

UNIVERSITE DE MONASTIR

Ecole Doctorale Sciences Biologiques, Biotechnologie et Santé

Université de BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Ecole Doctorale Environnement – Santé

THESE de DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du titre

Docteur en Sciences Biologiques & Biotechnologiques

Docteur en Biochimie et Biologie Moléculaire

Par

Randa SGHAIER

Caractérisation des activités cytoprotectrices de molécules utilisées dans le traitement de la sclérose en plaques (diméthyle fumarate, monométhyle fumarate, biotine) sur des oligodendrocytes 158N : impact sur le stress oxydant, le statut mitochondrial, le statut lipidique, l'apoptose et l'autophagie

Soutenue publiquement le 8 novembre 2019 à Monastir (TUNISIE) devant le Jury :

Mr Abderraouf KENANI	Professeur, Université de Monastir	Président du jury
Mr Mohamed HAMMAMI	Professeur, Université de Monastir	Rapporteur
Mme Isabelle DELTON	Professeure, INSA de Lyon	Rapporteur
Mme Delphine MEFFRE	Maître de Conférences HDR, Université Paris Descartes	Examineur
Mr Ahmed Slahedine MASMOUDI	Professeur, Université de Manouba	Directeur de Thèse
Mr Gérard LIZARD	Chargé de Recherche Inserm, Université de Bourgogne	Directeur de Thèse
Mme Amira ZARROUK	Maitre-Assistante, Université de Monastir	Membre Invité

Travail réalisé au Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine de Sousse, Tunisie, au Laboratoire LR12ES05 (Nutrition, Aliment Fonctionnel et Santé Vasculaire), Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie, au Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Géo Ressources, LR11ES31, Institut Supérieur de Biotechnologie Sidi Thabet, Tunisie et au laboratoire Bio-PeroXIL, 'Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique' EA7270 / Inserm, Dijon, France

Les travaux de Thèse présentés ont été réalisés dans les laboratoires suivants :

- *Laboratoire Bio-peroxIL « Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique » EA7270 (Université de Bourgogne-Franche-Comté / Inserm) Dijon (France), sous la direction du Dr Gérard LIZARD*

Et

- *Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine de Sousse, Tunisie ainsi qu'au Laboratoire LR12ES05 (Nutrition, Aliment Fonctionnel et Santé Vasculaire), Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie sous la direction du Pr Ahmed Slaheddine MASMOUDI (Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Géo Ressources, LR11ES31, Institut Supérieur de Biotechnologie Sidi Thabet, Tunisie Et du Dr Amira ZARROUK (Sousse / Monastir, Tunisie)*

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, de l'Université de Bourgogne-Franche-Comté, et du CHU de Dijon

RESUME

Le stress oxydant, les dysfonctions mitochondriales et les altérations du métabolisme lipidique sont un dénominateur commun des maladies neurodégénératives (MN), comme la sclérose en plaques (SEP). Dans des conditions de stress oxydant, des oxystérols sont formés par auto-oxydation du cholestérol. Dans ces conditions, du 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC) est souvent trouvé à des taux élevés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et/ou le plasma de patients atteints de MN comme la SEP.

Dans ce contexte, une étude clinique préliminaire sur le LCR et le plasma de patients atteints de SEP RR a été réalisée pour rechercher des biomarqueurs du métabolisme lipidique et du stress oxydant et déterminer d'éventuelles corrélations entre le 7 β -OHC et les différents mécanismes associés à la pathogenèse de la SEP. Une étude *in vitro* a été réalisée sur des oligodendrocytes murins 158N afin d'évaluer les activités biologiques et cytoprotectrices vis-à-vis du 7 β -OHC de trois molécules utilisées dans le traitement de la SEP : le diméthyle fumarate (DMF), son métabolite majeur le monométhyle fumarate (MMF) et la biotine. Pour cela, différentes techniques de biologie cellulaire et moléculaire, de cytométrie en flux, de microscopie et de biochimie analytique ont été utilisées.

Nos résultats ont révélé une augmentation du taux de HODE associée à une augmentation du taux plasmatique d'oxystérols, notamment 7KC et 7 β -OHC, ainsi qu'une altération du métabolisme d'acides gras au niveau du LCR et du plasma des patients SEP. L'étude *in vitro* a montré que le DMF, le MMF et la biotine atténuent les effets délétères du 7 β -OHC à savoir : la mort cellulaire par oxyapoptophagie définie par l'association de stress oxydant, d'apoptose et d'autophagie. Le DMF, le MMF et la biotine corrigent ainsi le déséquilibre du statut RedOx caractérisé par une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, atténuent l'activité accrue des principales enzymes anti-oxydantes et l'oxydation de macromolécules (protéines, lipides) induites par le 7 β -OHC. Le DMF, le MMF et la biotine atténuent également les dysfonctionnements mitochondriaux et peroxysomaux, les altérations de l'expression de protéines de myéline (PLP, MBP) ainsi que les modifications du profil lipidique.

Notre étude apporte des arguments en faveur de la capacité du DMF, du MMF et de la biotine, à atténuer les altérations majeures associées à la mort des oligodendrocytes pouvant contribuer à la démyélinisation. Ceci renforce l'intérêt porté au DMF, au MMF et à la biotine pour le traitement de la SEP mais aussi d'autres maladies neurodégénératives.

Mots-clés : Sclérose en plaques, diméthyle fumarate, biotine, 7 β -hydroxycholestérol, oxyapoptophagie, stress oxydant, mitochondrie, peroxysome.

ABSTRACT

Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and alterations in lipid metabolism are a common denominator of neurodegenerative diseases (ND), such as multiple sclerosis (MS). Under conditions of oxidative stress, oxysterols are formed by auto-oxidation of cholesterol. Under these conditions, 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC) is often found at elevated levels in cerebrospinal fluid (CSF) and / or plasma of patients with ND such as MS.

In this context, a preliminary clinical study on CSF and plasma of patients with RR MS was conducted to search for biomarkers of lipid metabolism and oxidative stress and to determine possible correlations between 7 β -OHC and the various associated mechanisms to the pathogenesis of MS. An *in vitro* study was carried out on 158N murine oligodendrocytes to evaluate the biological and cytoprotective activities towards 7 β -OHC of three molecules used in the treatment of MS: dimethyl fumarate (DMF), its major metabolite monomethyl fumarate (MMF) and biotin. For this, different techniques of cellular and molecular biology, flow cytometry, microscopy and analytical biochemistry were used.

Our results revealed an increase in the HODE rate associated with an increase in the plasma oxysterol level, notably 7KC and 7 β -OHC, as well as an alteration of fatty acid metabolism in the CSF and plasma of MS patients. The *in vitro* study showed that DMF, MMF and biotin attenuate the deleterious effects of 7 β -OHC, namely oxiaoptophagy which is a mode of cell death defined by the association of oxidative stress, apoptosis and autophagy. DMF, MMF and biotin thus correct the imbalance of the RedOx status characterized by overproduction of reactive oxygen species, attenuate the increased activity of the main antioxidant enzymes and the oxidation of macromolecules (proteins, lipids) induced by 7 β -OHC. DMF, MMF and biotin also attenuate mitochondrial and peroxisomal dysfunction, alterations in myelin protein (PLP, MBP) expression and changes in lipid profile.

Our study provides arguments in favor of the ability of DMF, MMF and biotin, to attenuate the major alterations associated with the death of oligodendrocytes that may contribute to demyelination. This reinforces the interest in DMF, MMF and biotin for the treatment of MS but also other neurodegenerative diseases.

Keywords: Multiple sclerosis, dimethyl fumarate, biotin, 7 β -hydroxycholesterol, oxiaoptophagy, oxidative stress, mitochondria, peroxisome.

Je dédie cette Thèse

A mes chers parents

En témoignage de ma reconnaissance et mon grand amour, Pour tous les efforts que vous avez consentis en ma faveur, pour votre confiance en moi, votre soutien, pour tout. Je vous dédie ce travail ; sans vos prières et vos bénédictions je ne serais jamais arrivée jusque là

A mon cher mari Ala

Pour ton amour, ta patience et ta compréhension; Grâce à tes encouragements et tes conseils ce travail a vu le jour. Je te remercie infiniment pour tout et j'espère avoir été digne de ta confiance

A mes chers frères et sœurs : Oussama, Bouthaina et

Sana

Vous avez toujours été présents pour m'encourager et me soutenir. Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous

A mes chers Neveux et Nièces Yahya, Joud, Salim,

Lyna, Salma, Aicha, Amna

Vous êtes notre source de bonheur et notre joie de vivre, je vous aime de tout mon cœur mes petits

A ma belle-famille

*En témoignage de votre aide, et de votre compréhension de ma situation, je
vous dédie ce travail*

A mes chères amies : Amira, Raouda, Khouloud,

A tous mes amis

*En témoignage de ma profonde reconnaissance, pour votre dévouement et
votre affection, que ce travail puisse être l'expression de ma profonde
admiration*

A tous ceux qui me sont chers

**A toutes les personnes que j'aime ou qui
m'aiment**

Remerciements

*Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Abed el Raouf KENANI** pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider mon jury de Thèse. Vous demeurez toujours pour nous un exemple à suivre pour vos qualités scientifiques et humaines.*

Veillez trouver ici l'expression de mon estime et ma considération.

*J'adresse aussi mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Mohammed HAMMAMI**, et à Madame la Professeure **Isabelle DELTON** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette Thèse. Je vous remercie pour le temps consacré pour juger ce travail et pour l'honneur d'évaluer ce travail.*

*Je tiens aussi à remercier Madame le Docteur **Delphine MEFFRE** pour m'avoir fait l'honneur d'être examinatrice de ce travail. Je tiens à vous exprimer ma respectueuse considération et ma sincère gratitude.*

*Je tiens à adresser mes remerciements au Monsieur le Professeur **Ahmed Slaheddine MASMOUDI** professeur à l'Institut de Biotechnologie à Sidi Thabet. Vous m'avez fait un grand honneur en acceptant de co-diriger et de juger ce travail et de me faire bénéficier de votre savoir et de vos compétences. J'ai pour vous le respect qu'impose votre mérite et vos qualités aussi bien humaines que professionnelles.*

*Je me fais un devoir d'exprimer mes sentiments de gratitude les plus sincères à Monsieur le Docteur **Gérard LIZARD**, mon directeur de Thèse au Laboratoire de Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces années. J'ai beaucoup apprécié la liberté qu'il m'a laissée dans l'orientation de ce travail. Je lui suis également reconnaissante de son aide scientifique, de ses conseils, de sa rigueur scientifique. Je le remercie également pour les longues heures de travail sur ce manuscrit*

*Il m'est très agréable de remercier vivement et d'exprimer mes sentiments de gratitude et de reconnaissance à Madame le Docteur **Amira ZARROUK**, Maitre Assistante à la faculté de Médecine de Sousse pour avoir assumé au quotidien l'encadrement théorique et pratique de mon travail de Thèse en Tunisie.*

Sans elle et sans son encadrement, cette Thèse de Doctorat en cotutelle n'aurait pas pu être réalisée. Les mots me manquent vraiment pour t'exprimer mon immense reconnaissance pour ton encadrement, ton aide scientifique et morale, ta patience, ta sincérité et ta générosité.

