopical examination. By conventional fluorescence microscopy, pictures were taken with an Axioskop fluorescent Zeiss microscope, and digitized images were obtained with an AxioCam digital camera (Zeiss).

Actin and tubulin analysis by polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Cells washed in PBS were lysed in a Ripa buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet NP40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA and 50 mM NaF) in the presence of 1/25 complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA) for 15 min on ice. Cell lysates were cleared by a 15-min centrifugation at 20,000 *g*. The protein concentration was measured in the supernatant using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Ivry-sur Seine, France). Thirty micrograms of proteins were diluted in loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol, and 0.003% bromophenol blue), separated on a polyacrylamide SDS-containing gel, and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad). After blocking nonspecific binding sites for 2 h with 3% nonfat milk and 1% BSA in TBST (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 8), the membrane was incubated overnight with the primary antibody diluted in TBST. The antibodies raised against α-tubulin (Santa-Cruz; ref sc5286) and β-actin (Sigma-Aldrich; ref A2228) were used at 1/300, and 1/5,000 final concentration, respectively. The membrane was then washed twice with TBST

For Peer Review

and incubated for 45 min at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibody (Santa-Cruz Biotechnology) diluted at 1/5000. The membrane was washed twice with TBST and revealed using an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham, Les Ulis, France) and autoradiography. The autoradiograms were were quantified with ImageJ software (NIH, Besthesda, USA).

Dual staining of actin and tubulin with Rhodamine Phalloidin and Tubulin Tracker

To evaluate the interactions between actin and microtubules, which are two major components of the cytoskeleton, SK-N-BE cells were simultaneously stained with Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker. At the end of the incubation time, control (untreated cells), α-cyclodextrin (vehicle) and C24:0-treated cells were washed in PBS, fixed in cold methanol (90%, 3 min, room temperature) and successively incubated with Tubulin Tracker (200 nM diluted in DMEM, 5-10 min, room temperature), Rhodamine-Phalloidin (1 µM diluted in DMEM, 15-30 min, room temperature), and Hoechst 33342 (1 µg/mL diluted in PBS, 5 min, room temperature). Between each step, cells were washed in PBS. The slides were then mounted in fluorescent mounting medium (Dako Cytomation), and stored in the dark at 4°C until microscopical examination. Appropriate controls were performed: unstained cells, cells stained with Tubulin Tracker, Rhodamine-Phalloidin, Hoechst 33342, (Tubulin-Tracker + Hoechst 33342), and (Rhodamine-Phalloidin + Hoechst 33342), only.

Fluorescence analysis by Confocal Laser Scanning Confocal Microscopy (CLSM)

Mono-photon confocal observations of untreated and α-cyclodextrin, C24:0 (5, 10 and 20 µM)-treated SK-N-BE cells were carried out with a LEICA SP2 CLSM (Leica, Wetzlar, Germany). Images at 0.2 µm (x, y) pixel sizes were obtained for each case in 512 x 512

For Peer Review

matrices at magnification x 63 (Plan-Apo, oil immersion, NA 1.4) of CLSM (excitations at 488 and 543 nm). Regular acquisitions resulted in band-pass filtered emissions (500-550 nm, 554-605 nm), and spectral sequences of 16 and 14 images were obtained through 10 nm band-pass filters in the 500-650 nm and 550-680 nm emission range at increments of 10 nm. Interaction between stained actin and tubulin inside cells was determined by fluorescence resonance energy transfer (FRET), by means of these spectral sequences. Fluorescence associated with tubulin (Oregon Green, excitation: 488nm) had an action on the fluorescence of actin stained with rhodamine (excitation: 543nm) when these structures are colocalized as FRET is a distance-dependent interaction between two fluorescent molecules where excitation is transferred from a donor molecule to an acceptor molecule. A complementary set of experiments was also managed to confirm the results obtained by the previous method. FRAP action was performed in a region of interest of samples and photobleaching the acceptor provided an increase of fluorescence intensity of the donor when FRET is possible.

Image analysis

Following general factor analysis techniques, FAMIS was developed to process biomedical image sequences (51, 52). This development specifically required the use of constraints. It had to cope with mixtures of components characterized by their physical behaviors. Linearity and component positivity basic hypothesis were investigated. FAMIS synthesizes image sequences into a reduced number of images called factor images and curves called factor curves (40,53). The latter ones estimate individual behaviors in the sequence of images. Factor images correspond to spatial distribution components.

Concerning the use of FAMIS via Pixies (Apteryx, France), pixels in matrices were combined according to 4 x 4 clusters. These clusters were all investigated. Correspondence analysis (54, 55) was performed on intensity evolution of each cluster. Then oblique analysis

For Peer Review

with positivity constraints was performed on the results of correspondence analysis (51), requiring positive factor curves and images. Factor images were recomputed in the original sampling by oblique projection, on the factor curves and the estimation was performed in the least-squares sense. Here, the factor curves correspond to the emission spectra of the fluorochromes. Factor images provide images of stained fluorescent structures.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on at least three independent experiments using SigmaStat 2.03 software (Systat Software Inc, Chicago, USA) with the Mann-Whitney test. Data were considered statistically different at a *P*-value of 0.05 or less.

RESULTS

Evaluation of the effects of C24:0 on cell viability

When SK-N-BE cells are treated with C24:0 for 48 h in a range of concentrations from 0.1 to 20 μM, a dose dependent increased of cells with depolarized mitochondria determined after staining with DiOC6(3) can be observed by flow cytometry (**Figure 1A**). The loss of transmembrane mitochondrial potential is associated with the increased permeability of cytoplasmic membrane to propidium iodide (PI), which stains dead cells only (**Figure 1B**). The induction of cell death triggered by C24:0 favors a loss of cell adhesion as numerous cells with round nuclei can be observed (**Figure 1C-D**). These functional and morphological changes are correlated to ultrastructural modifications inside cells as shown by means of transmission electron microscopy (TEM). Whereas the distribution and the aspect (size and shape) of mitochondrial are similar in control (untreated cells) and α-cyclodextrin (vehicle)-

For Peer Review

treated cells (**Figure 2 A-B; D-E**), major changes occur in C24:0-treated cells (**Figure 2 C-F**). Several elongated and round mitochondria are observed in C24:0-treated cells (**Figure 2 F**). No cells with condensed and/or fragmented nuclei, which are characteristic of apoptotic cells, are observed by TEM or by fluorescence microscopy after nuclei staining with Hoechst 33342 (**Figure 2 G, H, I**). C24:0 induces side effects when 5 to 20 µM concentrations are used. As various cytotoxic fatty acids are able to produce a disorganization of the cytoskeleton, we wondered whether similar effect can occur in the presence of C24:0 on SK-N-BE cells.

Evaluation of the effect of C24:0 on actin and microtubule network organization: analysis by conventional fluorescence microscopy

Consequently, we have studied the effects of C24:0 on actin and microtubule network organization of SK-N-BE cells at concentrations of 5 and 10 µM only as the concentration of 20 µM produced too much cell damages. By means of conventional fluorescence microscopy and flow cytometry, actin was revealed by staining with Rhodamine-Phalloidin, and microtubules were revealed with a rabbit polyclonal antibody raised against α- and β-tubulin subunits and a 488-Alexa fluor goat anti-rabbit. By means of conventional fluorescence microscopy, similar aspects of actin and microtubule network are observed in control (untreated cells) and α-cyclodextrin (vehicle)-treated cells) (**Figure 3 A-B, E-F**). In C24:0 (5, 10 µM)-treated cells, the size of the cells is reduced and the distribution of actin and microtubules is modified. Cells with condensed actin and microtubules around nuclei (including round cells) can be detected (**Figure 3 C-D, G-H**). All these observations support the fact that C24:0 disorganizes actin and microtubule network in SK-N-BE cells. By means of flow cytometry, increase of actin under its F-form (quantified by the mean fluorescence intensity (MFI)) is detected in C24:0 (5, 10 µM)-treated cells comparatively to control, and/or

For Peer Review

vehicle-treated cells characterized by similar MFI (**Figure 4A**). In addition, by means of flow cytometry, significant decreases in α- and/or β-tubulin subunits content are found in C24:0 (5, 10 μM) – treated cells, comparatively to control, and/or vehicle-treated cells characterized by similar MFI (**Figure 4B**). Western blotting processing was used to study the ratio between α-tubulin and β-actin in different culture conditions (**Figure 4C**). At 5 and 10 μM, the ratio (α-tubulin/β–actin) is reduced (**Figure 4D**). As a consequence, we wondered whether the interaction between actin and microtubules is modified under treatment with C24:0 (10 μM), which induces the most pronounced effects.

Colocalization of actin and tubulin in C24:0-treated SK-NB-E cells by FRET spectral imaging microscopy

As C24:0 (10 μM) induces important topographic and quantitative modifications of actin and microtubules organization of SK-N-BE cells revealed by conventional fluorescence microscopy (perinuclear accumulation of F-actin and microtubules), flow cytometry (increased level of F-actin and α/β tubulin per cell) and western blotting (ratio: α tubulin / β actin), with simultaneously marked effect on mitochondrial transmembrane potential, enhanced permeability to propidium iodide and induction of round cells, this concentration for further confocal experiments. Images of samples containing untreated SK-N-BE cells and C24:0 (10 μM) treated cells stained with Tubulin Tracker Green (Oregon Green) only or stained with Rhodamine-Phalloidin (rhodamine) only show the different structures of actin and microtubules **(Figure 5)**. The ability to colocalize microtubules stained with Oregon Green (emission of a green fluorescence under 488 nm light) together with actin stained with rhodamine (emission of an orange fluorescence under 543 nm light) is possible depending on the occurrence of FRET. When cells are not treated, microtubules and actin are properly

For Peer Review

excited at 488 nm and 543 nm, respectively. When cells are treated, microtubules and actin are excited by means of the 488 nm light only **(Figure 6)**. Image analysis provides charts from spectral sequences and FAMIS processing provides factor curves and factor images in which peaks of emission are 525 nm and 565 nm respectively **(Figure 7)**. Also, when FRAP is performed in a region of interest (ROI) containing cells, the fluorescence of the donor increases when the acceptor is photobleached **(Figure 8)**.

DISCUSSION

Analysis of the cytoskeleton components is required in many research fields, in which differentiation, cell migration, cancer, neurology, pharmacology and toxicology are included. Indeed, some components of the cytoskeleton such as actin and microtubules are essential to maintain several cell functions. Thus, the activity of mitochondria, which is an essential organelle involved in energy production, glucose and lipid metabolism, RedOx homeostasia, and cell death control, depends on its interaction with actin and microtubules (56). It is also reported that the activity of peroxisome, which is an essential organelle involved in the control of lipid metabolism, oxidation and non cytokinic inflammation (57, 58) depends also on its interaction with microtubules (59, 29). As some modifications of actin and microtubules can occur in various normal or pathological conditions (aging, cancer, neurodegeneration) (60, 61) or under the action of various molecules, methods which allow to emphasize cytoskeleton modifications are of interest. In the present study, we characterize the effects of C24:0 on human neuronal cells SK-N-BE. As various cytotoxic effects associated with cell death are observed on different cell types treated with tetracosanoic acid (C24:0) (20, 21, 22, 62), we ask whether this fatty acid is able to induce cytoskeleton modifications. By using various flow cytometric, microscopical and biochemical methods, we demonstrate changes of

For Peer Review

actin and microtubules when treatment with C24:0 is involved. Our data establish the possibility to state actin and tubulin interaction after staining with Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker which can produce FRET when they are colocalized, which can be characterized by means of Monophoton Spectral Imaging Confocal Microscopy. Moreover, available spectral imaging processing (FAMIS) provides visualization of such a colocalization (44).

Although accumulations of C24:0 are observed in various neurodegenerative diseases, the impact of this fatty acid on neural cells is still not well known. Indeed, only few investigations are available on the side effects of VLCFA (63, 64). It has been suggested that the incorporation of VLCFA by neuronal cells, and the presence of these fatty acids in their environment, can lead to dysfunctions and cell death. Indeed, in brain lesions of X-ALD patients with tissular accumulation of C24:0, some dead cells, glial cells including oligodendrocyes and astrocytes especially, are detected (65, 66). Based on acute application of C24:0 on mixed hippocampal cell cultures containing oligodendrocytes, astrocytes and neurons from post natal days 1-2 Wistar rat pups, which induces an increased Ca^{2+} level and a decreased of mitochondrial potential on all the three cell types when it is measured with Rhodamine 123 (19), the ability of C24:0 to trigger cell death on neural cells is questionable. In the present study on SK-N-BE cells, the ability of C24:0 to favor cell death measured by enhanced permeability to PI, which indicates cytoplasmic membrane damages and which enters dead cells only (67, 49), supports that this fatty acid can also activate cell death on neuronal cells. Consequently, in neurodegenerative disease such as in AD, increased accumulation of C24:0 in cortical lesions can contribute to neurodegeneration. Moreover, as mitochondria are known to play active parts in the mode of cell death triggered by biological, physical, and chemical agents (68), the influence of C24:0 on mitochondrial topography, morphology and functions is also studied. By transmission electron microscopy,

For Peer Review

comparatively to untreated or vehicle-treated cells, important topographical and morphological changes are observed, especially clusters of mitochondria containing some elongated and round mitochondria in various area of the cytoplasm, suggesting mitochondrial biogenesis. These mitochondrial elongations associated with increased mitochondrial mass (21) can provide protection from organelle dysfunctions and degradation in order to maintain ATP levels (69) and prevent cell death. Noteworthy, as it is observed on C24:0 – treated 158N murine oligodendrocytes (22, 20), and based on morphological criteria (absence of cells with perinuclear chromatin, condensed and/or fragmented nuclei (49), C24:0 inducement of SK-N-BE cell death is a non apoptotic mode of cell death associated with marked mitochondrial modifications. As it is reported that changes in the dynamics of microtubules can potentially exert profound effects on the homeostasis of mitochondria since the distribution and morphology of mitochondria and other organelles in mammalian cells are largely dependent upon the integrity of microtubules (70, 71), it is important to determine the effects of C24:0 on microtubules. Moreover, as reactive oxygen species (ROS) are produced under treatment with C24:0 (21), and can react with cellular macromolecules, their overproduction can induce modifications at various cellular levels, especially at the cytoskeleton level, and contribute to the formation of round cells and to the loss of cell adhesion (72). Indeed, ROS can act through several pathways on various components of the cytoskeleton such as actin fibers (73). Thus, as actin and microtubules disorganizations are observed in AD (7, 35), it is of interest to emphasize the impact of C24:0 on actin and microtubule network.

As C24:0 induces important topographic and quantitative modifications of actin and microtubules organization of SK-N-BE cells revealed by conventional fluorescence microscopy, flow cytometry and western blotting, we have attempted the study of the consequence of treatment with this fatty acid on the interaction between actin and microtubules. To this end, two dyes reacting with actin (Rhodamine-Phalloidin: a bicyclic

For Peer Review

peptide isolated from the deadly *Amanita phalloides* mushroom conjugated to the red-orange fluorescent dye, tetramethylrhodamine (TRITC) and with microtubules (Tubulin Tracker (Oregon Green® 488 Taxol, bis-acetate)) providing a green-fluorescent staining of polymerized tubulin) were used simultaneously. Concerning C24:0 treated cells, spectral analysis provided by confocal microscopy proves the existence of FRET when actin and tubulin are stained with Tubulin Tracker (Oregon Green: donor) and Rhodamine-Phalloidin (rhodamine: acceptor) whereas no FRET is observed in untreated cells. Therefore, the present investigation, with the simultaneous use of Oregon Greeen, rhodamine, confocal laser scanning microscopy and spectral imaging methods (FAMIS) constitutes a new method that allows to determine the colocalization of actin and tubulin in C24:0 treated cells on the basis of FRET revealed by spectral analysis of fluorescence emissions. A variety of other FRET detection methods exists based on acceptor or donor photobleaching and suited to fixed samples. Here we used acceptor photobleaching in which the acceptor molecule is bleached resulting in a brightening of the donor fluorescence. As such, the use of FRAP in complementary experiments on the acceptor confirmed the existence of FRET as it shows an increase of the intensity of fluorescence of the donor in C24:0 treated cells. This technical approach, which is easy to perform, can have a wide number of applications in several biological fields to provide precisions on the interactions of actin and microtubules in various normal and pathological processes or under the action of various compounds. In pharmacology and toxicology, the possibility to develop automated micromethods based on the simultaneous use of Rhodamine-Phalloidin, Tubulin Tracker Green and FRET can have some interest to identify biological, chemical and physical agents capable to modify actin and microtubules interactions.

Altogether, by using various methods of microscopy and flow cytometry, the present study demonstrates that C24:0-induced cell death is associated with important modifications

For Peer Review

of actin and microtubules, which are major components of the cytoskeleton. This event can have some consequences on mitochondrial and peroxisome activity, which depends on actin and microtubules organization, respectively, and supports the hypothesis that C24:0 found at increased levels in the cortex of patients with AD can contribute to the development of this disease. In addition, we establish that the combined use of Tubulin Tracker, Rhodamine-Phalloidin and FRET confocal fluorescence microscopy associated with FAMIS constitutes a new and useful method to evaluate the interactions between microtubules and actin.