*Je remercie également le professeur **Thibault MOREAU** pour avoir fourni les échantillons provenant de malades*

et

***Thomas NURY** pour son aide scientifique et technique.*

*Je remercie tous les compagnons et les membres du laboratoire de biochimie de la faculté de Médecine de Sousse et le laboratoire **NAFS** de la faculté de Médecine de Monastir pour leurs conseils et leurs aides techniques.*

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Physiopathologie de la sclérose en plaques	13
Figure 2 : La pathogenèse de la SEP.....	14
Figure 3 : Imagerie par résonance magnétique axiale.....	18
Figure 4: Processus de la neuro-inflammation dans la SEP.....	31
Figure 5 : Génération des ERO	33
Figure 6 : Schéma représentatif de chaîne de transport des électrons et les sites de production des ERO au niveau de la membrane interne mitochondriale	35
Figure 7 : Schéma simplifié de synthèse du glutathion.....	40
Figure 8 : Nomenclature de certains acides gras non ramifiés avec une extrémité méthyle et une extrémité carboxyle.....	54
Figure 9: Structure et nomenclature des différentes familles des acides gras.....	55
Figure 10 : Biosynthèse des AGPI à longue chaîne	58
Figure 11: Schéma représentant la synthèse des différents oxystérols par voie enzymatiques et non enzymatiques	67
Figure 12 : Schéma d'oxydation de DHE en HE sous l'action d' $O_2^{\bullet-}$	93
Figure 13: Schéma d'oxydation de DHR123 en RH123 en présence de H_2O_2	94
Figure 14 : Schéma d'hydrolyse de fluorescéine par des estérases.....	97
Figure 15: Principe de dosage de la LDH	98
Figure 16 : Evaluation des effets de différentes concentrations du 7β -hydroxycholestérol sur la croissance cellulaire et / ou l'activité mitochondriale des cellules oligodendrocytaires murines	114
Figure 17 : Evaluation des effets de différentes concentrations de la biotine sur l'inhibition de la croissance cellulaire induite par le 7β -hydroxycholestérol.....	115
Figure 18 : Evaluation des effets de différentes concentrations du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate sur l'inhibition de la croissance cellulaire induite par le 7β -hydroxycholestérol.	117

Figure 19: Observation des cellules par microscopie en contraste de phase.....	119
Figure 20: Evaluation des effets du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'adhérence cellulaire.....	120
Figure 21 : Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la croissance cellulaire.....	121
Figure 22: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité estérase des membranes plasmiques des cellules.....	123
Figure 23: Numération des cellules 158N vivantes en présence du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol.	124
Figure 24: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'intégrité de la membrane plasmique. ...	125
Figure 25 : Mesure de la production d'anions superoxydes intracellulaires dans les cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate ou la biotine, associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol.	127
Figure 26 : Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène dans des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate et la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol	128
Figure 27 : Mesure de l'activité glutathion peroxydase dans des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate et la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol	129
Figure 28: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité superoxyde dismutase.....	130
Figure 29: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité de la catalase.....	131
Figure 30: Mesure du taux de diènes conjugués au niveau des cellules traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate et la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol.	133

Figure 31 : Mesure du taux du malondialdhyde des cellules traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate et la biotine associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol.	134
Figure 32 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production des protéines carbonylées..	135
Figure 33: Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le potentiel transmembranaire mitochondrial.....	137
Figure 34: Mesure du taux des cardiolipines sur les cellules traitées avec du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine, associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol.	138
Figure 35 : Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la masse mitochondriale.	140
Figure 36: Mesure de la production des anions superoxydes au niveau de la mitochondrie	141
Figure 37 : Observation au microscope à fluorescence de l'expression et de la topographie de la protéine ABCD3 au niveau des cellules 158N.	145
Figure 38 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'expression de la protéine peroxysomale ABCD3.	147
Figure 39 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le taux d'expression d'ARNm du gène ABCD1.	149
Figure 40: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le taux d'expression d'ARNm du gène ABCD3.	150
Figure 41: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate, et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le niveau d'expression d'ARNm du gène ACOX 1.....	152

Figure 42 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le taux d'expression d'ARNm du gène MFP2.	153
Figure 43 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le taux d'expression d'ARNm des gènes impliqués dans la synthèse des plasmalogènes DHAPAT et ADHAPS.	155
Figure 44 : Caractérisation ultrastructurale par microscopie électronique à transmission des mitochondries et des peroxysomes des cellules oligodendrocytaires murines 158N traitées en absence ou en présence du 7 β -hydroxycholestérol associées ou non au diméthyle fumarate	156
Figure 45: Teneur en sphingomyéline et phosphatidylcholine dans des cellules 158N traitées avec du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol	171
Figure 46: Expression des protéines de myéline (PLP, MBP) : Analyse par western blot de l'effet du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol.	173
Figure 47: Expression des protéines de myéline (PLP, MBP) : Analyse par western blot de l'effet de la biotine associée ou non au 7 β -hydroxycholestérol	174
Figure 48: Evaluation des voies de signalisation des protéines kinase A (PKA), phospholipase C (PLC) / protéine kinase C (PKC) et MEK / ERK associées la mort cellulaire induite par le 7 β -OHC sur des cellules 158N.	175
Figure 49: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associé ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité de lactate déshydrogénase.....	177
Figure 50: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la morphologie nucléaire.	178
Figure 51: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'intégrité lysosomale.	180
Figure 52: Effet du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur certains marqueurs de mort cellulaire	183
(Apoptose et Autophagie).....	183

Figure 53: Effet de la biotine associée ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur sur certains marqueurs de mort cellulaire (Apoptose et Autophagie). 184

Figure 54: Voies de signalisation simplifiées associées à l'oxiaptophagie induite par le 7 β -hydroxycholestérol 201

Figure 55 : Effets cytoprotecteurs du diméthyle fumarate, du monométyle fumarate et de la biotine contre les effets toxiques du 7 β -hydroxycholestérol sur des cellules oligodendrocytaires murines (cellules 158N):..... 211

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Composition des différents types de gel d'acrylamide	103
Tableau 2 : Séquences des différentes amorces utilisées pour les qPCR.....	108
Tableau 3 : Taux des hydroxy-acides octodecadiéniques (9 HODE ; 13 HODE ; total HODE) au niveau plasmatique et cérébral chez les patients atteints de sclérose en plaques récurrente rémittente et les témoins.....	111
Tableau 4: Taux des oxystérols au niveau plasmatique et cérébral chez les patients atteints de sclérose en plaques récurrente rémittente et les témoins	111
Tableau 5: Profil des acides gras au niveau plasmatique et cérébral chez les patients atteints de la sclérose en plaques récurrente rémittente et les témoins	112
Tableau 6 : Profil des acides organiques des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate ou la biotine associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol	143
Tableau 7: Profil du cholestérol, ses précurseurs (lathostérol, desmostérol, lanostérol) et des oxystérols (triol, 7-cétocholestérol, 7 β – hydroxycholestérol) dans des cellules 158N traitées par le diméthylfumarate, le monométhylfumarate et la biotine associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol	160
Tableau 8 : Profil des acides gras saturés au niveau des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate et le monométhyle fumarate associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol	162
Tableau 9: Profil des acides gras saturés au niveau des cellules 158N traitées par la biotine associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol	164
Tableau 10: Profil des acides gras mono-insaturés au niveau des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate et le monométhyle fumarate associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol	166
Tableau 11: Profil des acides gras mono-insaturés au niveau des cellules 158N traitées par la biotine associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol	167

Tableau 12: Profil des acides gras poly-insaturés au niveau des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate et le monométhyle fumarate associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol 170

Tableau 13: Profil des acides gras poly-insaturés au niveau des cellules 158N traitées par la biotine associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol 171

LISTE DES ABREVIATIONS

13-HODE	:13-hydroxy-octadecadienoate
7KC	: 7-cétocholestérol
7β-OHC	: 7 β -hydroxycholestérol
9-HODE	: 9-hydroxy-octadecadienoate
AA	: Acide arachidonique
ABCD3	: ATP binding cassette transporter D3
ACS	: Acide gras saturé
AG	: Acétate de glatiramère
AGI	: Acide gras insaturé
AGMI	: Acide gras mono-insaturé
AGPI	: Acide gras polyinsaturé
AGTLC	: Acides gras à très longue chaîne
AMM	: Autorisation de mise en marché
APC	: Cellules présentatrices d'antigène
ATP	: Adénosine triphosphate
BHT	: Hydroxy toluène butylé
BSTFA	: Bis (triméthylsilyl) trifluoroacetamide
CAT	: Catalase
CG-SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CIS	: Syndrome d'isolement clinique
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
CoQ	: NADH-coenzyme Q
COX	: Cytochrome oxydase
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
CRH	: Corticotropine
CSH	: Cellules souches hématopoïétiques multipotentes
Cyp 450	: Cytochromes P450
DHA	: Acide docosahexaénoïque
DHAPAT	: Dihydroxacétone phosphate acyle transférase

DHE	: Dihydroéthidine
DHR123	: Dihydrorhodamine 123
DiOC₆(3)	: 3,3'- dihexyloxacarbo-cyanineiodide
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	: Diméthyle fumarate
EAE	: Encéphalomyélite auto-immune
EBV	: Virus Epstein-Barr
EDSS	: Expanded Disability Status Scale
EDTA	: Ethylène diamine tétra acétate
ERN	: Espèces réactives de l'azote
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
ETC	: Electron Transfer Chain
EtOH	: Ethanol
GBA	: β-glucocérébrosidase
GPx	: Glutathion peroxydase
GSH	: Glutathion réduit
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
HODE	: Hydroxy-acides octodécadénoïques
IL	: Interleukine
INF	: Interférons
IRM	: Imagerie par résonance magnétique
Keap1	: Protéine 1 associée à l'ECH de type kelch
LC-MS / MS	: Spectrométrie de masse en tandem par chromatographie en phase liquide
LCR	: Liquide céphalo-rachidien
LOX	: Lipooxygénase
LT	: Leucotriène
LX	: Lipoxine
MA	: Maladie d'Alzheimer
MBP	: Protéine basique de la myéline
MMF	: Monométhyle fumarate
MOG	: Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MP	: Maladie de Parkinson

MPTP	: 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MTT	: Bromure de sel de tétrazolium 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazoilum
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	: Nuclear factor kappa B
NO	: Oxyde nitrique
NOS	: Oxyde nitrique synthase
Nrf2	: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NT	: Neurotensine
O₂	: Dioxygène
O₂^{•-}	: Anion superoxyde
OH^{•-}	: Radical hydroxyl
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PC	: Phosphatidylcholine
PG	: Prostaglandine
PLGA	: Acide lactique-glycolique
PLP	: Protéolipide
RE	: Réticulum Endoplasmique
RH123	: Rhodamine 123
ROS	: Espèces oxygénées réactives
SEP RR	: Sclérose en plaques récurrente rémittente
SLA	: Sclérose latérale amyotrophique
SOD	: Superoxyde dismutase
SVF	: Sérum de veau fœtal
TCS	: Triméthylchlorsilane
TX	: Thromboxane
Vit E	: Vitamine E
X-ALD	: Adrénoleucodystrophie liée au chromosome X
XO	: Xanthine oxydase