For Peer Review

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Flow cytometric and microscopical analysis of C24:0-induced cell death. Flow cytometry and phase contrast microscopy are used to characterize the effects of C24:0 (0.1, 1, 5, 10 and 20 µM; 48 h) on SK-N-BE cells. The ability of C24:0 to induce cell death is evaluated by various criteria: measurement of the transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\psi m$) with DiOC6(3) allowing to quantify cells with depolarized mitochondria (A); quantification of dead cells after staining with propidium iodide (PI) (**B**); quantification of the presence of round cells determined according to the shape index (number of round cells/total number of cells/mm^2) (**C**). In addition, the effect of C24:0 on SK-N-BE cells is evaluated by phase contrast microscopy which reveals a reduction of adherent cells (**D**). Data shown are mean ± SD from two independent experiments realized in triplicate. Significance of the difference between control and treated cells is indicated by * (Mann Whitney test; * $P < 0.05$). Significance of the difference between vehicle and C24:0-cells is indicated by # (Mann Whitney test; # $P < 0.05$). No significant difference is observed between control and vehicle-treated cells.

Figure 2: Morphological characteristics of human neuronal cells (SK-N-BE) treated with C24:0: analysis by transmission electron microscopy and fluorescence microscopy. Transmission electron microscopy (TEM) and conventional fluorescence microscopy of SK-N-BE cells cultured for 48 h in the absence (control cells) (**A, D, G**) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle) (**B, E, H**), or C24:0 (10 μM) (**C, F, I**). The insets in Figures D, E and F correspond to Figures (A, B, C), respectively. Some mitochondrial modifications are observed in C24:0-treated SK-N-BE cells (**F**), when they are compared to control (**D**) and vehicle-treated cells (**E**): higher numbers of mitochondria, often larger in size, are found (m: mitochondria). No differences are revealed between control and vehicle-treated cells by TEM and fluorescence microscopy; no signs of apoptosis (cells with perinuclear chromatin, with condensed and/or fragmented nuclei) are detected.

Figure 3: Evaluation of actin and microtubule network organization by conventional fluorescence microscopy. SK-N-BE cells are cultured for 48 h in the absence (control cells) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle), or C24:0 (5, 10 μM). Actin-F is revealed with Rhodamine-Phalloidin, and microtubules are detected by indirect immunofluorescence with a rabbit polyclonal antibody raised against α- and β-tubulin subunits and a 488-Alexa fluor goat anti-rabbit. The nuclei are counterstained with Hoechst 33342 (1 μg/mL). No differences are revealed between control and vehicle-treated cells whereas a perinuclear condensation of actin-F and α/β tubulin is observed in several C24:0 treated cells.

Figure 4: Flow cytometric and biochemical quantification of actin and tubulin. SK-N-BE cells are cultured for 48 h in the absence (control cells) or presence of α-cyclodextrin (1 mg/mL) (vehicle), or C24:0 (5, 10 μM). Flow cytometric quantification of actin and tubulin is

For Peer Review

performed after cell detachment by trypsinization. Actin-F is revealed with Rhodamine-Phalloidin (**A**); tubulin is revealed with a rabbit polyclonal antibody raised against α- and β-tubulin subunits (α/β tubulin) and a 488-Alexa fluor goat anti-rabbit (**B**). In addition, the ratio α-tubulin/β-actin is determined by Western blotting (**C**). Data shown are mean ± SD from three independent experiments. Significance of the difference between control and treated cells is indicated by * (Mann Whitney test; * $P < 0.05$). Significance of the difference between vehicle and C24:0-cells is indicated by # (Mann Whitney test; # $P < 0.05$). No significant difference is observed between control and vehicle-treated cells.

Figure 5: Confocal images of untreated and C24:0-treated SK-N-BE cells: single staining. Samples are stained with Tubulin Tracker (Oregon Green) or Rhodamine-Phalloidin (rhodamine) to show structures of actin or microtubules (constituted of α- and β-tubulin subunits), respectively.

Figure 6: Confocal images of untreated and C24:0- treated SK-N-BE cells: dual staining. Samples are stained with Tubulin Tracker (Oregon Green) and Rhodamine-Phalloidin (rhodamine) to show possible colocalizations of actin or microtubules (constituted of α- and β-tubulin subunits). Oregon Green (emission of a green fluorescence under 488 nm light) together with rhodamine (emission of an orange fluorescence under 543 nm light) makes it possible to have FRET in some localizations, Oregon Green being the donor and rhodamine being the acceptor. When cells are not treated, microtubules and actin are properly excited at 488 nm and 543 nm, respectively. When cells are treated, microtubules and actin are excited by means of the 488 nm light only.

For Peer Review

Figure 7: FRET revealed by spectral image analysis. Image analysis provides charts (**A**) from spectral sequences and FAMIS processing provides factor curves and factor images in superimposed images (**B**: untreated cells; **C-D**: C24:0-treated cells) in which peaks of emission are 525 nm and 565 nm, respectively. No FRET is observed in untreated cells; FRET is observed in treated-cells.

Figure 8: FRET revealed by FRAP photobleaching. When FRAP is performed in a region of interest (ROI) containing cells, the fluorescence of the donor (Oregon Green) increases when the acceptor (rhodamine) is photobleached.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by grants from the INSERM, the Université de Bourgogne (Dijon, France), the Université de Monastir (Monastir, Tunisia), the University Hospital of Dijon (France), and the Conseil Régional de Bourgogne (Dijon, France).

LITERATURE CITED

For Peer Review

1. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. Dialogues Clin Neurosci **2009**; 11(2): 111-128.

2. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M; Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet **2005**; 366(9503): 2112-2117.

3. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Lancet Neurol **2013**; 12: 207-216.

4. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol **2010**; 9: 119-128.

5. Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. Aβ toxicity in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol **2012**; 45: 366-378.

6. Lee G, Leugers CJ. Tau and tauopathies. Prog Mol Biol Transl Sci **2012**; 107: 263-93.

7. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. Curr Alzheimer Res **2010**; 7: 656-664.

8. Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Arnold SE. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. Arch Neurol **2004**; 61: 378-384.

For Peer Review

9. Titorenko VI, Terlecky SR. Peroxisome metabolism and cellular aging. Traffic **2011**; 12: 252-259.

10. Schrader M, Fahimi HD. The peroxisome: still a mysterious organelle. Histochem Cell Biol **2008**; 129: 421-440.

11. Del Río LA. Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. Arch Biochem Biophys **2011**; 506: 1-11.

12. Antonenkov VD, Grunau S, Ohlmeier S, Hiltunen JK. Peroxisomes are oxidative organelles. Antioxid Redox Signal **2010**; 13: 525-37.

13. Lizard G, Rouaud O, Demarquoy J, Cherkaoui-Malki M, Iuliano L. Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. J Alzheimers Dis **2012**; 29: 241-254.

14. Santos MJ, Quintanilla RA, Toro A, Grandy R, Dinamarca MC, Godoy JA, Inestrosa NC. Peroxisomal proliferation protects from beta-amyloid neurodegeneration. J Biol Chem **2005**; 280: 41057-41068.

15. Shi R, Zhang Y, Shi Y, Shi S, Jiang L. Inhibition of peroxisomal β-oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and Aβ generation in the rat brain. Neurosci Lett **2012**; *528*: 6-10.

16. Cimini A, Moreno S, D'Amelio M, Cristiano L, D'Angelo B, Falone S, Benedetti E, Carrara P, Fanelli F, Cecconi F, Amicarelli F, Cerù MP. Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes. J Alzheimers Dis **2009**; *18*: 935-952.

For Peer Review

17. Fanelli F, Sepe S, D'Amelio M, Bernardi C, Cristiano L, Cimini A, Cecconi F, Ceru' MP, Moreno S. Age-dependent roles of peroxisomes in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener **2013**; 8: 8. doi: 10.1186/1750-1326-8-8.

18. Kou J, Kovacs GG, Höftberger R, Kulik W, Brodde A, Forss-Petter S, Hönigschnabl S, Gleiss A, Brügger B, Wanders R, Just W, Budka H, Jungwirth S, Fischer P, Berger J. Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol **2011**; 122: 271-283.

19. Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. Hum Mol Genet **2008**; 17: 1750-1761.

20. Baarine M, Ragot K, Athias A, Nury T, Kattan Z, Genin EC, Andreoletti P, Ménétrier F, Riedinger JM, Bardou M, Lizard G. Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF-α on oligodendrocytes and astrocytes. Neurotoxicology **2012**; 33(2): 212-28.

21. Zarrouk A, Vejux A, Nury T, El Hajj HI, Haddad M, Cherkaoui-Malki M, Riedinger JM, Hammami M, Lizard G. Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0) treated human neuronal cells (SK-NB-E). Oxid Med Cell Longev **2012**; 2012:623257. doi: 10.1155/2012/623257.

22. Kahn E, Baarine M, Dauphin A, Ragot K, Tissot N, Seguin A, Ménétrier F, Kattan Z, Bachelet CM, Frouin F, Lizard G. Characterization of lipid membrane organization revealed by LAURDAN color shift during cell death induced by 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on 158N murine oligodendrocytes: investigation by mono- and bi-photon spectral imaging confocal microscopy associated with Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS). CytometryA **2011**; 79A: 293-305.

For Peer Review

23. Silva DF, Selfridge JE, Lu J, E L, Cardoso SM, Swerdlow RH. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease: possible targets for therapeutic intervention. Adv Pharmacol **2012**; 64: 83-126.

24. Von Bernhardi R, Eugenín J. Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. Antioxid Redox Signal **2012**; 16(9): 974-1031.

25. De Kock M, Lottering ML, Seegers JC. Differential cytotoxic effects of gamma-linolenic acid on MG-63 and HeLa cells. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid **1994**; 51(2): 109-20.

26. De Almeida LM, Funchal C, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Propionic acid induces cytoskeletal alterations in cultured astrocytes from rat cerebral cortex. Metab Brain Dis **2006**; 21(1): 51-62.

27. Borradaile NM, Buhman KK, Listenberger LL, Magee CJ, Morimoto ET, Ory DS, Schaffer JE. A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death. Mol Biol Cell **2006**; 17(2): 770-8.

28. Kilner J, Waby JS, Chowdry J, Khan AQ, Noirel J, Wright PC, Corfe BM, Evans CA. A proteomic analysis of differential cellular responses to the short-chain fatty acids butyrate, valerate and propionate in colon epithelial cancer cells. Mol Biosyst **2012**; 8(4): 1146-56.

29. Schrader M, Thiemann M, Fahimi HD. Peroxisomal motility and interaction with microtubules. Microsc Res Tech **2003**; 61(2): 171-8.

30. Von Braun SS, Schleiff E. Movement of endosymbiotic organelles. Curr Protein Pept Sci **2007**; 8(5): 426-38.

For Peer Review

31. Bamburg JR, Bloom GS. Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. Cell Motil Cytoskeleton **2009**; 66(8): 635-49.

32. Medeiros R, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. CNS Neurosci Ther **2011**; 17(5): 514-24.

33. Hirano A. Hirano bodies and related neuronal inclusions. Neuropathol Appl Neurobiol **1994**; 20: 3-11

34. Maselli AG, Davis R, Furukawa R, Fechheimer M. Formation of Hirano bodies in Dictyostelium and mammalian cells induced by expression of a modified form of an actin-crosslinking protein. J Cell Sci **2002**; 115(Pt 9): 1939-49.

35. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Ubiquilin-1 immunoreactivity is concentrated on Hirano bodies and dystrophic neurites in Alzheimer's disease brains. Neuropathol Appl Neurobiol **2013** Feb 20; doi: 10.1111/nan.12036.

36. Crowther RA. Structural aspects of pathology in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta **1990**; 1096(1): 1-9.

37. Renz M. Fluorescence Microscopy – A Historical and Technical Perspective. Cytometry A **2013**; 83A: 767-779.

38. Sun Y, Rombola C, Jyothikumar V, Periasamy A. Forster Resonance Energy Transfer Microscopy and Spectroscopy for localizing protein-protein interactions in living cells. Cytometry A **2013**; 83A: 780-793.

39. Swift SR, Trinkle-Mulkahy L. Basic principles of FRAP, FLIM and FRET. Proc R Microsc Soc **2004**; 39: 3-10.

For Peer Review

40. Gordon GW, Liang GBXH, Levine B, Herman B. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. Biophys J **1998**; 74:2702-2713.

41. Vejux A, Kahn E, Dumas D, Bessede G, Menetrier F, Athias A, Riedinger J-M, Frouin F, Stoltz J-F, Ogier-Denis E, Todd-Pokropek A, Lizard G. 7-Ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive cytoplasmic structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation. Cytometry A **2005**; 64A: 87-100.

42. Kahn E, Vejux A, Dumas D, Montange T, Frouin F, Robert V, Riedinger. J-M, Stoltz J-F, Gambert P, Todd-Pokropek A, Lizard G. FRET Multiphoton Spectral Imaging Microscopy of 7-Ketocholesterol and Nile Red in U937 Monocytic Cells loaded with 7-Ketocholesterol. Anal Quant Cytol Histol **2004**; 26: 11-16.

43. Van Munster EB, Kremers GJ, Adjobo-Hermans MJ, Gadella TW Jr. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching. J Microsc **2005**; 218(Pt 3): 253-62.

44. Kahn E, Lizard G, Pélégrini M, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R. Four-dimensional factor analysis of confocal images sequences (4D-FAMIS) to detect and characterize low numbers of human papillomavirus DNA by FISH in HeLa and SiHa cells. J Microscopy **1999**; 193: 227-243.

45. Kemp S, Theodoulou FL, Wanders RJ. Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance. Br J Pharmacol **2011**; 164(7): 1753-66.

For Peer Review

46. Singh I, Kishimoto Y. Effect of cyclodextrins on the solubilization of lignoceric acid, ceramide, and cerebroside, and on the enzymatic reactions involving these compounds. J. Lipid Res **1983**; 24: 662-665.

47. Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. Cell Biol Toxicol **2005**; 21: 97-114.

48. Yeh CJ, Hsi BL, Faulk WP. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. J Immunol Methods **1981**; 43(3): 269-75.

49. Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. Cytometry **1995**; 21(3): 275-83.

50. Belloc JF, Vincendeau P, Freyburger G, Dumain P, Boisseau MR. Flow cytometric study of the activation of polymorphonuclear cells. J. Leukoc. Biol **1990**; 48: 353-358.

51. Di Paola R, Bazin JP, Aubry F, Aurengo A, Cavaillolès F, Herry JH, Kahn E. Handling of dynamic sequences in nuclear medecine. IEEE Trans Nucl Sci **1982**; 29: 1310-1321.

52. Frouin F, Cinotti L, Benali H, Buvat I, Bazin JP, Millet P, Di Paola R. Extraction of functional volumes from medical dynamic volumetric datasets. Comp Med Imaging Graph **1993**; 17: 397-404.

53. Kahn E, Frouin F, Souchier C, Bernengo JC, Bruzzoni-Giovanelli H, Clement O, Frija G, Di Paola R, Calvo F, Linares-Cruz G. Confocal multilaser focusing and single-laser characterization of UV excitable stains of cellular preparations. Cytometry **2000**; 40: 42-49.

For Peer Review

54. Harman HH. Modern factor analysis, Chicago, University of Chicago Press, **1960**.

55. Benzecri JP. L'analyse des données, Tome 2: L'analyse des correspondances. Paris: Dunod, **1973**.

56. Hollenbeck PJ, Saxton WM. The axonal transport of mitochondria. J Cell Sci **2005**; 118(Pt 23): 5411-9.

57. Ferdinandusse S, Meissner T, Wanders RJ, Mayatepek E. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of leukotrienes. Biochem Biophys Res Commun **2002**; 293(1): 269-73.

58. Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. Annu Rev Biochem **2006**; 75: 295-332.

59. Thiemann M, Schrader M, Völkl A, Baumgart E, Fahimi HD. Interaction of peroxisomes with microtubules. In vitro studies using a novel peroxisome-microtubule binding assay. Eur J Biochem **2000**; 267(20): 6264-75.

60. Gourlay CW, Ayscough KR. The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis. FEMS Yeast Res **2005**; 5(12): 1193-8.

61. Boldogh IR, Pon LA. Mitochondria on the move. Trends Cell Biol **2007**; 17(10): 502-10.

62. Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. Hum Mol Genet **2008**; 17: 1750-61.

63. Singh I, Pujol A. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. Brain Pathol **2010**; 20: 838-44.

For Peer Review

64. Wanders RJ, Ferdinandusse S, Brites P, Kemp S. Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. Biochim Biophys Acta **2010**; 1801: 272-80.

65. Feigenbaum V, Gélot A, Casanova P, Daumas-Duport C, Aubourg P, Dubois-Dalcq M. Apoptosis in the central nervous system of cerebral adrenoleukodystrophy patients. Neurobiol Dis **2000**; 7(6 Pt B): 600-12.

66. Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Nagpal S, Moser AB, Frosch MP, Ransohoff RM. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? Ann Neurol **2008**; 63: 729-42.

67. Yeh CJ, Hsi BL, Faulk WP. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. J Immunol Methods **1981**; 43(3): 269-75.

68. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev **2007**; 87: 99-163.

69. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. Nat Cell Biol **2011**; 13(5): 589-98.

70. Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Takeda S, Harada A, Hirokawa N. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. Cell **1998**; 93: 1147-1158.

71. Karbowski M, Spodnik JH, Teranishi M, Wozniak M, Nishizawa Y, Usukura J, Wakabayashi T. Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells. J Cell Sci **2001**; 114(Pt 2): 281-91.

For Peer Review

72. Zahm JM, Baconnais S, Monier S, Bonnet N, Bessède G, Gambert P, Puchelle E, Lizard G. Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. Cytometry A **2003**; 52(2): 57-69.

73. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol **2001**; 280(4): C719-41.

For Peer Review

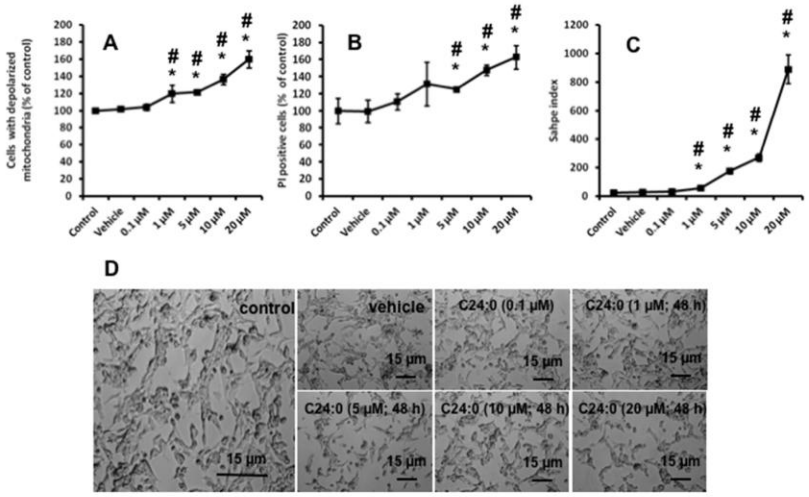


Figure1

For Review

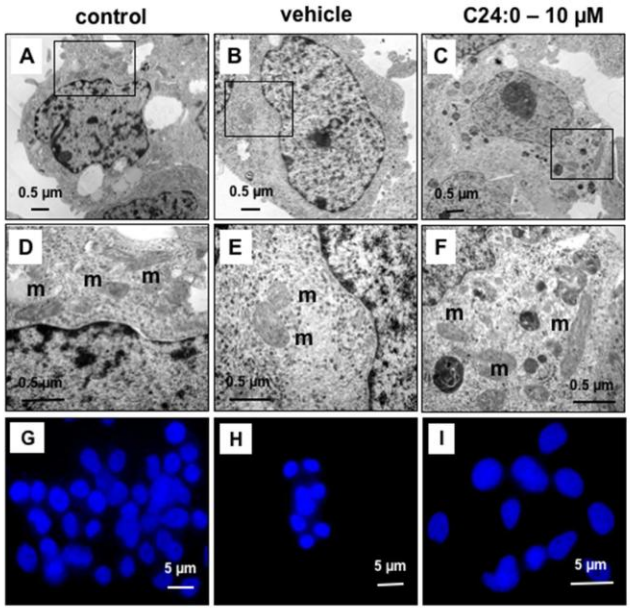


Figure 2

For Review

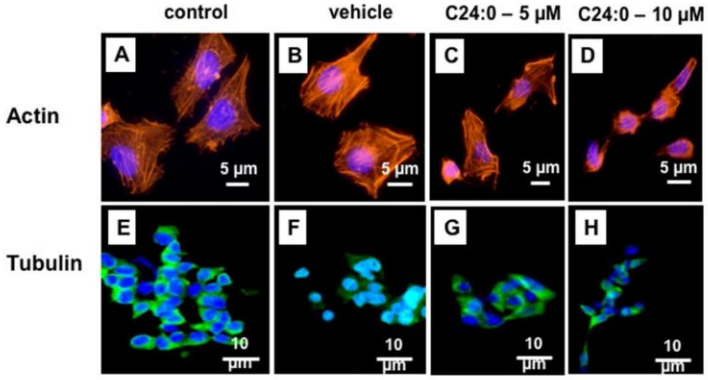


Figure 3

For Review

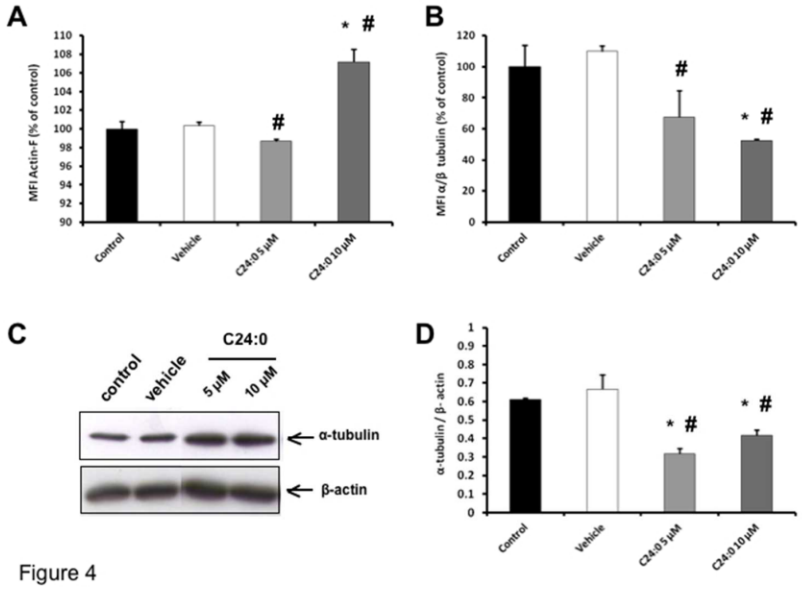


Figure 4

For Review

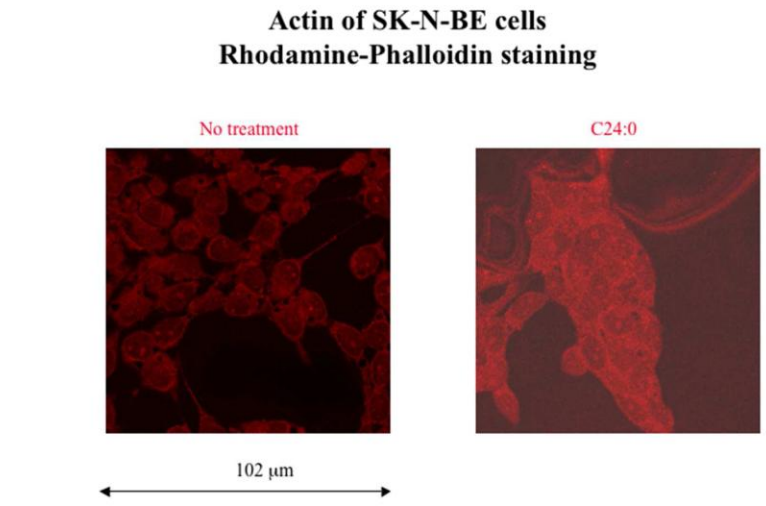


Figure 5A mono-photon : excitation 543 nm, emission (554-605 nm)

Review

Microtubules of SK-N-BE cells
Tubulin Tracker (Oregon Green) staining

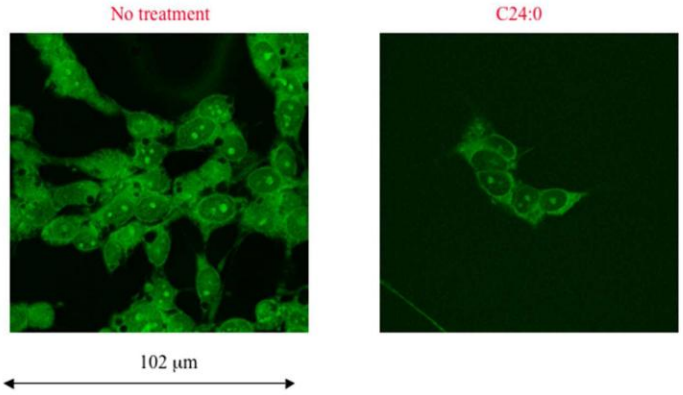


Figure 5 B mono-photon : excitation 488 nm, emission (500-550 nm)

Review

Actin and Microtubules of SK-N-BE cells
Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker (Oregon Green) stainings

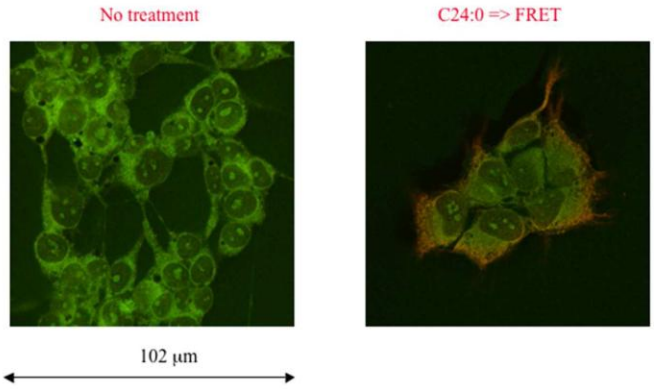


Figure 6 (1) mono-photon : excitation 488 nm, emissions (500-550 et 554-605 nm)

For Review

Actin and Microtubules of SK-N-BE cells
Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker (Oregon Green) stainings

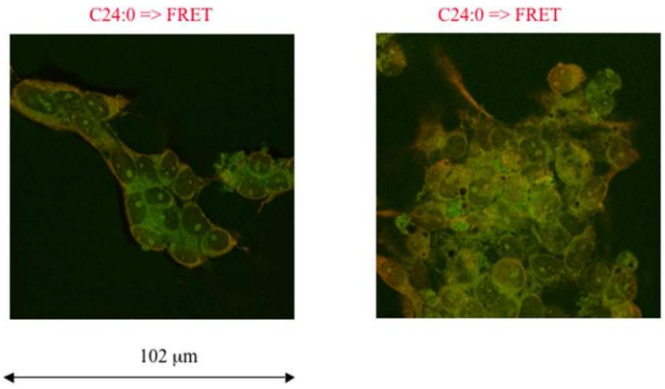


Figure 6 (2) mono-photon : excitation 488 nm, emissions (500-550 et 554-605 nm)

For Review

Actin and Microtubules of SK-N-BE cells
Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker (Oregon Green) stainings

Emission spectra : 505->655 et 555->685 nm

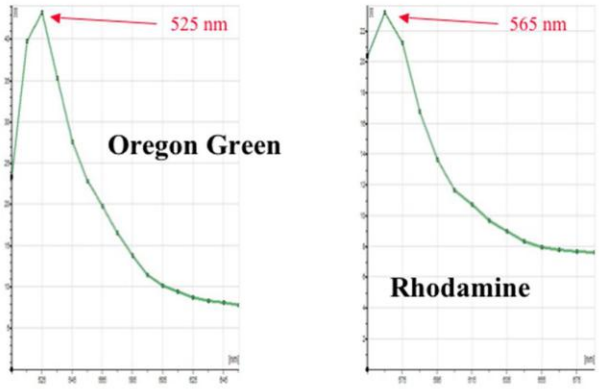
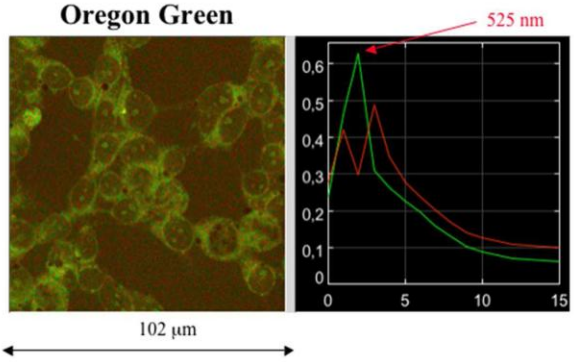


Figure 7A mono-photon : excitations : 488 et 543 nm, respectively

For Review

Actin and Microtubules of untreated SK-N-BE cells
Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker (Oregon Green) stainings

FAMIS : sequence of 16 emission images from 505 to 655 nm



mono-photon : excitation 488 nm

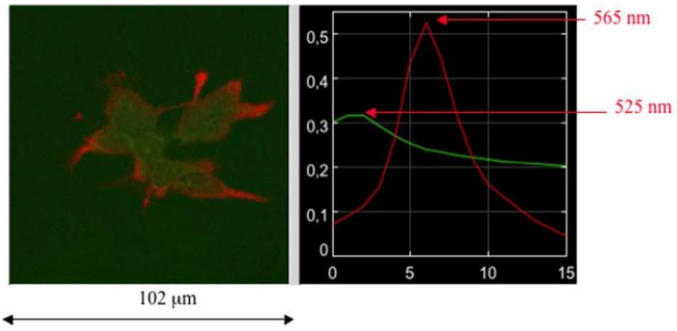
Figure 7B

For Review

Actin and Microtubules of C24:0-treated SK-N-BE cells
Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker (Oregon Green) stainings

FAMIS : sequence of 16 emission images from 505 to 655 nm

Rhodamine and Oregon Green



mono-photon : excitation 488 nm => FRET

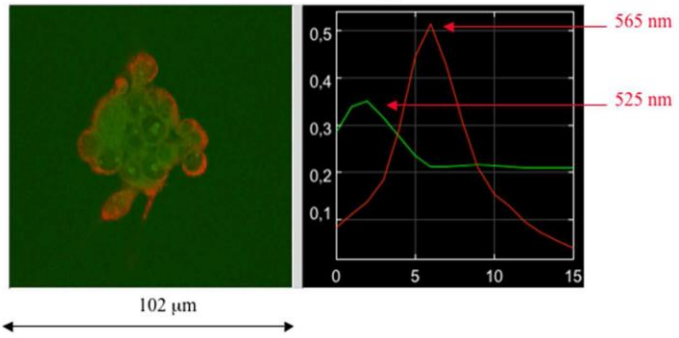
Figure 7C

Review

Actin and Microtubules of C24:0-treated SK-N-BE cells
Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker (Oregon Green) stainings

FAMIS : sequence of 16 emission images from 505 to 655 nm

Rhodamine and Oregon Green

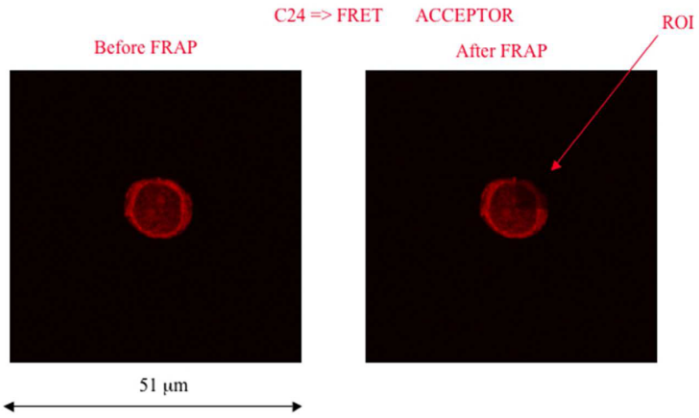


mono-photon : excitation 488 nm => FRET

Figure 7D

Review

Actin and Tubulin of C24:0-treated SK-N-BE cells
Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker (Oregon Green) stainings

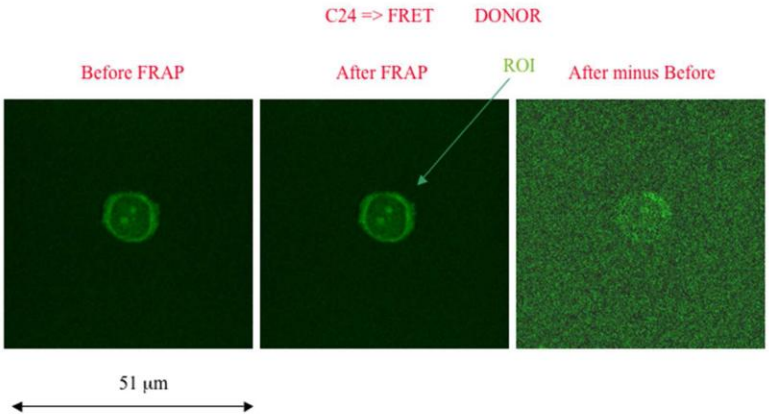


mono-photon : excitation 488 nm, emissions (500-550 et 554-605 nm)

Figure 8 A

Review

Actin and Tubulin of C24:0-treated SK-N-BE cells
Rhodamine-Phalloidin and Tubulin Tracker (Oregon Green) stainings



mono-photon : excitation 488 nm, emissions (500-550 et 554-605 nm)

Figure 8 B

For Review

Elsevier Editorial System(tm) for Nutrition Research
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Dual effect of docosahexaenoic acid (attenuation or amplification) on C22:0-, C24:0-, and C26:0-induced mitochondrial dysfunctions and oxidative stress on human neuronal SK-N-BE cells

Article Type: Research Article

Corresponding Author: Dr. Gérard LIZARD,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Amira ZARROUK, MS (PhD student)

Order of Authors: Amira ZARROUK, MS (PhD student); Thomas NURY, BS; Jean Marc RIEDINGER, Doctor in Pharmacy; Mohamed HAMMAMI, PhD; Gérard LIZARD

Laboratoire Bio-PeroxIL (EA7270)
Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique
Université de Bourgogne - Faculté des Sciences Gabriel
6, boulevard Gabriel - F21000 DIJON

Dr Gérard LIZARD

To **Dijon, September 12, 2013**

Editor in Chief (Nutrition Research) – Dr Bruce A. WATKINS

Subject : submission of an original paper in 'Nutrition Research'

Dear Editor,

We hereby submit the following manuscript for publication in 'Nutrition Research': '**Dual effect of docosahexaenoic acid (attenuation or amplification) on C22:0-, C24:0-, and C26:0-induced mitochondrial dysfunctions and oxidative stress on human neuronal SK-N-BE cells'** by ZARROUK Amira *et al.*.