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I-PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SCLEROSE EN PLAQUES	2
1. Définition.....	2
2. Historique	2
3. Epidémiologie.....	6
3.1 La prévalence de la sclérose en plaques en France	7
3.2. La prévalance de la sclérose en plaques en Tunisie	7
4. Etiologies	8
4.1. Facteur environnementaux	8
4.1.1 Infections Virales.....	8
4.1.2 Ensoleillement et Vitamine D.....	9
4.1.3. Tabac	9
4.1.4. Stress.....	10
4.1.5. Mode de vie : régime alimentaire	10
4.2. Facteurs génétiques.....	11
5. Physiopathologie de la SEP	12
6-Les différentes formes de la sclérose en plaques	15
7. Manifestations cliniques	16
8. Diagnostic	17
9. Traitement.....	18
9.1. Traitement de poussé	18
9.2. Traitement de fond : traitement à long terme par des agents modificateurs de la maladie	19

9.3. Traitement par des anticorps monoclonaux.....	24
9.4. Traitements symptomatiques.....	25
9.5. Les nouvelles stratégies immunothérapeutiques	25
II. NEURODEGENERESCENCE ET DYSFONCTION CELLULAIRE	26
1. La neurodégénérescence.....	26
2. Neurodégénérescence et inflammation	28
3. Neurodégénérescence et stress oxydant	31
3.1. Les espèces réactives de l’oxygène (ERO).....	32
3.1.1. Les sources de production d’ERO au niveau du cerveau	33
3.1.1.1. Les sources d’ERO au niveau mitochondrial et peroxysomal.....	34
3.1.1.2. Les sources d’ERO au niveau du réticulum endoplasmique	36
3.1.1.3. Les NADPH oxydases (Nox)	37
3.2. Les sources de production des espèces réactives de l’azote (ERN) au niveau du cerveau.....	37
3.2. Les mécanismes anti-oxydants	38
3.3.1. La superoxyde dismutase (SOD).....	38
3.3.2. La glutathion peroxydase (GP _X).....	38
3.3.3. La catalase	39
3.3.4. Les peroxiredoxines (PRX)	39
3.3.5. Le glutathion.....	39
3.3.6. La Vitamine E.....	40
3.3.7. La Vitamine C	41
3.4. Importance du stress oxydant dans la neurodégénérescence.....	41
4. Neurodégénérescence et altération des organites cellulaires	44
4.1. Neurodégénérescence et altération du métabolisme mitochondrial.....	44
4.2. Neurodégénérescence et altération du métabolisme peroxysomal.....	48

4.3. Neurodégénérescence et altération lysosomale	51
5. Neurodégénérescence et dysfonctions du métabolisme lipidique.....	52
5.1. Anomalies des acides gras	54
5.1.1. Définition et classification des acides gras.....	54
5.1.2. Métabolisme et fonction biologique des acides gras polyinsaturés.....	57
5.1.3. Rôle des acides gras dans le processus neurodégénératif.....	59
5.2. Anomalie du cholestérol.....	61
5.2.1. Généralité sur le cholestérol : Définition, fonction et métabolisme.....	61
5.2.2. Rôle du cholestérol dans le processus neurodégénératif.....	63
5.3. Implication des oxystérols dans la neurodégénérescence	64
5.3.1. Origine des oxystérols	65
5.3.1.1. Source endogène.....	65
5.3.1.2. Sources exogènes liés à l'alimentation.....	68
5.3.2. Rôle des oxystérols.....	69
6. Neurodégénérescence et mort cellulaire.....	72
III. MODELES D'ETUDE DE LA SCLEROSE EN PLAQUES	77
1. Modèles in vitro.....	77
2. Modèles in vivo	78
OBJECTIFS.....	78
MATERIEL ET METHODES.....	80
I. ETUDE CLINIQUE PRELIMINAIRE.....	81
II. CULTURE CELLULAIRE	81
1. Lignée cellulaire	81
2. Culture et traitement des cellules	81
3. Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie à contraste de phase	84
4. Analyse de l'adhérence cellulaire par coloration au crystal violet	84

5. Evaluation du statut mitochondrial.....	84
5.1. Evaluation de l'activité de succinate déshydrogénase mitochondriale et/ou la prolifération cellulaire par le test MTT	84
5.2. Evaluation du potentiel transmembranaire mitochondrial par le 3,3'-dihexyloxacarbocyanineiodide : DiOC ₆ (3)	85
5.3. Evaluation de la masse mitochondriale par coloration au MitotrackerRed.....	86
5.4. Mesure de la production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène (anions superoxydes mitochondriaux) par coloration au MitoSOX.....	86
5.5. Caractérisation et analyse des taux de cardiolipines par spectrométrie de masse en tandem par chromatographie en phase liquide (LC-MS / MS).....	87
6. Evaluation du statut peroxysomal: Etude de l'expression et de la topographie du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3 par immunofluorescence indirecte	87
7. Caractérisation et analyse des acides organiques, des stérols et des acides gras par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	88
7.1. Extraction des acides organiques.....	88
7.2. Extraction des acides gras	89
7.3. Extraction des stérols.....	89
7.4. Analyse par CPG-MS	90
8. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	90
9. Evaluation du statut RedOx.....	90
9.1. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes	90
9.1.1. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)	90
9.1.2. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)	91
9.1.3. Mesure de l'activité catalase.....	92
9.1.4. Mesure de groupement thiol.....	92
9.2. Mesure de la production des espèces réactives oxygénées.....	93
9.2.1. Evaluation de la production d'anions superoxydes intracellulaires par cytométrie en flux.....	93

9.2.2. Evaluation de la production de peroxyde d'hydrogène par coloration à la Dihydrorhodamine 123.....	94
9.3. Dosage des marqueurs de la peroxydation lipidique	94
9.3.1. Dosage des diènes conjugués	95
9.3.2. Dosage des malondialdhydes.....	95
9.4. Dosage des produits d'oxydation de protéines : protéines carbonylées.....	96
10. Evaluation et caractérisation de la mort cellulaire.....	96
10.1. Numération cellulaire avec de bleu trypan	96
10.2. Identification de la viabilité cellulaire par coloration à la fluorescéine di-acétate	97
10.3. Evaluation de la perméabilité cellulaire et de la mort cellulaire par coloration à l'iodure de propidium	97
10.4. Dosage de l'activité de lactate déshydrogénase	98
10.5. Quantification des cellules apoptotiques par coloration au Hoechst 33342 et au Giemsa	99
10.5.1. Morphologie des noyaux après coloration au Hoechst 33342.....	99
10.5.2. Morphologie des noyaux après coloration au Giemsa	100
10.6. Caractérisation de l'ultrastructure cellulaire par microscopie à transmission électronique	100
10.7. Evaluation de l'intégrité lysosomale par coloration à l'acridine orange	101
11. Quantification de l'expression protéique par Western blot.....	101
11.1. Préparation des extraits cellulaires et dosage des protéines	101
11.2. Préparation des échantillons	102
11.3. Séparation des protéines par SDS-PAGE : Préparation des gels SDS-PAGE	102
11.4. Migration des protéines	103
11.5. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	104
11.6. Détection et révélation des protéines.....	104

12. Analyse par RTq PCR	105
12.1. Extraction des ARN.....	105
12.2. Dosage des ARN	106
12.3. RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction.....	106
12.4. Quantitative Polymerase Chain Reaction : qPCR	106
12.5. Analyse des résultats qPCR.....	108
13. Analyse statistique.....	109
RESULTATS	109
I. ETUDE CLINIQUE PRELIMINAIRE	110
1. Evaluation du taux d'hydroxy-acides octodecadenœiques au niveau plasmatique et cérébral	110
2. Evaluation du taux des oxystœrols au niveau plasmatique et cérébral.....	111
3. Evaluation du profil des acides gras au niveau plasmatique et cérébral	112
II. ETUDE IN VITRO	113
1. Evaluation des effets du 7 β -hydroxycholestœrol, du dimœthyle fumarate, du monomœthyle fumarate et de la biotine sur la croissance cellulaire et / ou l'activitœ mitochondriale des cellules oligodœnrocytaire murines	113
2. Evaluation de l'effet du dimœthyle fumarate, du monomœthyle fumarate et de la biotine associœs ou non au 7 β -hydroxycholestœrol sur la morphologie et l'adhœsion cellulaire	118
2.1. Effet du dimœthyle fumarate, du monomœthyle fumarate et de la biotine associœs ou non au 7 β -hydroxycholestœrol sur la morphologie cellulaire.....	118
2.2. Effet du dimœthyle fumarate, du monomœthyle fumarate et de la biotine associœs ou non au 7 β -hydroxycholestœrol sur l'adhœsion cellulaire.....	120
3. Evaluation des effets cytoprotecteurs du dimœthyle-fumarate, du monomœthyle- fumarate et de la biotine	121
3.1. Effet du dimœthyle fumarate, du monomœthyle fumarate et de la biotine associœs ou non au 7 β -hydroxycholestœrol sur la croissance cellulaire.....	121

3.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité estérase par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA).....	122
3.3. Numération cellulaire en présence de bleu de trypan.....	123
3.4. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'intégrité de la membrane plasmique.....	125
4. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le stress oxydant	126
4.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production d'espèces réactives de l'oxygène	126
4.1.1. Effet sur la production d'anions superoxydes intracellulaires.....	126
4.1.2. Effet sur la production du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	127
4.2. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le système de défense anti-oxydant	129
4.2.1. Mesure de l'activité glutathion peroxydase.....	129
4.2.2. Mesure de l'activité superoxyde dismutase.....	130
4.2.3. Mesure de l'activité catalase.....	131
4.3. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production de marqueurs de la peroxydation lipidique.....	132
4.3.1. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production des diènes conjugués.....	133
4.3.2. Évaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production du malondialdéhyde.....	134

4.3.3. Évaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production des protéines carbonylées	135
5. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le fonctionnement mitochondrial.....	136
5.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le potentiel transmembranaire mitochondrial.....	136
5.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le taux des cardiolipines	138
5.3. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la masse mitochondriale	139
5.4. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production d'anions superoxydes au niveau de la mitochondrie.....	140
5.5. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la glycolyse et le cycle du TCA...	142
6. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le fonctionnement peroxysomal	144
6.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'expression du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3	144
6.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur les niveaux d'expression des ARNm des transporteurs transmembranaires peroxysomaux (ABCD1 et ABCD3).....	148
6.2.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le niveau d'expression d'ARNm de la protéine ABCD1	148

6.2.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'ARNm de la protéine ABCD3	149
6.3. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur les niveaux d'expression d'ARNm des enzymes impliquées dans la β -oxydation des acides gras à très long chaîne dans le peroxysome.....	151
6.3.1. Incidence sur le niveau d'expression du gène ACOX1	151
6.3.2. Incidence sur le niveau d'expression du gène MFP2	152
6.4. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur les niveaux d'expression d'ARNm des enzymes impliquées dans la synthèse des plasmalogènes	154
7. Evaluation des modifications ultrastructurales par microscopie électronique à transmission.....	156
8. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le profile lipidique	157
8.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol, sur le métabolisme du cholestérol	157
8.2. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol, sur le profil des acides gras cellulaires.....	161
8.3. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol, sur la teneur en sphingomyéline et en phosphatidylcholine.....	171
9. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'expression des protéines de myéline (PLP, MBP)	172
10. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine sur la mort cellulaire induite par le 7 β -hydroxycholestérol	175

10.1 Evaluation des voies de signalisation associées à la mort cellulaire induite par le 7 β -hydroxycholestérol	175
10.2. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité lactate déshydrogénase	176
10.3. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la fragmentation nucléaire	178
10.4. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'intégrité lysosomale	179
10.5. Effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'apoptose et l'autophagie.....	181
DISCUSSION.....	185
I. ETUDE CLINIQUE PRELIMINAIRE	186
II. ETUDE IN VITRO	189
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	212
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	216
ANNEXES.....	265
PUBLICATIONS ACCEPTEES ET PUBLIEES SE RAPPORTANT A LA THESE.....	268

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Publications internationales dans des revues à comité de lecture

Article 1

Sghaier R, Nury T, Leoni V, Caccia C, Pais De Barros JP, Cherif A, Vejux A, Moreau T, Lime K, Samadi M, Mackrill JJ, Masmoudi AS, Lizard G, Zarrouk A. Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7 β -hydroxycholesterol. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2019 Jul 22;105432. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105432.