In summary, C22:0, C24:0 and C26:0 have been found in Alzheimer brain lesions supporting the hypothesis that lipid metabolism dysfunctions can play important roles in Alzheimer's disease. We therefore evaluated the ability of C22:0, C24:0 and C26:0 to induce side effects on human neuronal cells (SK-N-BE) as well as the protective effects of docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3).

Our data show that C22:0, C24:0 and C26:0 are able to inhibit cell growth, to trigger a loss of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\psi m$), and to induce oxidative stress associated with an overproduction of ROS, decreased level of GSH, and lipid peroxidation. Our study also revealed that DHA can also attenuate C22:0-, C24:0-, and C26:0-induced mitochondrial dysfunctions and/or cell growth inhibition as well as ROS overproduction, whereas it can also favor ROS overproduction at elevated concentration. Altogether, as mitochondrial dysfunctions, ROS overproduction and oxidative stress are hallmarks of AD, our data brings new evidences underlying the potential role of lipids, such as fatty acids (C22:0, C24:0, C26:0, and C22:6 n-3), to favor and/or counteract neurodegeneration leading to AD.

These findings have important implications for the understanding of the pathogenesis of Alzheimer's disease and for the development of appropriated therapies.

All authors have contributed to the work and agree to submit it for consideration in Nutrition Research.

We declare that the manuscript has not been previously published.

We hope that the present manuscript will meet with the requirements of 'Nutrition Research' and that it will be found suitable for publication in the Journal.

Sincerely yours,

Gérard LIZARD (PhD)

Téléphone : 03 80 39 62 37 - Télécopie : 03 80 39 62 50
Directeur : gerard.lizard@u-bourgogne.fr – Secrétariat : nathalie.bancod@u-bourgogne.fr
http://bioperoxil.u-bourgogne.fr/

SUBMISSION CHECKLIST

September 12, 2013

Dual effect of docosahexaenoic acid (attenuation or amplification) on C22:0-, C24:0-, and C26:0-induced mitochondrial dysfunctions and oxidative stress on human neuronal SK-N-BE cells

Amira Zarrouk, Thomas Nury, Jean Marc Riedinger, Mohamed Hammami, Gérard Lizard

- ✓ Cover letter
- ✓ Manuscript
- ✓ 7 Figures

Gérard LIZARD (PhD)

Dr. Gérard Lizard (Ph.D), Laboratoire BIO-peroxIL ('Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique') – EA 7270 / INSERM, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

E.Mail: gerard.lizard@u-bourgogne.fr ; Phone: +33 380 39 62 56; Fax: +33 380 39 62 50

*Manuscript
Click here to view linked References

Dual effect of docosahexaenoic acid (attenuation or amplification) on C22:0-, C24:0-, and C26:0-induced mitochondrial dysfunctions and oxidative stress on human neuronal SK-N-BE cells

Amira Zarrouk [1,2], Thomas Nury [1], Jean Marc Riedinger [3], Mohamed Hammami [2], Gérard Lizard [1, *]

[1] Equipe 'Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique' EA 7270 / Université de Bourgogne / INSERM, Dijon, France;

[2] Université de Monastir, Faculté de Médecine, LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition - Functional Food & Vascular Health', Monastir, Tunisia;

[3] Centre de Lutte Contre le Cancer GF Leclerc, Laboratoire de Biologie Médicale, Dijon, France;

* Author to whom correspondence should be addressed: Dr. Gérard Lizard (Ph.D), Laboratoire BIO-peroxIL ('Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique') – EA 7270 / INSERM, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

E.Mail: gerard.lizard@u-bourgogne.fr ; Phone: +33 380 39 62 56; Fax: +33 380 39 62 50

Abstract

Alteration of lipid metabolism could be involved in Alzheimer's disease (AD). Increased levels of C22:0, C24:0 and C26:0 have been found in cortical lesions of Alzheimer patients. So, it was of interest to precise the cytotoxic effects of these fatty acids, and to determine whether docosahexaenoic acid (DHA), described to prevent AD, can attenuate their eventual side effects. Human neuronal cells SK-N-BE were cultured in the absence or presence of C22:0, C24:0 or C26:0 (0.1 to 20µM) without or with DHA (50, 100, 150µM). The effects of C22:0, C24:0 and C26:0 on mitochondrial activity and cell growth were studied with MTT test, with $DiOC_6(3)$ to measure transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\psi m$), and by cell counting with trypan blue. Oxidative stress was estimated with fluorescent probes (DHE, H_2DCFDA) to determine reactive oxygen species (ROS) production, with monochlorobimane for GSH quantification, and by flow cytometry and gas chromatography coupled with mass spectrometry to evaluate lipid peroxidation. C22:0, C24:0 and C26:0 induce an inhibition of cell growth, a loss of $\Delta\psi m$, an overproduction of ROS, a decrease of GSH, and a lipid peroxidation. DHA attenuates C22:0, C24:0 and C26:0 induced-mitochondrial dysfunctions and/or cell growth inhibition whatever the concentrations considered, whereas it can either decrease or amplify (especially at 150µM) ROS overproduction. Thus, C22:0, C24:0 and C26:0 have neurotoxic activities, and depending on its concentration, DHA attenuates or not fatty acids-induced side effects. Consequently, our data suggest that DHA should be used carefully to prevent the development of AD associated with increased fatty acids levels.

Key words: docosahexaenoic acid (DHA); fatty acids; mitochondrial dysfunctions; oxidative stress; lipid peroxidation; SK-N-BE cells.

Introduction

It is well admitted that the initiating event in Alzheimer disease (AD; OMIM # 104300) is related to the excess production of β-amyloid (Aβ) peptides constituting the senile plaques in the brain [**1, 2**]. This process can occur while individuals are still cognitively normal. The excess of Aβ could be the consequence of abnormal processing of amyloid precursor protein (APP) via β- and γ -secretase mediated cleavages [**3**] and/or to a reduced clearance of Aβ [**4**]. In the presence of amyloidogenic Aβ peptides, a cascade of toxic events would be activated including a hyperphosphorylation of tau, a neural associated protein involved in microtubules stabilization playing an important role in microtubule dynamics and in axonal transport [**5, 6**]. The pathogenic hyperphosphorylation of tau, which is a major component of neurofibrillary tangles (NFTs), favors a disorganization of microtubules [7]. Noteworthy, clinical symptoms are more closely related to NFTs than to senile plaque formation [**8, 9**].

Currently, the pathogenesis of AD is still poorly understood but some investigations support a linkage between lipid metabolism and AD [**10, 11**]. As 25% of the total amount of cholesterol present in humans is located in the brain, brain cholesterol homeostasis must be tightly regulated [**12**]. Consequently, alteration of cholesterol metabolism leading to abnormal levels of cholesterol oxide derivatives in the central nervous system, such as 24S-hydroxycholesterol, may contribute to some neurological diseases [**13**]. Thus, 24S-hydroxycholesterol, which is only formed in the brain by 24-hydroxylase (CYP46A1), is considered as a marker of metabolically active neurons [**14**]. Whereas less than 1% of the total excretion of 24S-hydroxycholesterol occurs via the cerebrospinal fluid [**12**], this minor fraction allows evaluating neuronal damage and rate of neuronal loss [**15**]. Interestingly, patients with neurodegenerative disorders were found to have increased levels of 24S-hydroxycholesterol in the cerebrospinal fluid, in parallel with decreased levels in the

circulation, and it was shown that reduction of the plasmatic level of 24S-hydroxycholesterol correlated with the severity of dementia or the degree of brain atrophy [**16, 17**]. Moreover, potential roles of 7-ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol resulting from cholesterol autoxidation [**18**], which could be favored by enhanced oxidative stress observed in brain lesions of patients with AD, have been suggested in neurodegeneration [**19, 20**]. In addition, it is well known that Apolipoprotein E (Apo-E) is a major cholesterol carrier that supports lipid transport and injury repair in the brain, and some data sustain that APOE polymorphic alleles are main genetic determinants of AD risk: individuals carrying the ε4 allele are at increased risk of AD compared with those carrying the more common ε3 allele, whereas the ε2 allele decreases risk [**21**]. Regarding the decline of peroxisomal function with age [**22, 23**], which can affect lipid and oxidative stress homoeostasia [**24, 25**], it is suggested that peroxisome may also play a critical role in regulating cellular aging and in the development of neurodegenerative diseases, including AD [**26, 27**]. Thus, some lipid alterations observed in AD, concerning docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3), C22:0, C24:0 and C26:0, as well as plasmalogens support peroxisomal dysfunctions given that the β-oxidation or the synthesis of these lipids occurs, at least in part, in the peroxisome [**27**]. Moreover, treatment of hippocampal neurons with Wy-14.463, a peroxisome proliferator, was able to prevent the neuronal cell death and neuritic network loss induced by the Aβ peptide [**28**]. In agreement with this hypothesis, C24:0 and C26:0 accumulation, increased in Aβ40 content, APP immunoreactivity and APP mRNA expressions have been observed in the cerebral cortex of rats treated with thioridazine, a selective peroxisomal β-oxidation inhibitor [**29**]. In addition, a correlation analysis showed that the Aβ40 levels were positively correlated with the cortex C24:0 and C26:0 levels [**29**]. In the brain of a transgenic mouse model of AD (Tg2576 mouse model of AD), early biochemical and morphological modifications also support a role for peroxisome [**30**]. Moreover, in the hippocampus of these transgenic mice, harboring the

human Swedish familial AD mutation, the peroxisomal membrane protein ABCD3 and ACOX1 were induced, possibly reflecting the need for efficient fatty acid β-oxidation, as a compensatory response to mitochondrial dysfunctions [**31**]. Interestingly, lipid analyses of cortical regions from patients with AD revealed accumulation of C22:0, C24:0, C26:0, three substrates for peroxisomal β-oxidation [**32**], in patients with stages V and VI pathology compared with those modestly affected (stages I and II) based on the neuropathological Braak staging for AD [**33**]. Conversely, the level of plasmalogens, which need intact peroxisomes for their biosynthesis, was decreased in severely affected tissues, in agreement with a peroxisomal dysfunction. In addition, the peroxisomal volume density was increased in some neurons in the gyrus frontalis at advanced AD stages [**33**]. Based on these later observations, it is tempting to speculate that the accumulation of C22:0, C24:0 and C26:0 in the cortex of patients with AD could contribute to neuron dysfunctions via their ability to trigger various side effects involved in the physiopathology of AD such as activation of oxidative stress [**34**] and dysregulation of mitochondrial activity [**35**]. Indeed, on various cell types of the central nervous systems, including glial cells and neurons, C22:0, C24:0 and C26:0 are able to trigger an overproduction of reactive oxygen species (ROS) associated with lipid peroxidation, mitochondrial changes (morphological and topographical modifications, alteration of oxidative phosphorylation, loss of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\psi m$)) [**36, 37, 38**] which probably play key roles in cell death induction [**39, 40**].

To date, as there is no curative treatment for AD, many efforts are directed to develop alternative symptomatic and supportive treatments including medical foods [**41, 42**]. DHA is a dietary essential (n-3) PUFA highly enriched in fish oils which can also be synthetized from eicosapentanoic acid (EPA; C20:5 n-3) and linolenic acid (ALA; 18:3 n-3) using successive elongation and desaturation reactions [**27, 32**]. Then, DHA is esterified into phospholipids and delivered to the brain and retina; in this cascade of events leading to DHA synthesis, the role

played by peroxisome, in association with the endoplasmic reticulum is primordial [**27, 43**]. Noteworthy, neuroprotectin D1 (NPD1), the first identified stereoselective bioactive compounds of DHA [**44, 45**], is known to favour neuronal survival and downregulation of amyloidogenic processing in AD cellular models [**46**]. Based on the decreased activity of peroxisome with aging, which can reduce the intrinsic synthesis of DHA [**27**], and on the protective effects of DHA, or of its metabolically active derivative (NPD1) on the prevention of neuronal degeneration [**46**], medical foods enriched in DHA can have some interests to prevent AD or diminish its evolution. However, some side effects of DHA (neuritic injury, astrocytosis, stimulation of oxidative stress) have also been reported [**47, 48**]. In the context of fatty acids-induced neuronal damages, it was therefore of interest to precise whether DHA can have beneficial or detrimental effects.

Therefore, in the present study, on human neuronal cells SK-N-BE, we asked: i) whether C22:0, C24:0 and C26:0 (5, 10, and 20 μM) known to trigger various cytotoxic effects on different brain cells [**36, 37, 38, 39**] were able to induce mitochondrial dysfunctions, cell growth inhibition, ROS overproduction, and oxidative stress damages (decrease of reduced glutathione (GSH); lipid peroxidation: increased levels of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and 7-hydroxycholesterols), and ii) whether DHA (50, 100, and 150 μM) was able or not to prevent C22:0, C24:0 and C26:0 side effects. We observed i) that C22:0, C24:0 and C26:0 induce an inhibition of cell growth, mitochondrial dysfunctions, an overproduction of ROS, a decrease of GSH level, and a lipid peroxidation, and ii) that DHA was able to attenuate C22:0, C24:0 and C26:0 induced-mitochondrial dysfunctions and/or cell growth inhibition whatever the concentrations considered, whereas ROS overproduction was either reduced or amplified depending on the concentration used.

Methods and Materials

Cells and cell treatments

Human neuronal cells (SK-N-BE) were seeded at 200,000-400,000 cells per well in 12-well microplates containing 1 mL of culture medium constituted by Dulbecco's modified Eagle medium with L-glutamine (DMEM) (Lonza) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech) and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) (Pan Biotech). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and passaged twice a week. At each passage, SK-N-BE cells were trypsinized with a (0.05% trypsin-0.02% EDTA) solution (Pan Biotech).

Docosanoic acid (C22:0), tetracosanoic acid (C24:0), hexacosanoic acid (C26:0), and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3) (Sigma-Aldrich) were solubilized in α-cyclodextrin (Sigma-Aldrich) as described [**49**]. The maximal final concentration of α-cyclodextrin (vehicle) in the culture medium was 1 mg/mL [**39**].

The conditions of treatment with C22:0, C24:0 or C26:0 were the following: after plating SK-N-BE cells for 24 h, the cells were further treated for 48 h with various fatty acids concentrations (0.1, 1, 5, 10, and/or 20 µM) in HAM's F-10 medium (Pan Biotech) containing 5% FBS in the absence or in the presence of DHA (50, 100 and 150 µM). The concentrations of fatty acids were chosen according to measurements made on the plasma of healthy subjects (C22:0, C24:0, or C26:0: less than 1 µM) [**36, 50**], and of patients with AD in the department of Neurology (University Hospital, Monastir, Tunisia): C22:0 (mean: 4.2 µM; range: 0.8–8.4 µM), and C24:0 (mean: 4.9 µM; range: 0.8–10.6 µM) [**38**].

Evaluation of mitochondrial activity with the colorimetric MTT assay

The MTT assay was carried as previously described [**36**] on SK-N-BE cells plated in 12-well flat-bottom culture plates after 48 h of treatment with C22:0, C24:0 or C26:0 (0.1, 1,

5, 10, and/or 20 µM). The MTT assay was used to evaluate the effects of C22:0, C24:0 and C26:0 on mitochondrial activity and/or cell growth. Indeed, the tetrazolium salt, MTT, is reduced to formazan in the metabolic active cells by mitochondrial succinate dehydrogenase [**51, 52**]. A microplate reader was used to record mitochondrial activity and/or cell growth at a wavelength of 570 nm.

Flow cytometric quantification of transmembrane mitochondrial potential with DiOC6(3)

Variations of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured with 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$) (Life Technologies), which allows the percentage of cells with low $\Delta\Psi_m$ to be determined. With $DiOC_6(3)$, mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in green fluorescence collected through a 520/10 nm band pass filter. $DiOC_6(3)$ was used at a 40 nM final concentration [**53**]. Flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec). Ten thousand cells were acquired for each sample. Data were analyzed with Flomax (Partec) and FlowJo (Tree Star Inc.) softwares.

Flow cytometric measurement of reactive oxygen species after staining with DHE and H_2DCFDA

Measurement of reactive oxygen species (ROS) contributing to oxidative stress was performed with DHE (dihydroethidium) or H_2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) on cells cultured for 48 h in 12 well plates in the absence or in the presence of C22:0, C24:0 and C26:0 (5, 10, 20 µM) without or with DHA.

DHE and H_2DCFDA are useful probes for detecting ROS in cells [**54, 55, 56**]. So, to measure ROS production, cultured cells were incubated for 30 min at 37°C in the dark with DHE (Life Technologies) or H_2DCFDA (Sigma-Aldrich) used at 2 µM and 10 µM final

concentrations, respectively; DHE was initially prepared at 10 mM in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored at -20°C, and H_2DCFDA was extemporaneously prepared at 5 mM in absolute ethanol [**57**]. At the end of the incubation time, the cells were trypsinized, resuspended in PBS, and the fluorescence of ethidium or 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) resulting from oxidation were immediately measured by flow cytometry. The fluorescent signals of ethidium and DCF were collected through a 520/10 nm band pass filter and a 580/10 nm band pass filter, respectively, on a Galaxy flow cytometer (Partec). Fluorescent signals were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired, and the data were analysed either with Flomax (Partec) or FlowJo (Tree Star Inc.) softwares.

Quantification of intracellular reduced glutathione by fluorescence microscopy after staining with monochlorobimane

The RedOx status was also evaluated by the level of reduced glutathione (GSH) per cell by fluorescence microscopy. GSH was revealed by staining with monochlorobimane (MCB) ([(syn-(ClCH2, CH3)-1,5-diazabicyclo-[3.3.0]-octa-3,6-dione-2,8-dione); λEx max: 380 nm, λEm max: 461 nm]) (Life Technologies) [**58**]. MCB, which reacts with GSH under the action of glutathione S-transferase, was prepared at 4 mM in 100% ethanol and stored in the dark at 4°C. It was added at 200 µM in cell suspensions adjusted to 10^6 cells/mL in PBS. After 30 min of incubation at 37°C, cell deposits were realized by cytocentrifugation (5 min, 15,000 rpm) with a cytospin 2 (Shandon). Cells were observed with an Axioskop fluorescent Zeiss microscope under UV light. For each sample, the percentage of cells containing GSH (blue/green fluorescent cells) was determined on 300 cells.

Evaluation of lipid peroxidation by flow cytometric quantification of 4-hydroxynonenal

4-hydroxynonenal (4-HNE) is an α, β-unsaturated hydroxyalkenal which is produced by lipid peroxidation and is therefore a suitable marker of oxidative stress **[59]**. As 4-HNE has an aldehyde function, it is highly reactive and can react with various molecules giving 4-HNE adducts **[60, 61]**. To identify and quantify 4-HNE, and 4-HNE adducts by flow cytometry, cells were collected by trypsinisation, washed, resuspended in PBS and fixed in freshly prepared 2% paraformaldehyde diluted in PBS (pH 7.4) (10 min, room temperature). Furthermore, the cells were treated with the FACS permeabilising solution 2 (BD-Biosciences) (10 min, room temperature). After washing in PBS, cells were then incubated (20 min, room temperature) with blocking buffer (PBS, 0.05% saponin, 10% goat serum), washed in PBS and incubated (1 h, room temperature) with a mouse monoclonal anti 4-HNE (Abcys) diluted in blocking buffer (2 µg/mL). Cells were further washed twice with PBS and incubated (1 h, room temperature) with a 488-Alexa goat anti-mouse polyclonal antibody (Life Science Technologies) diluted at 1/300 in blocking buffer. Cells were further washed and resuspended in PBS, and analysed with flow cytometry on a Galaxy flow cytometer (Partec). The green fluorescence of 488-Alexa was collected with a 520/10 nm band pass filter. The fluorescent signals were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired, and the data were analysed with Flomax (Partec) and FlowJo (Tree Star Inc.) softwares.

Evaluation of lipid peroxidation by quantification of cholesterol oxide derivatives by gas chromatography coupled with mass spectrometry

Cholesterol oxide derivatives (also named oxysterols), especially those oxidized at C7 resulting from cholesterol autoxidation (7-ketocholesterol, 7β-hydroxycholesterol) **[18]**, 7α-hydroxycholesterol (not only formed via CYP7A1 (cholesterol 7alpha-hydroxylase) **[62]** but

which can also arise from the decomposition of 7α-hydroperoxycholesterol produced by free radical oxidation of cholesterol [**63**]), and total 7-hydroxycholesterols (7-ketocholesterol + 7β-hydroxycholesterol + 7α-hydroxycholesterol) were quantified as previously described as well as total cholesterol [**37, 64**]. To this end, after trypsinization, cells were suspended in ethanol containing butylated hydroxytoluene (Sigma; 50 µg/mL) and EDTA (Sigma; 50 µg/mL). 7β-hydroxycholesterol (d7) (Avanti Polar lipids/Coger, Paris, France) 24S-hydroxycholesterol (d6) (Avanti Polar lipids/Coger) and Epicoprostanol (Sigma) were added as internal standards. Samples were then subjected to alkaline hydrolysis with 0.35 M KOH for 2 h at room temperature. The reaction mixture was adjusted to pH 7 with phosphoric acid and lipids were extracted with hexane. After solvent evaporation, 100 µL of a mixture of N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane (4/1, v/v) (Acros Organics, Fisher Scientific) were added, and samples were incubated at 80°C for 60 min to form trimethylsilyl ethers. After evaporation, the residue was dissolved in 100 µL hexane for GC-MS analysis. GC-MS was performed using an Agilent Technology 6890 GC equipped with an HP7683 injector and a 5973 mass selective detector (Agilent Technologies). Chromatography was performed using a HP-5MS fused silica capillary column (inner diameter, 25 m × 0.25 mm; film thickness, 0.25 µm; Agilent Technologies). GC-MS conditions were as follows: carrier gas, helium at a flow-rate of 1.1 mL/min; injector temperature, 250°C; oven temperature, 180°C increased at 10°C/min to 260°C, then at 1°C/min to 280°C and held for 5 min. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode with an electron energy of 70 eV. The ion source temperature and the quadrupole temperature were 230°C and 150°C, respectively. The ions used for analysis were 24S-hydroxycholesterol (OHC) 145 m/z, 24SOHC (d6) 151 m/z, (25OHC) 131 m/z, cholesterol 368 m/z, epicoprostanol 370 m/z, 7αOHC 456 m/z, 7βOHC 456 m/z, 7βOHC (d7) 463 m/z, 7-ketocholesterol 472 m/z.

Calibration curves were obtained using authentic standards extracted with the method used for cell samples.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using WinSTAT® for Microsoft® Excel (version 2012.1) with the Mann-Whitney test. Data were considered statistically different at a *P*-value of 0.05 or less.

Results

Induction of mitochondrial dysfunctions and inhibition of cell growth in C22:0-, C24:0-, and C26:0 – treated SK-N-BE cells

The effects of C22:0, C24:0 and C26:0 (0.1, 1, 5, 10, and 20 µM) on transmembrane mitochondrial potential (Δψm) and cell growth were evaluated after 48 h of treatment by various complementary tests: MTT test allowing to evaluate mitochondrial activity and/or cell growth via its ability to measure mitochondrial activity by means of the quantification of the mitochondrial enzyme succinate deshydrogenase; flow cytometric measurement of transmembrane mitochondrial potential (Δ□m) with $DiOC_6(3)$; evaluation of cell growth in the presence of trypan blue.

When SK-N-BE cells were incubated for 48 h with C22:0, C24:0 and C26:0, a dose-dependent decrease of MTT reduction was observed. It was more or less important depending on the fatty acid considered. The absorbance began to decrease significantly with C22:0 (0.1 µM), and with C24:0 and C26:0 (5 µM); similar absorbencies were obtained in control and vehicle-treated cells (**Figure 1A**). As MTT gives a blue color product (formazan) under the action of the mitochondrial enzyme succinate deshydrogenase, this assay provides information on cell proliferation and mitochondrial metabolism. In order to determine

whether the decrease in formazan production under treatment with C22:0, C24:0 and C26:0 is simply a function of the reduction of the number of viable cells, and/or an induction of mitochondrial dysfunctions, the number of viable cells was determined and $\Delta\Psi m$ was further measured.

Incubation of SK-N-BE cells with C22:0, C24:0, and C26:0 also resulted in a marked and dose-dependent increase in the percentage of cells with depolarized mitochondria measured with $DiOC_6(3)$. The increase of cells with depolarized mitochondria became statistically significant with C22:0 and C24:0 (1 μM), and with C26:0 (0.1 μM). Similar percentages of cells with depolarized mitochondria were obtained in control and vehicle-treated cells (**Figure 1B**).

Incubation of SK-N-BE cells with C22:0, C24:0 and C26:0 also resulted in a marked and dose-dependent reduction in the total number of viable cells evaluated by counting in the presence of trypan blue. The decrease in the total number of viable cells became statistically significant with C22:0 (0.1 μM), and C24:0 and C26:0 (5 μM); similar number of cells was obtained in untreated cells (control) and vehicle – treated cells (**Figure 1C**).

Enhancement of reactive oxygen species production in C22:0-, C24:0-, and C26:0 – treated SK-N-BE cells

The effects of C22:0, C24:0 and C26:0 (5, 10, and/or 20 μM) on intracellular ROS production were evaluated after 48 h of treatment. Under these conditions, after staining with DHE and whatever the fatty acid considered, a marked increased of cells overproducing ROS, especially superoxide anions (HE-positive cells) **[55]**, was observed at 10 and 20 μM and no difference was observed in untreated cells (control) and vehicle – treated cells (**Figure 2**).

Evidence of oxidative stress damages in C22:0-, C24:0-, and C26:0 – treated SK-N-BE cells: decrease of intracellular reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation

The effects of C22:0, C24:0 and C26:0 (5, 10, and 20 μM) on anti-oxidant defenses were evaluated after 48 h of treatment by measuring the intracellular level of reduced glutathione (GSH) after staining with monochlorobimane (MCB). GSH was studied because it represents one of the major anti-oxidant defenses in the central nervous system [**65**]. Under treatment with C22:0, C24:0 and C26:0, an important decrease of cells containing GSH (MCB positive cells) was observed with all concentrations of fatty acids used. It was significant with C22:0 (5 and 10 μM) and C24:0 (5, 10 and 20 μM) whereas it was only significant with C26:0 (5 μM). Similar percentages of MCB positive cells were obtained in control and vehicle-treated cells (**Figure 3**).

Lipid peroxidation, including fatty acid degradation and cholesterol oxidation, was evaluated by the intracellular level of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and formation of cholesterol autoxidation products (resulting from oxidation of cholesterol at C7), respectively. Whereas increased cellular levels of 4-HNE were observed in C22:0, C24:0 and C26:0 (5, 10, 20 μM) - treated SK-N-BE cells, a significant difference was only found with C22:0 (20 μM) (**Figure 4**). When compared to vehicle treated cells, a significant increased of 7-ketocholesterol was found with C22:0 and C24:0 (10 μM) but not with C26:0 (10 μM) (**Figure 5A**). No significant increased of 7α-hydroxycholesterol, 7β-hydroxycholesterol, and cholesterol were observed in C22:0, C24:0 and C26:0 (10 μM) - treated SK-N-BE cells (**Figure 5B-D**). When compared to vehicle treated cells, significant increased of the ratio [total 7-hydroxycholesterols]/[cholesterol] was also found in C22:0, C24:0 and C26:0 (10 μM) - treated SK-N-BE cells (**Figure 5E**). Similar levels of 4-HNE, 7α-hydroxycholesterol, 7β-hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, cholesterol and [total 7-hydroxycholesterols] / [cholesterol] were measured in control and vehicle-treated cells (**Figures 4-5**).

Attenuation of C22:0-, C24:0-, and C26:0– induced mitochondrial dysfunctions and/or cell growth by DHA

Based on the neuroprotective activities of DHA (C22:6 n-3) and of its derivatives [**46**] and of its side effects observed in some conditions [**47, 48**], it was of interest to precise whether this fatty acid was able to attenuate or not cell dysfunctions induced by C22:0, C24:0 and C26:0. To this end the MTT, test was used. With this test, allowing evaluation of mitochondrial activity and/or cell growth, marked attenuation of the side effects induced by C22:0 (**Figure 6A**), C24:0 (**Figure 6B**), and C26:0 (**Figure 6C**) were found. Indeed, comparatively to untreated (control) or vehicle-treated cells, whereas lower values of MTT positive cells (expressed as % control) were observed under treatment with the different fatty acids, higher values of MTT positive cells were found (in the range of those observed in control or vehicle-treated cells) when fatty acids were associated with DHA (**Figure 6**). Noteworthy, DHA used alone (50, 100, and 150 μM) had no effect on mitochondrial activity and/or cell growth (**Figure 6**). These data show that DHA can attenuate C22:0-, C24:0- and C26:0-induced mitochondrial dysfunctions and/or cell growth inhibition.

Attenuation of C22:0-, C24:0-, and C26:0–induced ROS overproduction by DHA

We also attempted to determine whether DHA was able to attenuate C22:0-, C24:0-, and C26:0–induced ROS overproduction. To this end, after 48 h of culture in the absence or presence of C22:0, C24:0, and C26:0, associated or not with DHA, SK-N-BE cells were stained with H_2DCFDA, which permits ROS overproduction measurement. Noteworthy, comparatively to untreated (control) or vehicle-treated cells, an overproduction of ROS was observed in fatty acids-treated cells: higher values of H_2DCFDA positive cells (expressed as % control) were observed under treatment with the different fatty acids: C22:0 (**Figure 7A**),

C24:0 (**Figure 7B**), and C26:0 (**Figure 7C**). When DHA was used alone, it had no effect on ROS production at 50 and 100 µM; however, it was able to stimulate ROS production at 150 µM (**Figure** 7). Interestingly, DHA (50 µM) was only able to reduce C24:0-, and C26:0-induced ROS overproduction, whereas DHA (100 µM) was able to reduce C22:0-, C24:0-, and C26:0-induced ROS overproduction (**Figure** 7). DHA (150 µM) was most often not efficient on fatty acids-induced ROS overproduction, excepted with C24:0 (5 µM) (**Figure** 7). Thus, the ability of DHA to reduce C22:0-, C24:0- and C26:0-induced ROS overproduction depends on its concentration and on the fatty acid considered.

Discussion

The pathogenesis of AD is still poorly understood but some investigations sustain a linkage between lipid metabolism (cholesterol and fatty acid metabolism) and AD [**12, 13, 27**]. The accumulation of C22:0, C24:0 and C26:0 in cortical lesion of patients with AD supports peroxisomal dysfunctions given that the β-oxidation or the synthesis of these fatty acids occurs, at least in part, in the peroxisome [**27**]. As previous investigations performed on various cell types of the central nervous systems (especially glial cells) revealed that C22:0, C24:0 and C26:0 are able to trigger various cellular dysfunctions (mitochondrial changes, rupture of RedOx homeostasia) [**36, 37, 39**], which are known to contribute to the development of AD [**34, 35**], it was of interest i) to precise the activities of these fatty acids on human neuronal cells and ii) to evaluate whether DHA, which has been describe to favour neuronal survival and downregulation of amyloidogenic processing in AD cellular models [**46**], can reduce some of their side effects. On human neuronal cells SK-N-BE cultured in the absence or in the presence of C22:0, C24:0, and C26:0 associated or not with DHA, we observed that C22:0 -, C24:0 -, and C26:0 - induced side effects (mitochondrial dysfunctions, oxidative stress) which can be, or not, attenuated by DHA..

It is noteworthy that under treatment with C22:0, C24:0, and C26:0, in the range of concentrations found in the plasma of patients with different forms of peroxisomal diseases (C24:0 and C26:0: 1 to 5 µM) [**50, 66**] and with AD (C22:0 and C24:0: 5 to 10 µM) [**38**], more or less pronounced side effects (in agreement with those described on 158N murine oligodendrocytes [**36, 37**]) are detected on human neuronal cells SK-N-BE: inhibition of cell growth, mitochondrial dysfunctions, and oxidative stress induction. The differences observed between the different fatty acids could depend on their incorporation and repartition in neutral lipids and phospholipids [**37**]. As C22:0, C24:0 and C26:0 are able to induce various side effects on SK-N-BE cells, they could constitute potential cytotoxic compounds capable to contribute to neurodegeneration, especially in AD.

Under treatment with C22:0, C24:0 and C26:0, the decrease of MTT positive cells, giving information on mitochondrial activity and/or cell growth, and the reduced number of living cells measured by counting in the presence of trypan blue suggest substantial cellular damages and cell death induction. Such data are in agreement with those observed on 158N murine oligodendrocytes [**40**]. In this cell death process, the important loss of $\Delta\psi m$ measured by flow cytometry after staining with $DiOC_6(3)$ support the hypothesis that mitochondria might contribute to the cytoxic effects of these fatty acids [**38**].