Article 2

Sghaier R, Zarrouk A, Nury T, Badreddine I, O'Brien N, Mackrill JJ, Vejux A, Samadi M, Nasser B, Caccia C, Leoni V, Moreau T, Cherkaoui-Malki M, Salhedine Masmoudi A, Lizard G. Biotin attenuation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism alteration and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death in 158N murine oligodendrocytes. *Free Radic Res.* 2019 May;53(5):535-561. doi:10.1080/10715762.2019.1612891.

Article 3

Zarrouk A, Smach MA, Hafsa J, **Sghaier R**, Majdoub H, Hammami M, Charfeddine B. Effects of *Carpobrotus edulis* Extract on Oxidative Stress and 158N Oligodendrocyte Death. *Biomed Environ Sci.* 2019 Apr;32(4):291-299. doi:10.3967/bes2019.039.

Article 4

Sassi K, Nury T, Zarrouk A, **Sghaier R**, Khalafi-Nezhad A, Vejux A, Samadi M, Aissa-Fennira FB, Lizard G. Induction of a non apoptotic mode of cell death associated with autophagic characteristics with steroidal maleic anhydrides and 7 β -hydroxycholesterol on glioma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019 Jul;191:105371. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.04.020.

Article 5

Brahmi F, Vejux A, **Sghaier R**, Zarrouk A, Nury T, Meddeb W, Rezig L, Namsi A, Sassi K, Yammine A, Badreddine I, Vervandier-Fasseur D, Madani K, Boulekbache-Makhlouf L, Nasser B, Lizard G. Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018 Oct 16:1-20. doi: 10.1080/10408398.2018.1491828.

Article 6

Nury T, **Sghaier R**, Zarrouk A, Ménétrier F, Uzun T, Leoni V, Caccia C, Meddeb W, Namsi A, Sassi K, Mihoubi W, Riedinger JM, Cherkaoui-Malki M, Moreau T, Vejux A, Lizard G. Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol: Attenuation by α tocopherol. *Biochimie.* 2018 Jul 19. pii: S0300-9084(18)30204-9. doi: 10.1016/j.biochi.2018.07.009.

Article 7

Zarrouk A, Ben Salem Y, Hafsa J, **Sghaier R**, Charfeddine B, Limem K, Hammami M, Majdoub H. 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death, oxidative stress, and fatty acid metabolism dysfunctions attenuated with sea urchin egg oil. *Biochimie.* 2018 Jul 9. pii: S0300-9084(18)30194-9. doi: 10.1016/j.biochi.2018.06.027.

Article 8

Bezine M, Namsi A, **Sghaier R**, Ben Khalifa R, Hamdouni H, Brahmi F, Badreddine I, Mihoubi W, Nury T, Vejux A, Zarrouk A, de Sèze J, Moreau T, Nasser B, Lizard G. The effect of oxysterols on nerve impulses. *Biochimie.* 2018. pii: S0300-9084(18)30100-7. doi: 10.1016/j.biochi.2018.04.013.

Article 9

Badreddine A, Zarrouk A, Karym EM, Debbabi M, Nury T, Meddeb W, **Sghaier R**, Bezine M, Vejux A, Martine L, Grégoire S, Bretillon L, Prost-Camus E, Durand P, Prost M, Moreau T, Cherkaoui-Malki M, Nasser B, Lizard G. Argan Oil-Mediated Attenuation of Organelle Dysfunction, Oxidative Stress and Cell Death Induced by 7-Ketocholesterol in Murine Oligodendrocytes 158N. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(10). doi: 10.3390/ijms18102220.

Article 10

Debbabi M, Zarrouk A, Bezine M, Meddeb W, Nury T, Badreddine A, Karym EM, **Sghaier R**, Bretillon L, Guyot S, Samadi M, Cherkaoui-Malki M, Nasser B, Mejri M, Ben-Hammou S, Hammami M, Lizard G. Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in microglial BV-2 cells. *Chem Phys Lipids.* 2017; 207(Pt B):151-170. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2017.04.002.

Article 11

Debbabi M, Nury T, Zarrouk A, Mekahli N, Bezine M, **Sghaier R**, Grégoire S, Martine L, Durand P, Camus E, Vejux A, Jabrane A, Bretillon L, Prost M, Moreau T, Ammou SB, Hammami M, Lizard G. Protective Effects of α -Tocopherol, γ -Tocopherol and Oleic Acid, Three Compounds of Olive Oils, and No Effect of Trolox, on 7-Ketocholesterol-Induced Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunction in Microglial BV-2 Cells. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(12). pii: E1973.

Article 12

Leoni V, Nury T, Vejux A, Zarrouk A, Caccia C, Debbabi M, Fromont A, **Sghaier R**, Moreau T, Lizard G. Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty

acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017; 169: 96-110. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.029.

Article 13

Zarrouk A, Nury T, Karym EM, Vejux A, **Sghaier R**, Gondcaille C, Andreoletti P, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, Debbabi M, Fromont A, Riedinger JM, Moreau T, Lizard G. Attenuation of 7-ketocholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy by dimethyl fumarate on 158N murine oligodendrocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;169: 29-38. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.02.024.

Communications présentées à des Congrès Nationaux et Internationaux

Communications orales

Namsi A, **Sghaier R**, Nury T, Zarrouk A, Brahmi F, Meddeb W, Sassi K, Yammine A, Badreddine I, Mihoubi W, Vejux A, Vervandier-Fasseur D, Nasser B, Masmoudi Ahmed S, Ben Aissa-Fennira F, Masmoudi-Kouki O, Lizard G. Mediterranean diet and neuroprotection. BMAT 2018 – 2-4 nov 2018, Hammamet – Tunisie

Sghaier R, Nury T, Leoni V, Caccia C, Pais De Barros J-P, Cherif A, Masmoudi Ahmed S, Lizard G, Zarrouk A. Attenuation of mitochondrial damages by dimethyl fumarate, monomethyl fumarate and Biotin in 7 β -hydroxycholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes - BMAT 2018 – 2-4 nov 2018, Hammamet – Tunisie.

Nury T, **Sghaier R**, Zarrouk A, Uzun T, Ménétrier F, Lherminier J, Leoni V, Caccia C, Masmoudi A, Vejux A, Moreau T, Lizard G. Evidence of marked peroxisomal alteration associated with minor and major mitochondrial dysfunctions in early and late phases of 7-ketocholesterol-induced cell death. 6th ENOR Symposium Oxysterols (21-22 September 2017).

Communications affichées

Sghaier R, Nury T, Vejux A, Cherkaoui-Malki M, Moreau T, Masmoudi A, Zarrouk A, Lizard G. Prevention of 7 β -hydroxycholesterol-induced mitochondrial dysfunction and cell death by dimethylfumarate and monomethylfumarate on 158N murine oligodendrocytes. Oct.2018 Gdansk – Pologne.

Sghaier R, Nury T, Valerio L, Caccia C, Pais De Barros J-P, Cherif Aa, Masmoudi Ahmed S, Moreau T, Lizard G, Zarrouk A. Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate 7 β -hydroxycholesterol-induced oxidative stress. Mitochondrial damages and oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocyte cells. ENOR 2018 sept. 2018, Bologne, Italie

Sghaier R, Zarrouk A, Nury T, Masmoudi A, Moreau T, Lizard G - Evaluation de l'effet cytoprotecteur du Diméthyl fumarate et Monométhyl fumarate sur des cellules oligodendrocytaires murines 158N traitées avec du 7 β -hydroxycholestérol. FJC 2018.

Sghaier R, Zarrouk A, Nury T, Vejux A, Masmoudi AS, Moreau T, Lizard G. Attenuation of 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol – induced lipotoxicity by dimethylfumarate, monomethylfumarate and biotin on 158N murine oligodendrocytes - 25-28 octobre 2017, 7è Joint Ectrims Actrims Meeting, Paris.

Zarrouk A, Ben Salem Y , **Sghaier R**, Limem K, Majdoub H, Mohamed H. Analysis of 7 β -hydroxycholesterol effects on cell death and oxidative stress induction in 158N murine oligodendrocytes and evaluation of the protective effects of sea urchin eggs oil. ENOR 2017 – 21-22 septembre – Université Catholique de Louvain, Bruxelles.

Nury T, Debbabi M, Zarrouk A, Ménétrier F, **Sghaier R**, Badreddine A, Karym EM, Bezine M, Vejux A, Savary S, Cherkaoui Malki M, Moreau T, Aubourg P, Lizard G. Incidence of 7-ketocholesterol, a cholesterol auto-oxidation product found at enhanced level in the plasma of X-ALD patients, on oligodendrocytes and microglial cells dysfunctions. 5th Open European Peroxisome Meeting, Vienne, Autriche (2016).

INTRODUCTION

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante fortement invalidante qui peut être fatale à plus ou moins long terme. Cette maladie neurodégénérative figure parmi les plus fréquentes existe sous différentes formes cliniques : **une forme rémittente-récurrente (SEP RR)** : concerne environ 80% des malades et se caractérise par l'alternance de phases de démyélinisation et de rémission, **une forme secondairement progressive (SEP SP)** : considérée comme le second stade de la SEP par poussée concernant environ 40% des malades, ou les poussées deviennent de plus en plus rares ou disparaissent totalement pour céder la place à une progression continue avec des signes neurologiques, et **une forme progressive (SEP P)** : moins inflammatoire que la précédente, et est caractérisée par une démyélinisation du système nerveux centrale (SNC) sans poussées et sans rémission concernant 10% des malades.

La SEP, sous sa forme RR, est associée à de nombreuses perturbations inflammatoires accompagnées d'un déséquilibre du statut Red/Ox et d'un désordre du métabolisme mitochondrial et sans doute peroxysomal. Par ailleurs, la démyélinisation dans la SEP, sous sa forme progressive est associée à une destruction de la myéline qui conduit à une altération de la fonction mitochondriale suivi d'une mort neuronale.

De nombreuses preuves suggèrent l'implication du stress oxydant dans le processus de démyélinisation et dans les dommages neuronaux dans la SEP (**Lassmann et al., 2012; Ljubisavljevic, 2016**). La myéline, produite dans le cerveau par des oligodendrocytes, est constituée essentiellement de cholestérol et des sphingomyélines, associés à des protéines spécifiques de la myéline (**Baumann and Pham-Dinh, 2001; Dietschy and Turley, 2004**). En présence du stress oxydant, la teneur élevée en cholestérol au niveau de la myéline, le rend vulnérable à l'oxydation, ce qui favorise la production de composés délétères, appelés oxystérols (produits d'oxydation du cholestérol) notamment le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC) et le 7-cétocholestérol (7KC), dans le SNC (**Leoni and Caccia, 2011; Zarrouk et al., 2018**). Les oxystérols, en particulier le 7 β -OHC, sont connus pour amplifier le stress oxydant et les dommages mitochondriaux contribuant à la mort cellulaire (**Nury et al., 2015**). Chez l'homme, le taux du 7 β -OHC est trouvé à des concentrations élevées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et/ ou dans le plasma des patients atteints de maladies neurodégénératives, notamment la SEP (**Leoni et al., 2005**).