We also confirm that C22:0, C24:0 and C26:0 induce ROS overproduction. Since H_2DCFDA allows to detect a wide number of ROS [**56**], whereas HE is considered as more specific for superoxide anions [**55**], this can explain the differences observed between these two dyes on C22:0-, C24:0-, and C26:0-treated cells. However, as we previously reported that extramitochondrial sources of ROS could be activated by these fatty acids, and could in turn contribute to inducing mitochondrial damages [**38**], it was of interest to precise the impact of oxidative stress at the cellular level. Here, we show, in agreement with data obtained on 158N murine oligodendrocytes [**36**], that the very long chain fatty acids (C24:0, C26:0) as well as

C22:0 cause a decrease level of GSH per cell measured after staining with monocholorobimane (MCB). As GSH level has been measured with MCB, which binds to thiol groups by an enzymatic reaction catalyzed by gluthatione S-transferases [**58**], the decrease in MCB positive cells observed under treatment with the fatty acids may be due to the lower glutathione S-transferase activity and or to lower levels of GSH. In turn, lower levels of GSH could contribute to increase ROS-induced cellular damages such as lipid peroxidation which has been revealed on C22:0-, C24:0-, and C26:0-treated SK-N-BE cells by increased levels of 4-HNE, 7-ketocholesterol, and total 7-hydroxycholesterols. Currently, 4-HNE has already been identified in patients with neurodegenerative diseases: AD [**67**], Parkinson's disease [**68**]. 4-HNE is a highly reactive aldehyde, which exhibits great reactivity with biomolecules (proteins, phospholipids, DNA) and generates a variety of intra- and inter-molecular covalents adducts which can contribute to amplifying cellular dysfunctions [**61**]. So, this could further modulate the activity of various metabolic pathways involved in the regulation of inflammation, oxidation, and cell death, wich are hallmarks of brain lesions in Alzheimer patients [**69**]. On the other hand, radical attack of cholesterol leading to intracellular accumulation of total 7-hydroxycholesterols (7-ketocholesterol + 7β-hydroxycholesterol + 7α-hydroxycholesterol), also considered as a sign of lipid peroxidation [**18**], was investigated. The increase of 7-hydroxycholesterols observed mainly depends on the important increase of 7KC, excepted for C26:0. Since 7KC has a wide range of biological activities, such as stimulation of ROS production and induction of cell death [**70**], this oxysterol could constitute a second messenger triggering oxidative stress and cell death. Noteworthy, as overproduction of ROS and lipid peroxidation observed on SK-N-BE cells evocates the data obtained on 158N murine oligodendrocytes [**36**], the present study supports that these side effects of C22:0, C24:0 and C26:0 do no depend on the neural cell type considered. These fatty acids could consequently lead to major brain damages. It was

therefore of importance to determine whether DHA, which is widely considered as a neuroprotector [**71**] but which can also induce various side effects such as neuritic injury, astrocytosis and oxidative stress [**47, 48**] was able to attenuate the cytotoxicity of C22:0, C24:0, and C26:0.

Interestingly, our data bring evidences that DHA can attenuate mitochondrial dysfunctions and/or cell growth whatever the concentrations used (50, 100, and 150 µM), whereas overproduction of ROS (whatever the fatty acid considered: C22:0, C24:0 and C26:0) was only reduced at 100 µM. However, the ability of DHA (150 µM) to stimulate ROS overproduction, when used alone, or to amplify ROS overproduction in the presence of C22:0, C24:0 and C26:0 even at the lowest and physiological concentration tested (5 µM), reveals that DHA can also have side effects suggesting that it must be used with caution in order to prevent neurodegeneration without inducing additional damages. It is therefore tempting to speculate that the therapeutic efficiency of DHA could strongly depend on its posology and on the conditions of treatment. This dual effects of DHA revealed in the present study could explain, at least in part, the important differences on the benefits of this fatty acid from one clinical study to another [**72**]. Therefore, a better knowledge of DHA-associated side effects, of its biological and pharmacological activities would probably greatly contribute to enhance its effectiveness in order to prevent and/or ameliorate cognitive decline. Currently, while DHA is able to counteract several side effects from amyloidogenic Aβ peptides [**73**] and to prevent tau hyperphosphorylation [**74**] contributing to the development of AD, additional information are required to determine its activity against molecules, such as C22:0, C24:0, and C26:0 which can play potential roles in the development of this disease. Nevertheless, whereas DHA side effects are not well known but could be controlled on the basis of pharmacokinetic studies allowing to determine its precise concentration in various body compartments, this compound remains an interesting and promising tool to prevent

neurodegeneration as it is known that it is a precursor of molecules with neuroprotective activities [**46, 75**].

In conclusion, our data obtained on human neuronal cells SK-N-BE underline that C22:0, C24:0 and C26:0 identified at increased levels in cortical lesions of patients with AD are able to inhibit cell growth, to trigger a loss of $\Delta\psi m$, and to induce oxidative stress associated with an overproduction of ROS, a decreased level of GSH, and a lipid peroxidation. Our study also revealed that DHA (C22:6 n-3) can also attenuate C22:0-, C24:0-, and C26:0-induced mitochondrial dysfunctions and/or cell growth inhibition, whereas it can also favor ROS overproduction especially at elevated concentration. Altogether, as mitochondrial dysfunctions, ROS overproduction and oxidative stress are hallmarks of AD, our data brings new evidences underlying the potential role of lipids, such as fatty acids (C22:0, C24:0, C26:0, and C22:6 n-3), to favor and/or counteract neurodegeneration leading to AD.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the INSERM, the Université de Bourgogne, ABASIM (Dijon, France), the Université de Monastir, and the Conseil Régional de Bourgogne. We acknowledge Mrs Anne Athias (Plateau Technique de Lipidomique/Université de Bourgogne, Hôpital du Bocage, Dijon, France) for her excellent technical assistance in GC/MS. We also acknowledge Mr Carl Bowazolo, Ms Aïcha Tsitohaina and Ms Hayet Iddir (BS students) for their helpful assistances for the study of GSH content and the evaluation of DHA effects.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

[1] Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. Lancet Neurol. 2013, 12, 207-16.

[2] Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol. 2010, 9, 119-28.

[3] Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. Cell Adh Migr. 2011, 5, 280-92.

[4] Kurz A, Perneczky R. Amyloid clearance as a treatment target against Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2011, 24 Suppl 2, 61-73.

[5] Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. Aβ toxicity in Alzheimer's disease. Mol Neurobiol. 2012, 45, 366-78.

[6] Lee G, Leugers CJ. Tau and tauopathies. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012, 107, 263-293.

[7] Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. Curr Alzheimer Res. 2010, 7, 656-64.

[8] Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1997, 41, 17-24.

[9] Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Arnold SE. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. Arch Neurol. 2004, 61, 378-84.

[10] Zinser EG, Hartmann T, Grimm MO. Amyloid beta-protein and lipid metabolism. Biochim Biophys Acta. 2007, 1768, 1991-2001.

[11] Grimm MO, Rothhaar TL, Hartmann T. The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism. Exp Brain Res. 2012, 217, 365-75.

[12] Björkhem I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. J. Intern. Med. 2006, 260, 493-508.

[13] Björkhem I, Cedazo-Minguez A, Leoni V, Meaney S. Oxysterols and neurodegenerative diseases. Mol. Aspects Med. 2009, 30, 171-9.

[14] Leoni V, Caccia C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. Biochimie 2013, 95, 595-12.

[15] Leoni V, Masterman T, Mousavi FS, Wretlind B, Wahlund LO, Diczfalusy U, Hillert J, Björkhem I. Diagnostic use of cerebral and extracerebral oxysterols. Clin. Chem. Lab. Med. 2004, 42, 186-91.

[16] Solomon A, Leoni V, Kivipelto M, Besga A, Oksengård AR, Julin P, Svensson L, Wahlund LO, Andreasen N, Winblad B, Soininen H, Björkhem I. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2009, 462, 89-93.

[17] Leoni V, Caccia C. Potential diagnostic applications of side chain oxysterols analysis in plasma and cerebrospinal fluid. Biochem Pharmacol. 2013, 86: 26-36.

[18] Iuliano L. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. Chem Phys Lipids. 2011; 164: 457-68.

[19] Vaya J, Schipper HM. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. J Neurochem. 2007, 102: 1727-37.

[20] Von Bernhardi R, Eugenín J. Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. Antioxid Redox Signal. 2012, 16, 974-1031.

[21] Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. Nat Rev Neurol. 2013, 9, 106-18.

[22] Terlecky SR, Koepke JI, Walton PA. Peroxisomes and aging. Biochim Biophys Acta. 2006, 1763, 1749-54.

[23] Titorenko VI, Terlecky SR. Peroxisome metabolism and cellular aging. Traffic. 2011, 12, 252-9.

[24] Schrader M, Fahimi HD. The peroxisome: still a mysterious organelle. Histochem Cell Biol. 2008, 129, 421-40.

[25] Del Río LA. Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. Arch Biochem Biophys. 2011, 506, 1-11.

[26] Antonenkov VD, Grunau S, Ohlmeier S, Hiltunen JK. Peroxisomes are oxidative organelles. Antioxid Redox Signal. 2010, 13: 525-37.

[27] Lizard G, Rouaud O, Demarquoy J, Cherkaoui-Malki M, Iuliano L. Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. J Alzheimers Dis. 2012, 29: 241-54.

[28] Santos MJ, Quintanilla RA, Toro A, Grandy R, Dinamarca MC, Godoy JA, Inestrosa NC. Peroxisomal proliferation protects from beta-amyloid neurodegeneration. J Biol Chem. 2005; 280: 41057-68.

[29] Shi R, Zhang Y, Shi Y, Shi S, Jiang L. Inhibition of peroxisomal β-oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and Aβ generation in the rat brain. Neurosci Lett. 2012, 528, 6-10.

[30] Cimini A, Moreno S, D'Amelio M, Cristiano L, D'Angelo B, Falone S, Benedetti E, Carrara P, Fanelli F, Cecconi F, Amicarelli F, Cerù MP. Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes. J Alzheimers Dis. 2009; 18: 935-52.

[31] Fanelli F, Sepe S, D'Amelio M, Bernardi C, Cristiano L, Cimini A, Cecconi F, Ceru' MP, Moreno S. Age-dependent roles of peroxisomes in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2013; 8: 8. doi: 10.1186/1750-1326-8-8.

[32] Savary S, Trompier D, Andréoletti P, Le Borgne F, Demarquoy J, Lizard G. Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation. Curr Drug Metab. 2012; 13: 1358-70.

[33] Kou J, Kovacs GG, Höftberger R, Kulik W, Brodde A, Forss-Petter S, Hönigschnabl S, Gleiss A, Brügger B, Wanders R, Just W, Budka H, Jungwirth S, Fischer P, Berger J. Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 2011; 122: 271-83.

[34] Cai Z, Zhao B, Ratka A. Oxidative stress and β-amyloid protein in Alzheimer's disease. Neuromolecular Med. 2011; 13: 223-50.

[35] Maruszak A, Żekanowski C. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2011; 35: 320-30.

[36] Baarine M, Ragot K, Athias A, Nury T, Kattan Z, Genin EC, Andreoletti P, Ménétrier F, Riedinger JM, Bardou M, Lizard G. Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF-α on oligodendrocytes and astrocytes. Neurotoxicology 2012, 33, 212-8.

[37] Baarine M, Andréoletti P, Athias A, Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Vejux A, Riedinger JM, Kattan Z, Bessede G, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, Lizard G. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid—treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. Neuroscience 2012, 213, 1-18.

[38] Zarrouk A, Vejux A, Nury T, El Hajj HI, Haddad M, Cherkaoui-Malki M, Riedinger JM, Hammami M, Lizard G. Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-N-BE). Oxid Med Cell Longev. 2012; 2012:623257. doi: 10.1155/2012/623257.

[39] Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. Hum. Mol. Genet. 2008, 17, 1750-61.

[40] Kahn E, Baarine M, Dauphin A, Ragot K, Tissot N, Seguin A, Ménétrier F, Kattan Z, Bachelet CM, Frouin F, Lizard G. Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via LAURDAN and FAMIS spectral image analysis. Cytometry A. 2011; 79: 293-305.

[41] Pocernich CB, Lange ML, Sultana R, Butterfield DA. Nutritional approaches to modulate oxidative stress in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2011; 8: 452-69.

[42] Thaipisuttikul P, Galvin JE. Use of medical foods and nutritional approaches in the treatment of Alzheimer's disease. Clin Pract (Lond). 2012; 9: 199-209.

[43] Lukiw WJ, Bazan NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. J Nutr. 2008; 138: 2510-4.

[44] Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. J Clin Invest. 2005; 115: 2774-83.

[45] Bazan NG. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. J Lipid Res. 2009; 50 Suppl: S400-5.

[46] Stark DT, Bazan NG. Neuroprotectin D1 induces neuronal survival and downregulation of amyloidogenic processing in Alzheimer's disease cellular models. Mol Neurobiol. 2011; 43: 131-8.

[47] Tanito M, Brush RS, Elliott MH, Wicker LD, Henry KR, Anderson RE. High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration. J Lipid Res. 2009; 50: 807-19.

[48] Muntané G, Janué A, Fernandez N, Odena MA, Oliveira E, Boluda S, Portero-Otin M, Naudí A, Boada J, Pamplona R, Ferrer I. Modification of brain lipids but not phenotype in alpha-synucleinopathy transgenic mice by long-term dietary n-3 fatty acids. Neurochem Int. 2010; 56: 318-28.

[49] Singh I, Kishimoto Y. Effect of cyclodextrins on the solubilization of lignoceric acid, ceramide, and cerebroside, and on the enzymatic reactions involving these compounds. J. Lipid Res. 1983, 24: 662-5.

[50]- Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozawa N, Wanders RJ, Kondo N. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. Brain Dev. 2003, 25: 481-7.

[51] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983, 65: 55-63.

[52] Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog PJ. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. Biochem Int. 1992, 27: 501-10.

[53] Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and proinflammatory characteristics of different oxysterols. Cell Biol Toxicol. 2005; 21: 97-114.

[54] Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. J. Immunol. 1983, 130: 1910-7.

[55] Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin. J Leukoc Biol. 1990; 47: 440-8.

[56] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br. J. Pharmacol. 2004, 142: 231-55.

[57] Lizard G, Gueldry S, Sordet O, Monier S, Athias A, Miguet C, Bessede G, Lemaire S, Solary E, Gambert P. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. FASEB J. 1998, 12: 1651-63.

[58] Hedley DW, Chow S. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. Cytometry 1994, 15: 349-58.

[59] Khatoon F, Moinuddin, Alam K, Ali A. Physicochemical and immunological studies on 4-hydroxynonenal modified HSA: implications of protein damage by lipid peroxidation products in the etiopathogenesis of SLE. Hum. Immunol. 2012, 73: 1132-9.

[60] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic. Biol. Med. 1991, 11: 81-128.

[61] Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. J Biol Chem. 2008; 283(32): 21837-41.

[62] Pikuleva IA. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. Drug Metab Dispos. 2006; 34: 513-20.

[63] Smith LL. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. Lipids. 1996; 3: 453-87.

[64] Ragot K, Mackrill J, Zarrouk A, Nury T, Aires V, Jacquin A, Athias A, Barros JP, Véjux A, Riedinger JM, Delmas D, Lizard G. Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. Biochem. Pharmacol. 2013, 86:67-79.

[65] Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med. 2009; 30: 1-12.

[66] Valianpour F, Selhorst JJ, van Lint LE, van Gennip AH, Wanders RJ, Kemp S. Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. Mol Genet Metab. 2003; 79: 189-96.

[67] Dang TN, Arseneault M, Murthy V, Ramassamy C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. Curr Mol Pharmacol. 2010; 3: 66-78.

[68] Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chong WL, Looi WF, Huang SH, Wang H, Chan YH, Halliwell B. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. Free Radic Biol Med. 2010; 48: 560-6.

[69] Singh S, Kushwah AS, Singh R, Farswan M, Kaur R. Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2012; 16: 1651-64.

[70] Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. Mol Aspects Med. 2009; 30: 153-70.

[71] Cole GM, Ma QL, Frautschy SA. Dietary fatty acids and the aging brain. Nutr Rev. 2010; 68 Suppl 2:S102-11.

[72] Cederholm T, Palmblad J. Are omega-3 fatty acids options for prevention and treatment of cognitive decline and dementia? Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010; 13: 150-5.

[73] Veszelka S, Tóth AE, Walter FR, Datki Z, Mózes E, Fülöp L, Bozsó Z, Hellinger E, Vastag M, Orsolits B, Környei Z, Penke B, Deli MA. Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid-β Induced Toxicity in Cells of the Neurovascular Unit. J Alzheimers Dis. 2013; 36: 487-501.

[74] Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal

kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. J Neurosci. 2009; 29: 9078-89.

[75] Dyall SC, Michael-Titus AT. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. Neuromolecular Med. 2008; 10: 219-35.

Figure Legends

Figure 1: Evaluation of the effects of C22:0, C24:0 and C26:0 on mitochondrial activity and cell proliferation with different methods: MTT assay; flow cytometric measurement of transmembrane mitochondrial potential (Δ□m) with $DiOC_6(3)$; cell counting of viable cells in the presence of trypan blue. SK-N-BE cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α cyclodextrin (1mg/mL) (vehicle), or of C22:0, C24:0,or C26:0 used at 0.1 - 20 μM. Data shown are mean ± SD from two independent experiments conducted in triplicates. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by * (Mann Whitney test; * $P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

Figure 2: Flow cytometric evaluation of the effects of C22:0, C24:0 and C26:0 on superoxide anion production. SK-N-BE cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1mg/mL) (vehicle) or of C22:0, C24:0, or C26:0 used at 5, 10, and 20 μM. The production of superoxide anion on whole cells (HE-positive cells) was determined after staining with DHE; data are expressed as % control. Data shown are mean ± SD from three independent experiments. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by * (Mann-Whitney test; * $P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

Figure 3: Evaluation by fluorescence microscopy of the effects of C22:0, C24:0 and C26:0 on the cellular level of reduced glutathione (GSH) content. SK-N-BE cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1mg/mL) (vehicle) or of C22:0, C24:0, or C26:0 used at 5, 10, and 20 µM. The GSH content per cell was revealed after staining with monochlorobimane (MCB) (MCB positive cells are blue/green under UV light excitation). For each assay, the percentage of MCB positive cells was determined. Data shown are mean ± SD from three independent experiments; data are expressed as % control. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by * (Mann-Whitney test; * $P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

Figure 4: Flow cytometric evaluation of the effects of C22:0, C24:0 and C26:0 on the cellular level of 4-hydroxynonenal (4-HNE). SK-N-BE cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1mg/mL) (vehicle) or of C22:0, C24:0, or C26:0 used at 5, 10, and 20 µM. The intracellular content of 4-HNE per cell was determined by flow cytometry by an indirect immunofluorescence staining procedure. For each assay the mean fluorescence intensity (MFI) of 4-HNE positive cells was determined; data are expressed as % control. Data shown are mean ± SD from three independent experiments. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by * (Mann-Whitney test; * $P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

Figure 5: Measurement of oxysterols oxidized at C7 (7α-hydroxycholesterol, 7β-hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol) and of cholesterol by gas chromatography coupled with mass spectrometry. SK-N-BE cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1mg/mL) (vehicle) or of C22:0, C24:0, or C26:0 used at 10 µM. The cellular content of 7α-hydroxycholesterol, 7β-hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol and the ratio [total 7-hydroxycholesterols]/[cholesterol] were determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Data shown are mean ± SD from three independent experiments. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by * (Mann-Whitney test; * $P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells.

Figure 6: Evaluation of the effect of DHA (C22:6 n-3) on C22:0 -, C24:0 -, and C26:0 – induced mitochondrial dysfunctions and/or cell growth inhibition with the MTT test. SK-N-BE cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1mg/mL) (vehicle) or of C22:0, C24:0, or C26:0 (5, 10, and 20 µM) without or with DHA (50, 100, and 150 µM). Data shown are mean ± SD from two to three independent experiments realized in triplicate. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by * (Mann-Whitney test; * $P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells. Significance of the difference between fatty acid-treated cells and (fatty acid + DHA)-treated cells is indicated by # (Mann-Whitney test; # $P < 0.05$).

Figure 7: Flow cytometric evaluation of the effect of DHA (C22:6 n-3) on C22:0-, C24:0-, and C26:0–induced ROS overproduction after staining with H_2DCFDA. SK-N-BE cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of α-cyclodextrin (1mg/mL) (vehicle) or of C22:0, C24:0, or C26:0 (5, 10, and 20 µM) without or with DHA (50, 100, and 150 µM). Data shown are mean ± SD from two to three independent experiments realized in triplicate. Significance of the difference between vehicle- and fatty acid-treated cells is indicated by * (Mann-Whitney test; * $P < 0.05$). No significant difference was observed between control and vehicle-treated cells. Significance of the difference between fatty acid-treated cells and (fatty acid + DHA)-treated cells is indicated by # (Mann-Whitney test; # $P < 0.05$).

Figure

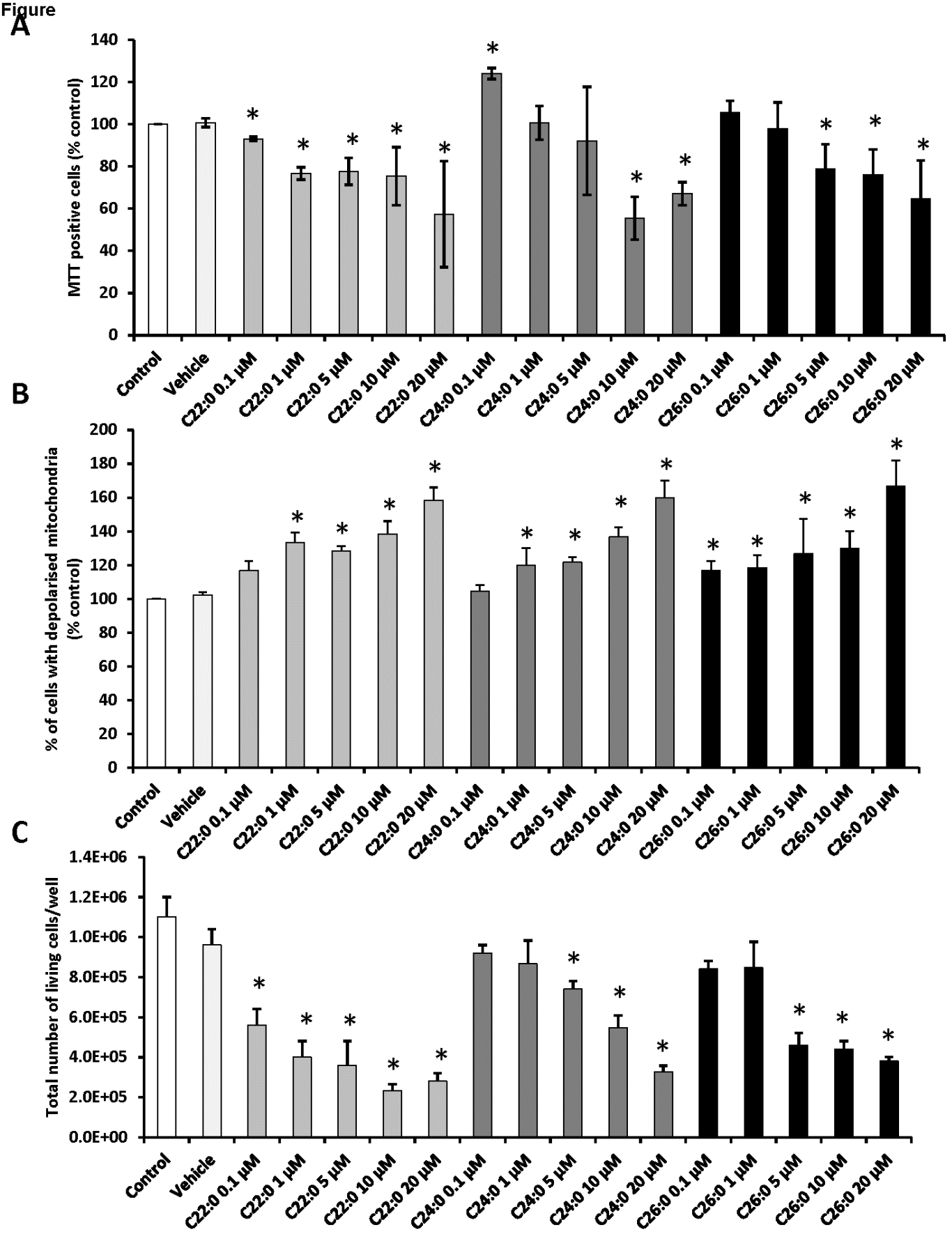


Figure 1 – (Zarrouk A et al.)

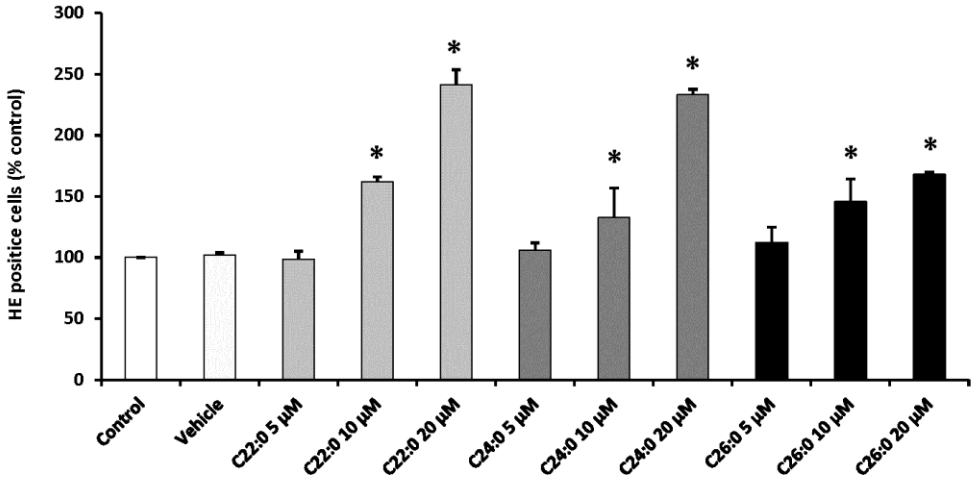


Figure 2 - (Zarrouk A et al.)

Figure

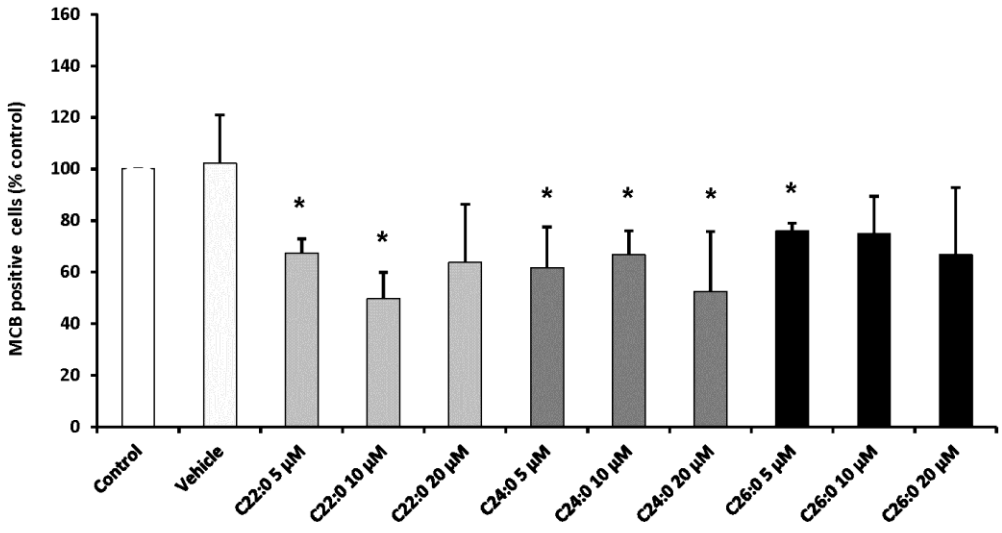


Figure 3 – (Zarrouk A et al.)

Figure

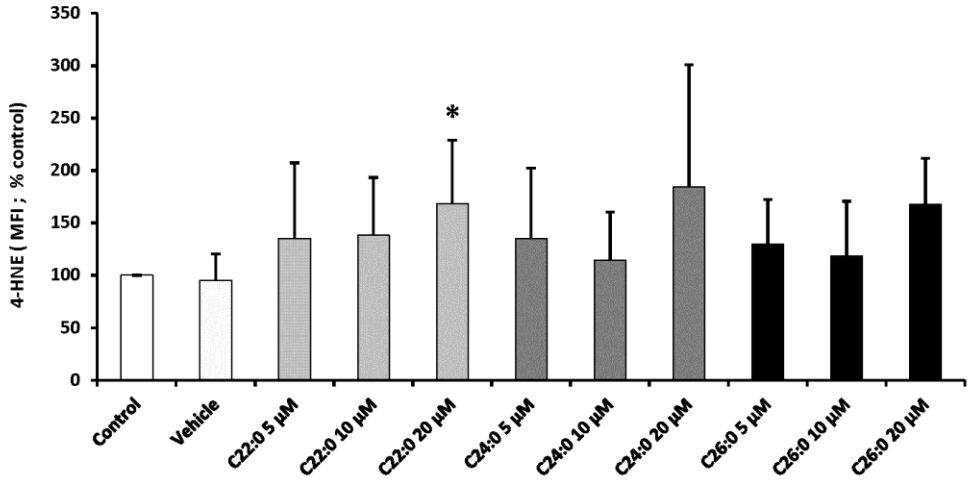


Figure 4 – (Zarrouk A et al.)

Figure

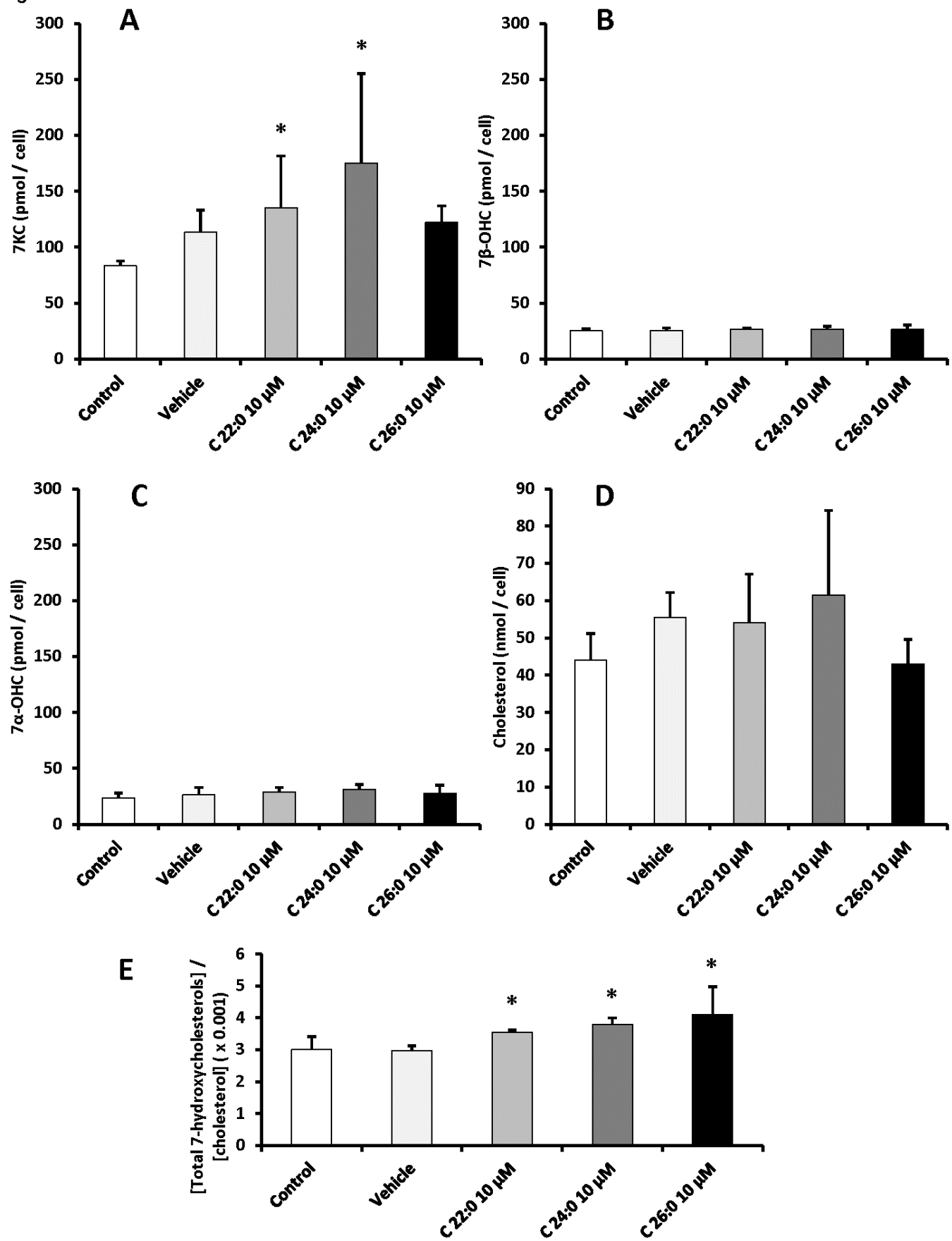


Figure 5 – (Zarrouk A et al.)