En raison de la toxicité de cet oxystérol, dont les caractéristiques évoquent les dysfonctions associées à la SEP, il est très probable que le 7 β -OHC soit impliqué dans la physiopathologie de cette maladie.

Des arguments en faveur de dysfonctions peroxysomales tant dans la maladie d'Alzheimer que dans la SEP ont été évoqués sur la base de l'analyse de profils lipidiques (**Senanayake et al., 2015; Zarrouk et al., 2015**). Ces données sont à même de modifier la compréhension de la physiopathologie de la SEP. Ils présentent aussi l'intérêt de fournir de nouvelles pistes thérapeutiques en vue de développer de nouveaux traitements et/ou d'optimiser des traitements existants (**Havrdova et al., 2013**).

A l'heure actuelle, les traitements de première ligne sont souvent des anticorps humanisés. Ces traitements, bien que corrigeant les dysfonctions immunes, sont peu efficaces au niveau clinique. Il est donc nécessaire, d'intervenir sur d'autres types de dysfonctionnements, en particulier métaboliques, associés à la SEP tels que les dysfonctionnements des organites (mitochondrie, peroxysome), le stress oxydant, l'altération du profil lipidique, les dommages associés à la myéline (protéines de myéline) et la mort cellulaire (**Adiele and Adiele, 2019**). Ceci est considéré comme une nouvelle démarche de compréhension de la physiopathologie de la SEP dans le but de cibler des traitements adéquats, en particulier le diméthyle fumarate (DMF ; Tecfidera), qui constitue un traitement de fond de la SEP RR, son métabolite le monométhyle fumarate (MMF) (**Scannevin et al., 2014**), et la biotine à forte dose (MD1003) utilisée chez des malades atteints de SEP progressive (**Sedel et al., 2015**).

Il est donc important de mieux connaître les activités biologiques de ces traitements actuellement employés, pour permettre sinon de guérir, mais tout au moins d'améliorer le plus possible l'état des malades et à défaut de retarder l'évolution de la maladie.

Dans cette optique, les travaux de thèse ont été dirigés selon deux volets :

- Le premier volet, consiste en une étude clinique préliminaire locale qui a été réalisée sur des échantillons de plasmas et de LCR de patients atteints de SEP RR recrutés au sein du Centre Hospitalier Universitaire de Dijon (Service de Neurologie, Prof. Thibault Moreau), pour rechercher des biomarqueurs lipidiques en particulier des acides gras et des oxystérols notamment le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC) et le 7-cétocholestérol (7KC), ainsi que des biomarqueurs du stress oxydant.

- Le second volet de cette thèse, consiste à déterminer l'ampleur des effets cytotoxiques du 7 β -OHC sur des cellules oligodendrocytaires murines 158N, en ciblant des

paramètres impliqués dans le processus de la SEP ; le stress oxydant, le statut mitochondrial et peroxysomal, l'intégrité membranaire, l'homéostasie lipidique, et la mort cellulaire (apoptose, autophagie). Aussi nous avons déterminé l'ampleur de ces effets sur les protéines majeures de la myéline MBP et PLP. Notre étude s'est focalisée sur l'évaluation des potentialités cytoprotectives du DMF, du MMF et de la biotine et leurs capacités à atténuer les effets cytotoxiques du 7 β -OHC sur des cellules 158N, pour mieux comprendre le mode d'action de ces molécules.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-Physiopathologie de la sclérose en plaques

1. Définition

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique, démyélinisante du système nerveux centrale (SNC), en particulier l'encéphale, le tronc cérébral et la moelle épinière, conduisant à des plaques focales de démyélinisation primaire et à une neurodégénérescence différentielle dans la substance grise et la matière blanche encéphalique et/ou médullaire (**Lassmann et al., 2007**).

« Sclérose » définit une dégénérescence des tissus encéphalique et médullaire produisant la destruction de la myéline. La myéline est un complexe protéolipidique qui protège les axones et les neurones et qui est remplacé par un tissu cicatriciel dans la SEP.

« Plaque » définit une destruction qui peut s'étendre à différents endroits de la gaine de myéline, entraînant des attaques encéphaliques et médullaires à plusieurs sites.

Les symptômes de la SEP apparaissent quand les impulsions nerveuses sont ralenties ou carrément interrompues (**Loriol M et al., 2005**). Le nombre et la fréquence de l'apparition de ces plaques de démyélinisation sont variables d'une personne à une autre au cours de l'évolution de la maladie. Par ailleurs, selon la localisation de ces plaques, la SEP se présente sous forme d'un déficit sensitif ou moteur, visuel ou cognitif accompagnés des troubles de l'équilibre et des douleurs.

Il existe différents types de SEP ; une forme rémittente-récurrente, une forme progressive primaire, une forme progressive secondaire et une forme progressive rémittente (**Lassmann et al., 2007; Lassmann et al., 2012**).

2. Historique

Le terme « sclérose en plaques » a été évoqué pour la première fois en 1866 par Alfred Vulpian. En 1860, Eduard Rindfleisch a caractérisé les principales anomalies histologiques de cette maladie : inflammation et démyélinisation. En 1863, il a décrit la présence d'infiltrats

inflammatoires périvasculaires au sein des plaques de sclérose, ce qui lui a laissé spéculer que l'inflammation précède et peut être responsable de la démyélinisation. En 1868, le neurologue français, Jean-Martin Charcot (1825-1893), a observé, sur des coupes histologiques du cerveau et de la moelle épinière, la présence de petites lésions « sclérose », disséminées sous formes de « plaques » ceci l'a conduit à suggérer que les plaques, caractérisent et provoquent les symptômes de cette maladie. Grâce à ces observations et à cette description claire et précise, une compréhension plus étendue a conduit à une amélioration de la définition de la SEP.

En 1894, Devic a décrit une sous-forme de SEP avec une atteinte dominante de la moelle épinière et de la voie de la vision antérieure (**Lassman H and Wekerle H.; 2006**). Otto Marburg (1906) a présenté le premier compte rendu clinique et pathologique détaillé de la SEP aiguë fulminante (**Compston A and Lassman H., 2006**). En 1928, Joseph Baló a décrit des lésions particulières chez les patients hongrois atteints de SEP progressive (**Lassman H and Wekerle H.; 2006**). De nos jours, avec les études pathologiques, il est devenu clair que le modèle clinico-pathologique classique de la SEP ne représente qu'une des nombreuses entités étroitement apparentées, résumées sous la désignation «maladies inflammatoires démyélinisantes» (**Adams and Kubik, 1952**).

3. Epidémiologie

L'information mondiale sur l'épidémiologie de la SEP et la disponibilité des ressources et des services pour les personnes atteintes de SEP est rare dans de nombreuses régions du monde. La prévalence mondiale de la SEP a été estimée en 2013 à 2,3 millions de personnes (**Browne et al., 2014**) dont une augmentation de 0,2 million par rapport aux 5 dernières années. La SEP est la première cause d'handicap moteur non traumatique de l'adulte jeune, dont l'âge varie entre 20 et 40 ans avec une prédominance féminines (**Whitacre et al., 1999; Noseworthy et al., 2000**). La prévalence de la SEP demeure variable selon la répartition géographique (**Milo and Kahana, 2010**). Elle augmente avec la latitude, dans les zones loin de l'équateur (**Kurtzke, 1980**), selon un gradient positif Sud-Nord (**Simpson et al., 2011**). Par exemple cette maladie est très fréquente dans l'Amérique du Nord, les îles Orcades, au nord de l'Ecosse (250 cas pour 100'000 habitants) ainsi que l'Europe du Nord (Angleterre, Norvège, Suisse), considéré comme des zones à haut risque de SEP (**Hauser, 1994**) avec une prévalence très élevée dans les îles Britanniques (**Kingwell et al., 2013**). Une faible prévalence est trouvée en Asie, en Amérique du sud et en Afrique Noire ainsi que dans les pays arabes (**Milo and Kahana, 2010**). Cette répartition peut être expliquée par une carence en vitamine D.

Plusieurs études ont montré que la SEP touche le plus souvent les femmes (avec 3 femmes pour un homme). L'affirmation de cette prédominance féminine pourrait être due aux implications hormonales. Les faibles taux d'oestrogènes chez la femme jeune favoriseraient la sécrétion de cytokines Th1 pro-inflammatoires, alors que lors de la grossesse (taux élevés d'oestrogènes) la voie Th2 anti-inflammatoire serait favorisée. Par ailleurs, chez l'homme (taux élevés de testostérone), la voie Th2 anti-inflammatoire serait aussi favorisée (**Tintoré and Arrambide, 2009**).

3.1 La prévalence de la sclérose en plaques en France

La France est considérée comme un pays de moyenne à forte prévalence pour la SEP (**Alperovitch and Bouvier, 1982; Fender et al., 1997**). A nos jours, il n'y a pas eu d'estimation globale de la prévalence de la SEP en France en utilisant la même méthodologie pour toutes les régions.

Les premières études ont été menées entre 1968 et 1990 à partir des données de registres hospitaliers dans les Pyrénées, dans la Vallée du Rhône et en Bretagne ; la prévalence de la SEP a été estimée à 40 pour 100 000 habitants (**Gallou et al., 1983; Confavreux et al., 1987; Delasnerie-Laupretre and Alperovitch, 1991**). En 1994, la prévalence de la SEP a été estimée entre 37 et 47 pour 100000 habitants (**Fender et al., 1997**). En 2003, une première étude a été réalisée à partir des données d'Affection de Longue Durée (ALD) de la Mutualité Sociale Agricole (MSA), avait estimé la prévalence de la SEP de 65,5 pour 100 000 habitants avec une prédominance féminine (96,3 pour 100 000 habitants chez les femmes et 41,9 habitants pour 100 000 habitants chez les hommes) confirmant ainsi l'existence de gradients positifs Sud-Nord et Ouest-Est (**Vukusic et al., 2007**).

Une autre étude a été réalisée en 2012 par **Fromont et al.**, a estimé que l'incidence de cette maladie est de 5,5 et 8,8 pour 100 000 habitants avec une prédominance féminine (71% de femmes) (**Fromont et al., 2012**).

3.2. La prévalance de la Sclérose en plaques en Tunisie

Peu de travaux ont porté sur la SEP en Afrique du nord. La première étude a été menée entre 1974 et 1978 au Centre de Neurologie de Tunis (**Ben Hamida, 1982; Romdhane et al., 1993**), 200 patients ont été hospitalisés sur toute la Tunisie avec une prévalence estimée à 3,34 pour 100 000 (**Ammar et al., 2006**). La Tunisie est sur cette base considérée comme une zone de faible prévalence pour la SEP.

4. Etiologies

L'origine exacte de la SEP demeure inconnue. Cette maladie est considérée comme une pathologie multifactorielle complexe résultante de l'association et de l'interaction de plusieurs facteurs environnementaux et génétiques.

4.1. Facteur environnementaux

La nature exacte des facteurs environnementaux influençant le déclenchement de la maladie reste encore mal connue. Cependant de nombreux facteurs environnementaux sont suspectés : géographiques, liés au climat et à l'ensoleillement, professionnels liés l'industrie des métaux et des matériaux électriques et à l'exposition aux solvants organiques, et nutritionnels.

Les facteurs pour lesquels les arguments les plus fiables sont avancés sont les suivants :

4.1.1 Infections virales

De nombreux virus sont soupçonnés dans la prédisposition de la SEP faisant aujourd'hui l'objet de nombreuses études : le paramyxo virus (virus de la rougeole), le virus ourlien (virus des oreillons), le HHV6 pour voyeur d'exanthème, et le virus de l'herpès tel que le virus Epstein-Barr (EBV, virus de la mononucléose infectieuse) (**Giraudon and Bernard, 2009; Milo and Kahana, 2010; Simon et al., 2015**). Ces virus provoquent une altération du système immunitaire qui pourrait favoriser la destruction de la myéline. Jusqu'à aujourd'hui, aucun virus n'a été retrouvé de façon systématique chez les malades atteints de SEP. Ces virus possèdent au niveau de leurs enveloppes des séquences d'acides aminés identiques à celles trouvés au niveau de protéines de myéline (myelin basic protein (MBP)). De ce fait, les infections virales pourraient déclencher des processus auto-immunitaires contre la myéline, suite à l'activation de lymphocytes T autoréactifs par mimétisme moléculaire (puisque les virus possèdent une séquence d'acide aminé similaire à celle trouvée dans une protéine du soi) (**Koch et al., 2013**).

Parmi les virus les plus impliqués dans la SEP figurent l'EBV, qui appartient à famille des virus herpès et qui pourrait infecter et moduler les lymphocytes B dans la SEP (**Magliozzi et al., 2007**). Une méta-analyse, a montré que le risque de la SEP est 2,3 fois plus élevé chez les personnes ayant eu une manifestation clinique du virus EBV durant leur adolescence ou à l'âge adulte par rapport aux personnes infectées durant leurs enfance (infection silencieuse) (**Thacker et al., 2006**). Ainsi, le risque de SEP pourrait être augmenté dans les 5 ans après avoir eu une infection par l'EBV et rester élevé 30 ans après l'infection (**Nielsen et al., 2007**).

4.1.2 Ensoleillement et Vitamine D

La prévalence de la SEP tend à augmenter avec la latitude (**Milo and Kahana, 2010**). La corrélation la plus évidente avec la latitude est l'ensoleillement. En effet, les pays les ensoleillés (Sud) ont une faible prévalence de la maladie. Plusieurs études ont montré l'existence d'une corrélation inverse entre le risque de la SEP et l'exposition solaire avant le début de la maladie (**van der Mei et al., 2007; Jelinek et al., 2015; Kočovská et al., 2017**), mais surtout l'exposition aux UltraViolet (UV) qui entraînent, au niveau cutané, la conversion du 7-déhydrocholestérol (DHC) en pro-vitamine D3 qui est ensuite convertie rapidement en vitamine D (**Sloka et al., 2011; Lucas et al., 2015**).

Plusieurs études sont en faveur des effets bénéfiques de la vitamine D dans la prévention et le traitement de la SEP (**Ascherio et al., 2010; Milo and Kahana, 2010**). Il est important de souligner que de nombreux récepteurs à la vitamine D se localisent au niveau du SNC, sur les lymphocytes T et B, et les cellules présentatrices d'antigènes.

La forme active de la vitamine D agit pour stimuler l'immunité innée, moduler l'immunité adaptative, et joue probablement un rôle dans la défense de l'hôte contre l'infection. Il est admis aujourd'hui que la vitamine D agit sur la réponse immunitaire, en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, IL-17, l'IFN- γ , et TNF- α) (**Milo and Kahana, 2010**), en favorisant la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, TFG β -1) et en facilitant le développement de lymphocytes T régulateurs.

La vitamine D joue aussi un rôle important dans la modulation des cellules T helper (Th). Elle inhibe les cellules Th17 pro-inflammatoires, modifie l'équilibre de Th1 / Th2 à un état anti-inflammatoire, et empêche les cellules Th1 / Th17 activées de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) (**Cantorna, 2006; Lysandropoulos et al., 2011; Grishkan et al., 2013**).

4.1.3. Tabac

Le tabac est considéré comme un facteur incriminé dans le déclenchement de la SEP. Certaines études ont montré que le risque de développer une SEP augmente dans une population fumeurs par rapport celle de non-fumeurs (**Pekmezovic et al., 2006; Handel et al., 2011**). Les mécanismes d'action exacts du tabac pour développer une SEP restent mal connus. Cependant, on admet que certains composés de la cigarette sont immunosuppresseurs (**Stämpfli and Anderson, 2009**).

La nicotine, un des composés de la cigarette, est capable de modifier la perméabilité de la BHE (**Hawkes, 2007**), favorisant ainsi l'extravasation des lymphocytes activés et des composés toxiques dirigeant contre la myéline. De plus, la nicotine active la production de l'oxyde nitrique (NO) connu comme composé neurotoxique. Ce dernier pourrait être impliqué dans le processus de la dégénérescence axonale et l'altération de l'influx nerveux, et donc dans le développement de la SEP (**Suemaru et al., 1997; Encinas et al., 2005**).

Une étude menée par Mikaeloff a montré que le tabagisme parental (tabagisme passif pour l'enfant) semblait augmenter le risque de premier événement démyélinisant : ce risque augmenté de 2,12 (1,43-3,15) chez l'enfant de moins de 16 ans avec des parents fumeurs par rapport à des enfants ayant des parents non-fumeurs (**Mikaeloff et al., 2007**).

Le rôle du tabagisme passif est encore peu étudié dans la SEP mais semble être impliqué dans cette pathologie. Néanmoins, le tabagisme (actif et passif) pourrait augmenter le risque de survenue de la SEP.

4.1.4. Stress

Le stress a été prouvé comme un facteur déclenchant de la SEP, par le biais du système hypothalamo-hypophysio-surrénalien impliquant la corticotropine (CRH) et la sécrétion surrénalienne de l'hormone glucocorticoïde dont le rôle est immunosuppresseur (**Habib et al., 2001; Kern and Ziemssen, 2008**). Un défaut d'activation du système hypothalamo-hypophysio-surrénalien a été démontré chez les patients présentant des lésions de SEP actives au niveau de l'hypothalamus (**Huitinga et al., 2004**).

Le développement d'une résistance aux glucocorticoïdes en raison d'une exposition au stress, pourrait avoir un effet permissif sur l'exacerbation de la SEP (**Johnson et al., 2004**).

Les neurotensines (NTs), également sécrétés sous l'effet du stress, stimulent de manière synergique les mastocytes menant à une augmentation de la perméabilité vasculaire et à une perturbation de la BHE (**Donelan et al., 2006; Theoharides and Konstantinidou, 2007**).

4.1.5. Mode de vie : régime alimentaire

Chez les patients atteints de SEP, la malnutrition, due à un régime alimentaire inapproprié ou insuffisant, a été associée à une déficience du système immunitaire. La malnutrition affecte la fonction mentale, la force des muscles respiratoires et augmente le risque des maladies du système nerveux (**Pennington, 1997**).

Plusieurs études ont montré qu'un très faible apport énergétique avec des consommations inférieures aux valeurs recommandées, d'acide folique, de fer, de vitamine D, de zinc, de vitamine E et de calcium est associé à la SEP (**Williams et al., 1988; Timmerman and Stuifbergin, 1999**). Ainsi, la qualité d'alimentation semble être impliquée dans la pathogenèse de la SEP. Une alimentation riche en graisses saturées animales, alcool, caféines, viandes fumées pourraient se considérer comme un facteur de risque de la survenue de la SEP (**Habek et al., 2010**). Le surpoids et l'obésité ont également été rapportés dans la pathologie de la SEP (**Hewson et al., 1984; Timmerman and Stuifbergin, 1999**).

4.2. Facteurs génétiques

En raison d'existence des zones géographiques associées à une prévalence et une incidence très élevée de SEP par rapport à d'autres et du fait que cette distribution est non uniforme, l'hypothèse d'une susceptibilité génétique a été recherchée. L'argument majeur d'une prédisposition génétique est l'existence de formes familiales (plusieurs membres d'une même famille sont atteints). Cependant, la SEP n'est pas une maladie héréditaire puisque cette prédisposition génétique n'est pas liée à une transmission génétique mais plutôt à une susceptibilité génétique qui peut perturber le système immunitaire.

Le risque de la SEP est augmenté avec le degré de lien d'apparenté, très élevés pour les jumeaux monozygotes (25%), moyennement élevé pour les apparentés au 1^{er} degré (elle est 4% entre frères et sœurs et de 2,75% entre parents et enfants) alors qu'il est faible pour les apparentés du 2 ou 3^{ème} degré (**Dyment et al., 2004; Sawcer, 2008**). En revanche, ces résultats sont relatifs puisque le risque de la maladie peut être confronté à des facteurs environnementaux.

La région du chromosome 6p21 est connue comme associée à la SEP; elle code pour les gènes HLA, gènes de susceptibilités, qui interviennent dans le déclenchement de la réponse immunitaire (**Sawcer et al., 2014**). Depuis 1970, une forte association a été décrite entre les gènes localisés sur le chromosome 6p21 dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et la survenue de la SEP, ceci concerne les locus HLA DR2 (plus précisément les allèles DRB1*1502, DQB1*0602), HLA DR4 ainsi que HLA-A (HLA-A*0301) (**Jersild et al., 1973; Balnytė et al., 2016; Mohammadi et al., 2016**).

Le CMH joue un rôle important dans l'auto-immunité de la SEP, puisqu'il est constitué par des glycoprotéines permettant de présenter les antigènes au système immunitaire afin de

distinguer le soi du non soi. Par ailleurs, il existe d'autres gènes de susceptibilité de la survenue de la SEP non liés au locus HLA.

Grâce aux études d'association : génotypage total (Genome Wide Association studies: GWAS), plusieurs gènes ont été décrits comme associés à la SEP tels que les gènes codant pour les récepteurs des cytokines (IL7-R ou CD127, IL2-R ou CD25)) (**International Multiple Sclerosis Genetics, 2007**), le gène codant pour l'IL-10, et le gène CYP27B1 pour la vitamine D (**Fugger et al., 2009; Ramakrishnan et al., 2017**).

5. Physiopathologie de la SEP

La SEP est une maladie neurodégénérative démyélinisante du SNC caractérisée par la formation de lésions appelées plaques de démyélinisation, qui sont responsables d'un ralentissement de l'influx nerveux et secondairement d'une altération de la conduction nerveuse, d'où les symptômes de cette pathologie.

La progression de la SEP se fait en plusieurs étapes (**Lassmann et al., 2012; Kamm et al., 2014**) (**Figure 1**) :

- D'abord une atteinte de la gaine de myéline qui a pour conséquence un ralentissement et une perturbation de l'influx nerveux (2).
- Ensuite, pour faire face à ce défaut de conduction, une remyélinisation plus ou moins complète s'accompagnant d'une cicatrisation et une récupération de la gaine de myéline et donc un rétablissement de l'influx nerveux ; ceci permet d'atténuer les symptômes de la SEP après une poussée (3).
- Au fil du temps, la démyélinisation peut en revanche s'aggraver, conduisant à une dégénérescence de l'axone lui-même et par conséquent à un blocage de l'influx nerveux. Ceci traduit cliniquement par l'aggravation des symptômes et l'installation des handicaps irréversibles (4) (**Lassmann et al., 2012**).