Figure

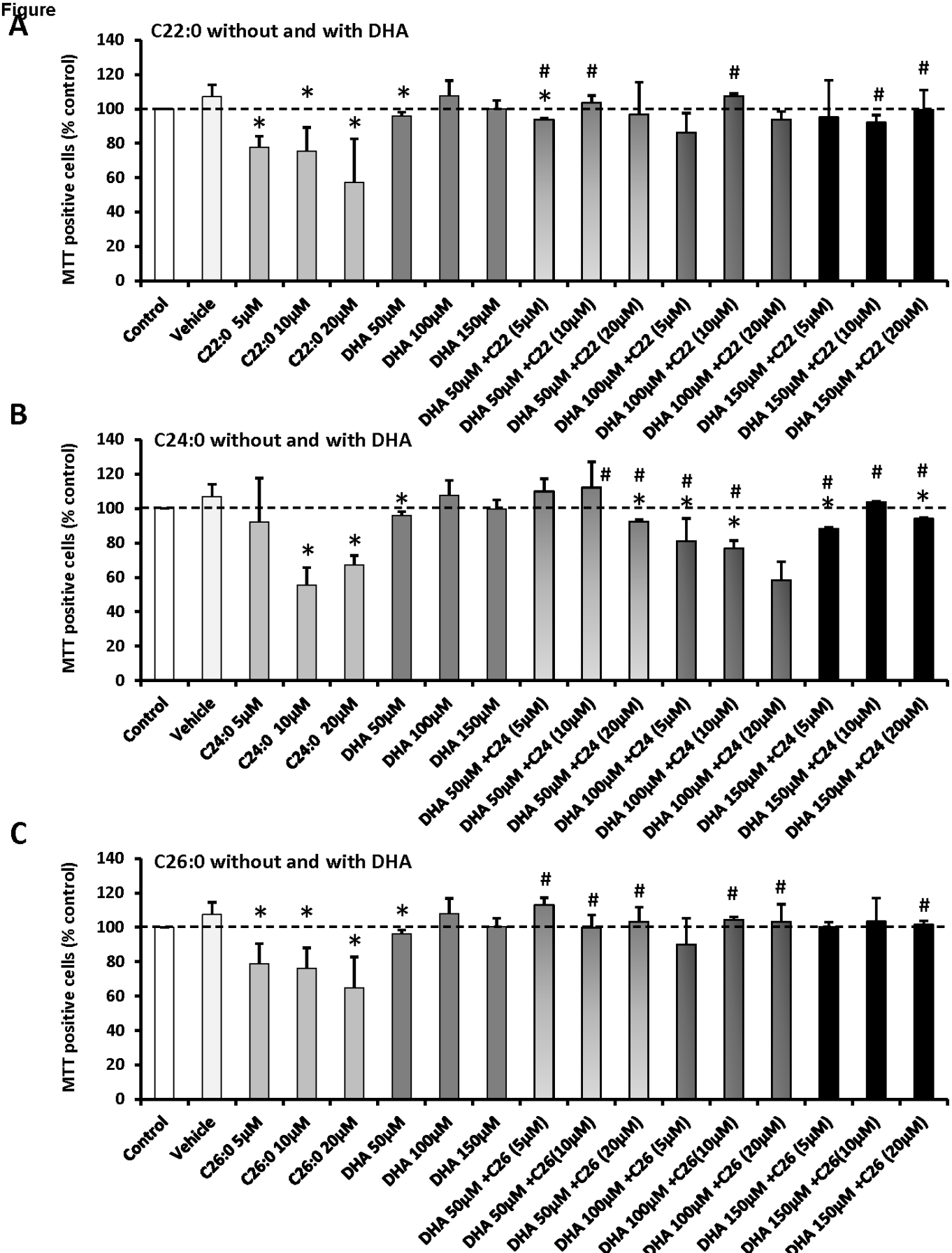


Figure 6 – (Zarrouk A et al.)

Figure

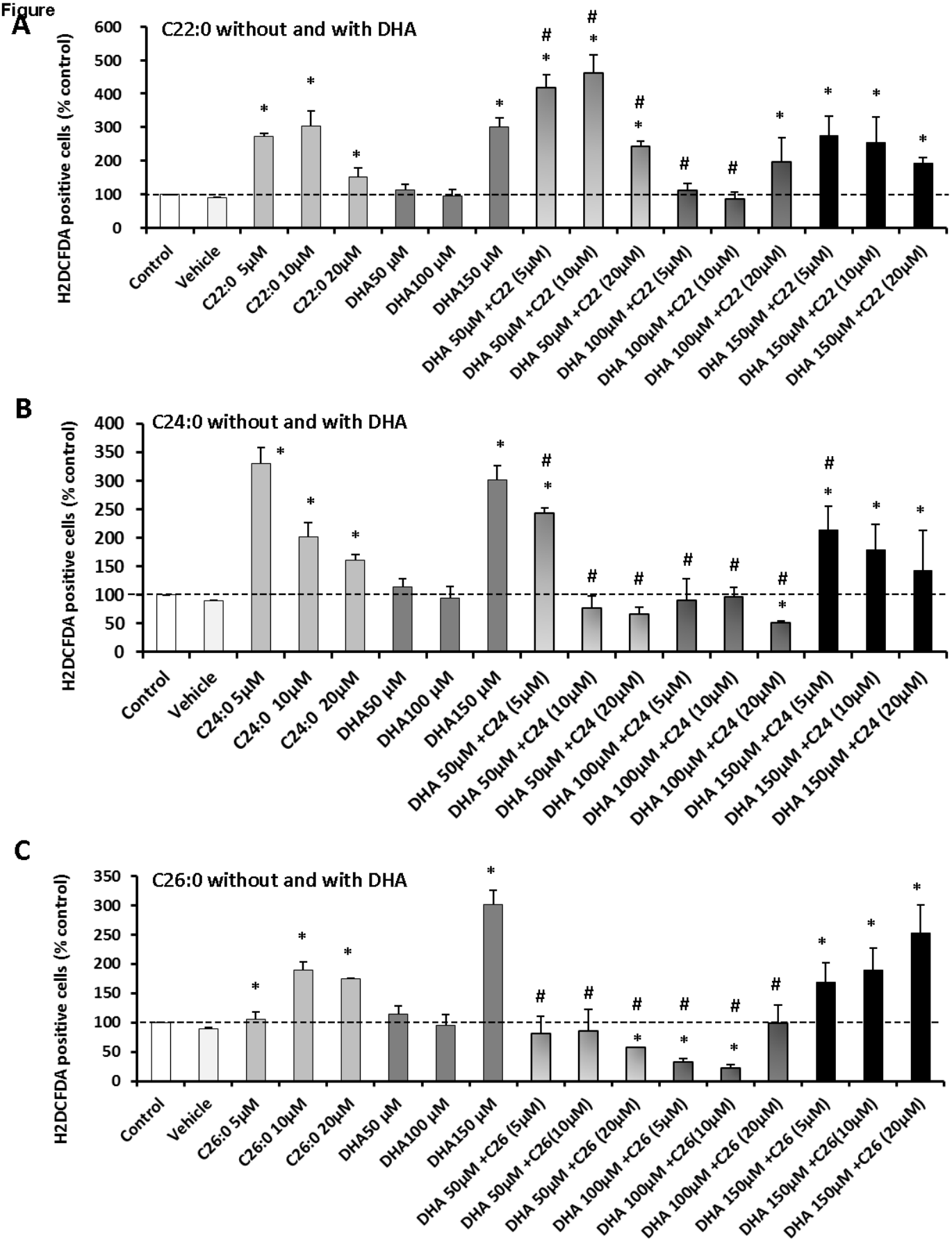


Figure 7 – (Zarrouk A et al.)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

DIRECTION DES BREVETS

37

36 - 1 / 1 - 00000 - 1

REÇU LE
18 SEP. 2013
CABINET GUIU

CABINET GUIU JURISPATENT
10 RUE PAUL THENARD
21000 DIJON

Objet : Demande de brevet d'invention ou de certificat d'utilité N°: **13 58513**

AUTORISATION DE DIVULGATION ET D'EXPLOITATION
Articles L. 612-8 à L. 612-10
du code de la propriété intellectuelle.

V/Réf : UBFMO1-FR-1

Courbevoie, le 12 septembre 2013

Madame, Monsieur,

J'ai l'honneur de vous faire connaître qu'après avis du Ministre chargé de la Défense, habilité à prendre connaissance, à titre confidentiel, des demandes de brevet ou de certificat d'utilité auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle, l'autorisation de divulguer et d'exploiter l'invention, objet de la demande ci-dessus désignée, vous est accordée.

Cette autorisation a pour seul effet de vous délier de l'obligation de secret à laquelle vous étiez tenu, à l'égard des impératifs de la Défense Nationale.

L'instruction de votre dossier va se poursuivre en vue d'examiner sa conformité au regard des exigences des textes législatifs et règlementaires en vigueur.

Veuillez agréer, Madame, Monsieur, l'expression de ma considération distinguée.

Pour le directeur général de l'Institut national
de la propriété industrielle
Le directeur des brevets

Philippe CADRE

Siège
15 rue des Minimes - CS 50001
92677 COURBEVOIE Cedex
Téléphone : 0820 213 213
Télécopie : +33 (0)1 56 65 86 00

INPI Direct : 0820 210 211
www.inpi.fr – contact@inpi.fr

Établissement public national
créé par la loi n° 51-444 du 19 avril 1951

04903708 0191197141 pli:37 - page:43

afaq ISO 9001 Qualité AFNOR CERTIFICATION
L'INPI est certifié ISO 9001

Pli:37 Page:43

Fiche De Renseignements

Profil de démences et de la maladie d'Alzheimer et Alimentation

N° de la fiche :……

Nom : Prénom :

Age : Sexe : M [__] F [__]

Situation familiale : Marié(e) [__] Célibataire [__] Veuf (ve) [__] divorcé(e) [__]

Profession :

Adresse :

Tel :

Hôpital : N°Dossier : Matricule :

Service : Médecin traitant :

Facteurs de risque :

- Niveau d'éducation : aucun [__] Koteb [__] primaire [__] secondaire [__] supérieur [__]
- Poids : Taille : TT :
- Fumeur : oui [__] Non [__] Arrêt tabac [__] le nombre total de paquets / an

  Durée avant l'arrêt ? Arrêt tabac depuis [__]
- Alcoolique : oui [__] non [__] Nombre de verre ?
- Age de découverte de la maladie d'Alzheimer :
- Consanguinité parentale : oui [__] non [__] degré [__]
- Cas similaires dans la famille : oui [__] non [__]
- Antécédents de traumatismes crâniens: oui [__] non [__]
- Situation sociale : vivre seule [__] en famille [__] avec conjoint [__]
- Si en famille ; Nombre d'enfants et de petits enfants :

Maladies associées :

HTA : oui [__] non [__] Date du 1er diagnostic :

Diabète : oui [__] non [__] Date du 1er diagnostic :

Dyslipidémie : oui [__] non [__] Date du 1er diagnostic :

Rétinopathie : oui [__] non [__] Date du 1er diagnostic :

Neuropathie : oui [__] non [__] Date du 1er diagnostic :

Examens cliniques :

- Score du test MMSE :
- Trouble de la mémoire : oui [__] non [__]
- Détérioration de la capacité de langage : oui [__] non [__]
- Perturbation du comportement : oui [__] non [__]
- Trouble praxique : oui [__] non [__]

- Trouble gnosique : oui [__] non [__]
- Trouble de la concentration : oui [__] non [__]
- Myoclonies: oui [__] non [__]
- Crises d'épilepsie: oui [__] non [__]
- Syndrome extrapyramidal : oui [__] non [__]
- Syndrome pyramidal : oui [__] non [__]
- Syndrome frontal : oui [__] non [__]

Traitement d'Alzheimer en cours :

Traitement des maladies associées : Citer tous les médicaments :

Imagerie Médicale :

Imagerie par scanner X ou IRM: oui [__] non [__]

Conclusion :

Examens biologiques :

1. ***Analyse du sang :***

   ❖ ***Analyse de routine :***

- Glycémie à jeûn (mmol/l) :
- Uricémie (mmol/l) :
- NFS : lymphocytes (10^3/ml) : GB (10^3/ml) : plaquettes :
- Hémoglobine :
- VGM (Volume globulaire moyen) (fl) :
- T3, TSH :
- Cholestérolémie totale (mmol/l) :
- HDL-C (mmol/l):
- LDL-C (mmol/l):
- Triglycéridémie (mmol/l) :
- Apo B (g/l) :
- ApoA1 (g/l) :
- ASAT :
- ALAT :
- CRP us :

Fiche de renseignement

Profil de démences et de la maladie d'Alzheimer et Alimentation

N° de la Fiche :

Analyse spécialisées

- ***Biomarqueurs de l'inflammation:***
- TNFα (pg/ml) :
- IL-1β (pg/ml) :

Profil d'Acides gras :

- Les acide gras érythrocytaires (µg/ml) :
- Les acide gras plasmatiques (µM) :
- Les acide gras trans plasmatique (µM) :
- Les acide gras trans érythrocytaire (µg/ml) :
- Plasmalogène-C16:0 :
- Acide phytanique érythrocytaire et plasmatique (µM) :

Dosage des bio-marqueurs du stress oxydant:

- GPx (U/mg de protéine) :
- SOD (U/mg de protéine) :
- MDA (nmoles/mg de protéine):
- Catalase (U/mg de protéine):
- Diènes conjuguées (µmol d'hydroperoxydes /mg de protéine) :
- Protéines carbonylées (nM de carbonyles /mg de protéine):
- GSH plasmatique (mg/ml/mg de protéine)
- GSH érythrocytaire (mg/ml/mg de protéine)

Résumé : Au niveau du cerveau et dans le plasma de malades atteints de maladie d'Alzheimer (MA), l'accumulation de C22:0 et d'acides gras à très longue chaîne (C24:0 ; C26:0), la diminution d'acide docosahexaenoique (C22:6 n-3) et les modifications quantitatives et qualitatives de plasmalogènes suggèrent l'implication de dysfonctions peroxysomales. En fonction de ces constatations, les activités biologiques de C22:0, C24:0 et C26:0 ont été recherchées sur des cellules neuronales humaines SK-N-BE. La lipotoxicité des acides gras (C22:0, C24:0 et C26:0) induit divers effets au niveau des mitochondries (modifications topographiques, morphologiques et fonctionnelles), conduit à une rupture de l'équilibre RedOx (surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène, modification de l'activité des enzymes anti-oxydantes : catalase, SOD, GPx), à une peroxydation lipidique et à une désorganisation du cytosquelette (microfilaments d'actine, tubuline, neurofilaments). Ces acides affectent aussi l'amyloïdogenèse et la tauopathie. L'amyloïde béta favorise aussi l'accumulation intracellulaire de C22:0, C24:0 et C26:0. A fortes concentrations, ces acides gras induisent une mort cellulaire non apoptotique. Par ailleurs, les données immunohistochimiques en relation avec l'expression de marqueurs peroxysomaux (ABCD1, ABCD2, ABCD3, ACOX1 et catalase) au niveau du cerveau de souris transgéniques APP PS1 ΔE9 ainsi que les profil d'acide gras obtenus sur le cerveau et le sang de ces souris suggèrent qu'elles pourraient constituer un bon modèle pour l'étude des relations entre MA et métabolisme peroxysomal. L'étude clinique réalisée sur plasma et érythrocytes de malades déments (MA, démences vasculaires, autres démences) montre une forte accumulation de C22:0, C24:0 et C26:0. Le C26:0 pourrait constituer un excellent biomarqueur de la MA. Le C18:0 est aussi augmenté ainsi que les acides gras n-6. De forts indices de stress oxydant sont aussi révélés. Dans son ensemble, le travail réalisé suggère que les acides gras (C22:0, C24:0 et C26:0) ainsi que le métabolisme des acides gras en relation avec le métabolisme peroxysomal pourraient contribuer à la neurodégénéréscence associée aux démences incluant la MA.

Mots clés : acide docosanoIque (C22:0), acides gras à très longue chaîne, acide tétracosanoique (C24:0), acide hexacosanoique (C26:0), lipotoxicité, biomarqueurs, souris transgénique APP PS1 ΔE9, peroxysome, maladie d'Alzheimer, démences.

Abstract : In the brain and in the plasma of patients with Alzheimer's disease (AD), marked accumulation of C22:0 and of very long chain fatty acids (C24:0 ; C26:0) have been reported. Important decreases of docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3) have also been described as well as quantitative and qualitative modifications of plasmalogens. Altogether, these lipid modifications suggest an implication of peroxisomal metabolism disorders in the physiopathology of AD. Therefore, the biological activities of C22:0, C24:0 and C26:0 have been studied on human neuronal cells SK-N-BE. On these cells, the lipotoxicity of fatty acids (C22:0, C24:0 and C26:0) leads to various cellular modifications: topographical, morphological and functional changes at the mitochondrial level, rupture of RedOx equilibrium (overproduction of reactive oxygen species, modification of the activity of enzymes involved in anti-oxidant defenses: catalase, SOD, GPx), lipid peroxidation, cytoskeleton disorganization (actin microfilaments, tubulin, neurofilaments). These fatty acids also favor amyloidogenesis and tauopathy. At elevated concentrations, these fatty acids trigger a non apoptotic mode of cell death. Moreover, data obtained by immunohistochemistry with antibodies raised against peroxisomal components (ABCD1, ABCD2, ABCD3, ACOX1 and catalase) on histological tissue sections of the brain of transgenic mice APP PS1 ΔE9 as well as lipidomic analysis performed on the blood and the brain of these mice suggest that they could constitute interesting model to study the relationships between AD and peroxisomal metabolism. The clinical study performed on the plasma and on the erythrocytes of patients with dementia (AD, vascular dementia, other dementia) revealed an important accumulation of C22:0, C24:0 and C26:0. Hexacosanoic acid (C26:0) might constitute an excellent biomarker of AD. The fatty acid C18:0 and (n-6) fatty acids have also been found at increased concentrations. A strong oxidative stress has also been revealed. Altogether, our data support that the fatty acids (C22:0, C24:0 and C26:0) as well as the fatty acid metabolism depending on the peroxisome might contribute to neurodegeneration leading to various types of dementia including AD.

Key words :docosanoic acid (C22:0), very long chain fatty acids, tetracosanoic acid (C24:0), hexacosanoic acid (C26:0), lipotoxicity, biomarkers, transgenic mouse APP PS1 ΔE9, peroxisome, Alzheimer's disease, demencia.