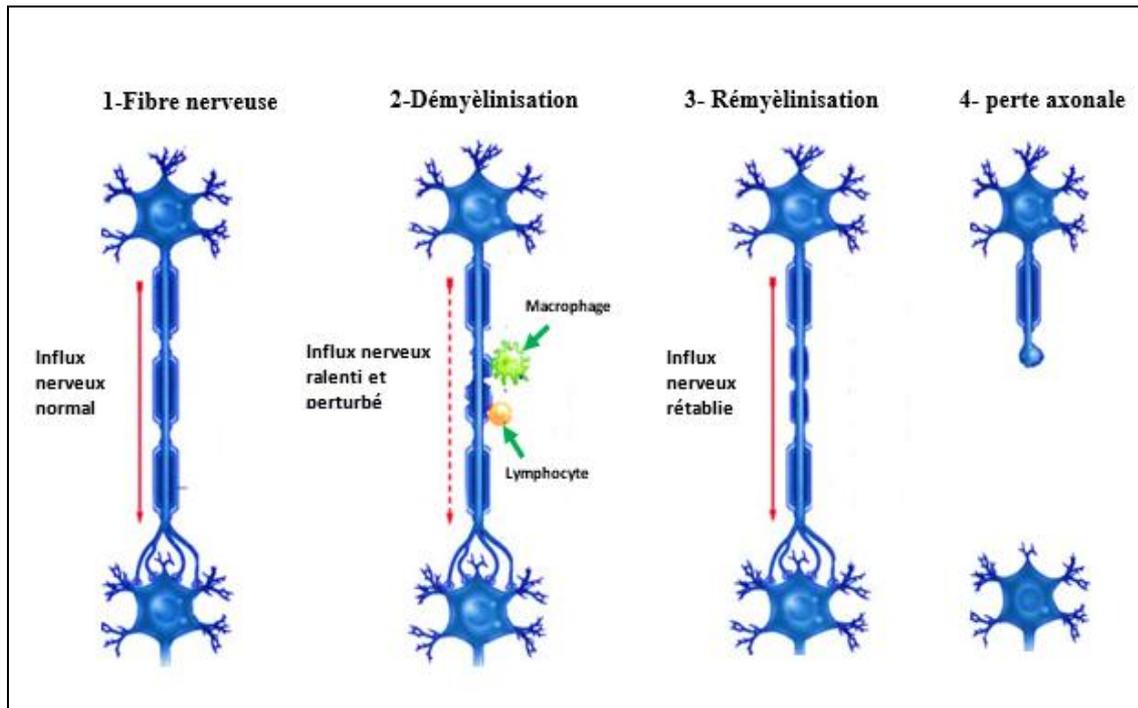


Figure 1: Physiopathologie de la sclérose en plaques

Les plaques, qui ont donné leur nom à la maladie, sont des lésions focales de démyélinisation du SNC, souvent associées à une réaction gliale intense. Au début de la SEP récurrente-rémittente (SEP-RR), la pathologie de la maladie est dominée par des lésions inflammatoires focales de la substance blanche résultantes de la rupture de la BHE, caractérisée par une démyélinisation primaire qui peut évoluer vers une altération de la conduction nerveuse, une perte axonale et une gliose réactive (**Kamm et al., 2014**).

Les mécanismes précis des lésions de la SEP restent mal connus. Cependant, il est bien connue que le processus inflammatoire met en jeu une altération de la réponse immunitaire qui pourrait contribuer à la mort des oligodendrocytes, à la démyélinisation, et même à des lésions axonales ou neuronales. Il est généralement admis que ce processus immunitaire met en jeu l'activation inhabituelle des lymphocytes T et B (**Na et al., 2008; Saxena et al., 2008**). Les lymphocytes T auto-réactifs, activés en dehors du SNC, traversent la BHE, sont réactivés par des cellules présentatrices d'antigène (Ag) locales, tels que les macrophages, suite à une expression excessive de certains Ag du soi. La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires stimule les cellules microgliales et les astrocytes, recrute d'autres types cellulaires inflammatoires tels que les lymphocytes B, qui à leur tour stimulent les plasmocytes pour sécréter des immunoglobulines dirigées contre la gaine de myéline (**Linington et al., 1988; Mathey et al., 2007**). Ce processus inflammatoire conduit à une

lésion partielle ou totale de la gaine de myéline et secondairement à une dégénérescence axonale (**Figure 2**).

Une remyélinisation plus au moins complète est possible afin de réparer les tissus endommagés, ceci se traduit cliniquement par l'apparition des plaques de remyélinisation dites séquelles ou « fantômes ».

La lésion axonale est généralement considérée comme un événement secondaire aux lésions de la myéline (**Lassmann et al., 2007**). Cependant, une lésion axonale primaire pourrait également déclencher une démyélinisation secondaire et une inflammation. Ceci reste toujours un sujet de débat. La question est de savoir si un mécanisme est exclusivement responsable de l'initiation de la pathologie de la SEP ou si les deux mécanismes se déroulent simultanément (**Stys et al., 2012**).

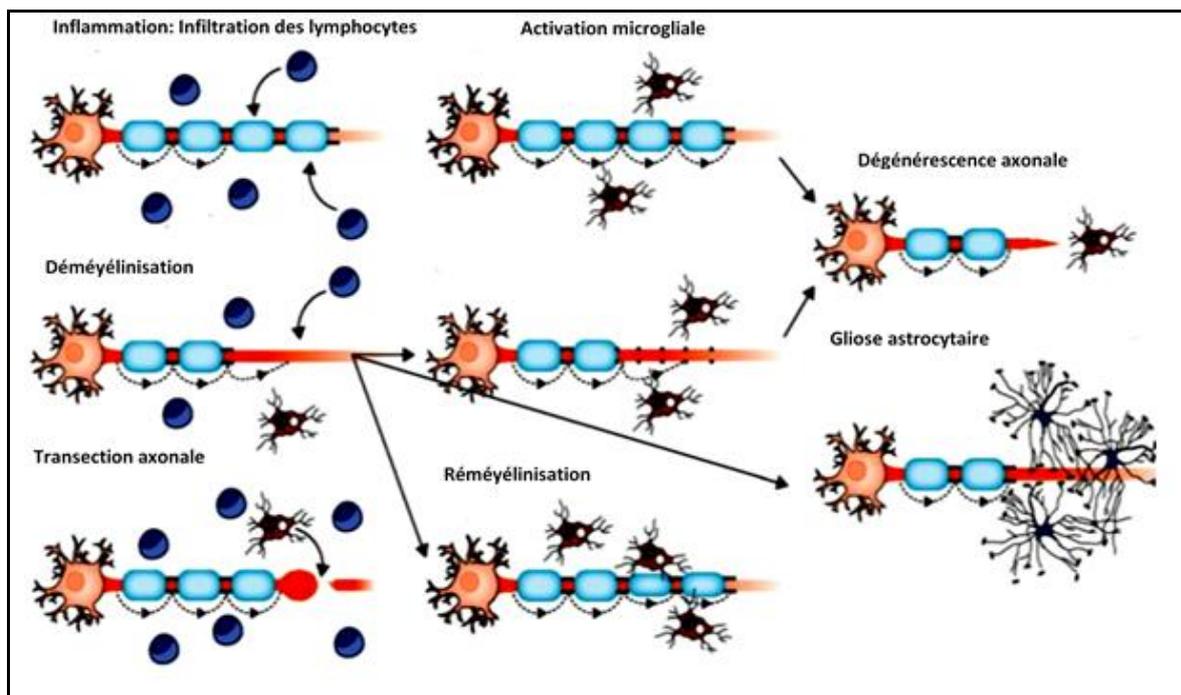


Figure 2. La pathogenèse de la SEP (Compston and Coles, 2008)

La pathogenèse de la SEP fait appel à plusieurs mécanismes: d'abord une rupture de la barrière hématoencéphalique et une inflammation provoquée par les lymphocytes; ensuite une démyélinisation altérant l'influx nerveux; une remyélinisation peut se produire afin de restaurer la conduction saltatoire normale de l'influx nerveux; au fil du temps, une gliose astrocytaire caractérisée par une activation microgliale accru ce qui pourrait conduire à une dégénérescence axonale.

Les plaques de démyélinisation sont caractérisées par la présence d'un infiltrat inflammatoire de lymphocytes et de macrophages. Il existe ainsi deux types de plaques selon le degré d'atteinte de la myéline et de l'axone.

✚ Des plaques dites **récentes ou actives**, où le processus de démyélinisation est en cours. Elles sont caractérisées par des infiltrats des cellules lymphocytaires T (CD8 et CD4), des macrophages contenant les débris myéliniques, d'une gliose réactionnelle (réaction des astrocytes) peu abondante et d'un œdème témoignant de la rupture de la BHE.

✚ Des plaques dites **anciennes, inactives, ou chroniques**, où le processus de démyélinisation est complété. Elles sont caractérisées par une gliose cicatricielle intense qui est la cause d'une perte axonale.

6-Les différentes formes de la sclérose en plaques

La sclérose en plaques présente principalement trois formes selon l'évolution de cette pathologie.

✓ La forme récurrente-rémittente (RR) est la plus abondante, elle concerne environ 85% des patients atteints de SEP (**Depaz et al., 2013**). Elle est caractérisée par des poussées, qui peuvent durer quelques heures, quelques jours ou quelques semaines, associées ou non des séquelles sensitives, sensorielles et motrices, traduisant l'apparition des lésions qui sont les conséquences des lésions inflammatoires au niveau du SNC. Ces phases actives de démyélinisation sont suivies de périodes de rémission totale ou quasi-totale. Les rechutes sont associées à l'apparition de nouvelles lésions ou à la réactivation d'anciennes lésions au niveau de la substance blanche du cerveau et ou de la moelle épinière (**Lublin and Reingold, 1996**).

✓ Après une quinzaine d'année en moyenne, la forme RR peut évoluer vers une forme secondairement progressive (SP) (**Dutta and Trapp, 2006**). La SEP-SP est caractérisée par l'installation des troubles neurologiques et la progression du handicap de manière continue. Des poussées peuvent s'ajouter suivies des phases de remissions mineures et des phases de plateaux. Ces handicap neurologiques reflètent une atrophie cérébrale et une perte axonale (**Dutta and Trapp, 2006**).

✓ La forme progressive primaire (PP), SEP-PP, est une forme rare qui touche 10-15% des patients (**Depaz et al., 2013**). C'est une forme d'emblée progressive continue dès le début de la maladie. Elle est caractérisée par une accumulation permanente des déficits neurologiques sans poussés ni rémissions. Dans cette forme de maladie, la progression du

handicap est permanente et les signes neurologiques sont réguliers qui sont la conséquence d'une mort des oligodendrocytes (**Dutta and Trapp, 2006**). Dans cette forme de SEP, il peut y avoir également quelques rares poussées, d'où la forme **progressive rémittente**.

7. Manifestations cliniques

La SEP est une maladie cliniquement complexe étant donné l'hétérogénéité de ses symptômes qui se manifestent sous plusieurs formes. Le syndrome d'isolement clinique (CIS) est la première manifestation de signes et de symptômes de la SEP, généralement suivie d'une autre phase au cours de laquelle un diagnostic clinique de SEP est posé. La progression de la SEP est hautement imprévisible, toutefois, son risque d'invalidité est élevé. En effet, la SEP est caractérisée par des lésions qui sont disséminées dans le temps et dans l'espace.

Cliniquement, la SEP se caractérise par des épisodes discrets de dysfonctionnement neurologique. Les symptômes produits par ces épisodes varient considérablement d'un patient à un autre et dépendent du site d'atteinte neurologique. Les patients peuvent généralement ressentir des engourdissements, des picotements, une faiblesse, une perte de vision, une altération de la démarche, une incoordination, un déséquilibre et un dysfonctionnement de la vessie. Entre ces attaques, au moins pendant la phase récurrente-rémittente de la maladie, les patients sont neurologiquement stables (**Lublin and Reingold, 1996**). Néanmoins, les symptômes résiduels peuvent persister et plusieurs patients peuvent éprouver de la fatigue ou une sensibilité à la chaleur dans l'intervalle entre les attaques.

La plupart des patients atteints de SEP présentent une SEP-RR (85% ou plus) qui se caractérise par des rechutes soudaines ponctuées de rémissions à court ou à long terme, alors que 10-15% présentaient une SEP-PP, considérée comme un type progressif de la SEP sans période initiale de rechute et de rémission (**Confavreux et al., 2000; Lublin and Reingold, 2003**). Quarante pour cent des patients atteints de SEP-RR développent un handicap, évoluant typiquement en SEP-PS, entraînant une débilitation grave et irréversible (**Confavreux et al., 2000; Confavreux and Vukusic, 2006**). Les personnes atteintes d'une SEP SP ou SEP PP ont une aggravation progressive de leur incapacité neurologique entraînant des problèmes de vision, de marche, d'équilibre, d'incontinence, de changements cognitifs, de fatigue et de douleur (**Gibson and Frank, 2002**). Malgré ces différents phénotypes cliniques initiaux, le temps nécessaire pour atteindre certaines étapes d'invalidité est similaire pour tous les patients atteints de SEP progressive (**Confavreux and Vukusic, 2006**).

8. Diagnostic

Le diagnostic de la SEP impose un lourd fardeau à la personne atteinte (**Pike et al., 2012**). Le médecin doit se fier à un faisceau d'arguments cliniques, paracliniques et évolutifs. Ainsi, le diagnostic de la SEP repose à la fois sur la description de symptômes cliniques par le patient, sur l'examen clinique et sur les résultats d'examens complémentaires notamment les preuves par imagerie par résonance magnétique (IRM) (**Poser and Brinar, 2001; Polman et al., 2005**).

Bien que le diagnostic de SEP ait été essentiellement clinique depuis le XIXe siècle, le diagnostic précis et l'exclusion de certaines maladies, qui peuvent avoir des symptômes similaires, est requis. Les premiers critères de diagnostics qui ont été largement adoptés dans les études épidémiologiques, sont ceux d'Allison et Millar en 1954 (**Allison and Millar, 1954**).

Depuis les années 1980, l'IRM a été considérée comme l'examen le plus important pour un diagnostic efficace de la SEP. Les images pondérées en T2 (qui reflètent le temps nécessaire à la désintégration des noyaux) démontrent les plaques d'inflammation / démyélinisation. Des changements atrophiques et des zones de dommages permanents appelées «trous noirs» peuvent être observés sur les séquences pondérées en T1 (**Miller et al., 1988; Barkhof et al., 1997**). L'IRM est également utilisée pour montrer la progression et l'évolution de la SEP (**McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005**).

Un récent consensus international de 2001, les «critères de McDonald», et sa version révisée en 2005 reposent d'avantage sur l'utilisation de l'IRM pour un diagnostic plus rapide, plus sensible et plus efficace de la SEP (**McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005**). D'autres tests dits «paracliniques», y compris l'examen du LCR qui repose sur le dosage des bandes oligoclonales, l'enregistrement des potentiels évoqués ; les études urodynamiques de la fonction vésicale et la tomographie de la cohérence oculaire (OCT) ; peuvent être utiles pour certains patients (**Poser et al., 1983; McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005**).

Toutes ces données montrent que le diagnostic de la SEP repose sur la combinaison des antécédents cliniques, de l'examen neurologique, et de l'imagerie par IRM comme preuve d'apparition des lésions disséminées à la fois dans le temps et dans l'espace (**Poser and Brinar, 2001; Polman et al., 2005**).

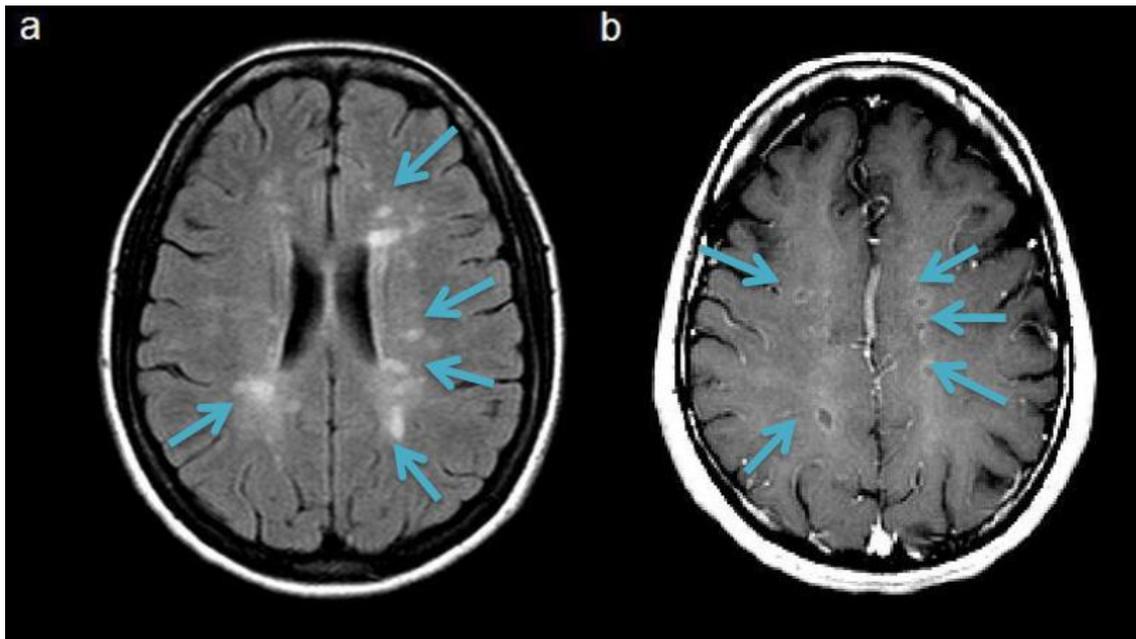


Figure 3 : Imagerie par résonance magnétique axiale (a) des lésions hyper-intenses pondérées en T2 (b) des lésions en anneau en T1 prenant le gadolinium (GAD) (Buzzard et al., 2012) ; les flèches bleues représentent les différents types de lésions non inflammatoires (a) ou inflammatoires (b).

9. Traitement

Actuellement, il n'y a pas de remède pour guérir de la SEP. La majorité des traitements pour la SEP sont orientés vers la suppression de la réponse immunitaire. Cependant, ces immunosuppresseurs présentent un risque accru d'infections et de cancer (**Inglese and Petracca, 2015**). Des options alternatives de traitement impliquent des traitements modificateurs de la maladie tels que les interférons, l'acétate de glatiramère, des anticorps monoclonaux ainsi que des modulateurs des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate.

Ces traitements ont considérablement réduit le nombre d'attaques et la progression de la maladie mais ils ne stoppent pas la maladie. En effet, les interférons sont efficaces dans les premières phases de rechute de la SEP, mais pas dans les phases avancées de la maladie (**Inglese and Petracca, 2015**).

La gestion thérapeutique des patients atteints de SEP est divisée trois types de traitements: traitement de poussé, traitement de fond et traitement symptomatique.

9.1. Traitement de poussé

Les récurrences sont généralement traitées par une injection intraveineuse de corticostéroïdes, par échange plasmatique ou par injection d'hormone adrénocorticotrope (**Diebold and Derfuss**). Bien que ces alternatives soient efficaces pour réduire la durée de la rechute et la

récupération des patients plus rapidement, elles n'ont aucun bénéfice neuroprotecteur à long terme (**Inglese and Petracca, 2015**).

9.2. Traitement de fond : traitement à long terme par des agents modificateurs de la maladie

Le traitement de la SEP a été un défi avec des options de traitement se limitant principalement aux corticostéroïdes, cyclophosphamide, et au méthotrexate (des immunosuppresseurs puissants). Pendant les années 90, plusieurs médicaments immunomodulateurs ont été mis à disposition pour prévenir l'évolution de la maladie (**Diebold and Derfuss, 2016**).

➤ **Les interférons (Avonex®, Betaseron®, Extavia®, Rebif®, Plegridy®)**

Les interférons de type 1 (INF) (INF- α , - β , - δ , - κ , - ϵ , - ω), sont des régulateurs du système immunitaire. Ils constituent le pilier du traitement de la SEP depuis environ 20 ans.

Les IFN endogènes de type 1 sont reconnus depuis longtemps comme des acteurs importants dans l'induction de la résistance cellulaire aux infections virales, agissant principalement *via* l'IFN- α/β (**McCoy et al., 2006**). Au fil du temps, divers autres effets anti-inflammatoires des IFN de type 1 ont été mis en évidence (**Chadha et al., 2004**). Ces propriétés ont été exploitées dans le traitement de la SEP-RR. En effet, il a été démontré que le traitement avec les IFN pourrait stimuler les cytokines anti-inflammatoires. Ces effets anti-inflammatoires semblaient coïncider avec une réduction du nombre de médiateurs pro-inflammatoires tel que IL-17, IL-23 et l'ostéopontine (**Chen et al., 2009; Zhang et al., 2011**). Il est maintenant admis que les IFN de type 1 peuvent réduire l'inflammation du SNC dans la SEP en détournant le système immunitaire d'une voie pro-inflammatoire Th1 et Th17 vers un sous-ensemble plus anti-inflammatoire de type Th2.

L'interféron- β (INF β) est le premier médicament modificateur de la SEP-RR. Il a été considéré comme un avancé majeure de traitement de la SEP (**Kappos et al., 2007**). En effet, l'INF β agit en modifiant l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans le cerveau et en diminuant le nombre de cellules inflammatoires traversant la BHE. En conséquence, une diminution de l'inflammation neuronale, une augmentation des facteurs de croissance nerveuse et une amélioration de la survie neuronale se mettent en place. De plus, l'INF β réduit la population de lymphocytes T de type Th17 et la production des cytokine IL-17 qui sont impliquées dans l'immuno-pathophysiologie de la SEP (**Mitsdoerffer and Kuchroo, 2009**). Le suivi de l'état des patients traités par les INF β (les données à long terme et les comparaisons historiques) suggère l'efficacité des INF β à long terme, ainsi que leur

effets sur la progression de la maladie qui pourraient être assez important sur plusieurs années (**Goodin et al., 2011**).

➤ **L'acétate de glatiramère (Copaxone®)**

L'acétate de glatiramère (AG) est un analogue synthétique de 4 peptides (acide L-glutamique, lysine, alanine et tyrosine) de la MBP, qui entre en compétition avec les peptides antigéniques de la MBP au niveau du CMH de classe II.

Initialement, l'AG avait été imaginée pour induire l'encéphalomyélite expérimentale (EAE) chez la souris, cependant il avait supprimé l'EAE. Cette observation a rapidement conduit l'AG en essais cliniques chez des patients atteints de SEP afin de prévenir la progression de la maladie. L'AG est un immunomodulateur puissant, son effet est due à sa liaison au CMH de classe II qui inhibe l'activation des lymphocytes T (**Neuhaus et al., 2001; Wolinsky et al., 2007**). L'AG permet la suppression des réponses inflammatoires en favorisant une redistribution de Th1 à Th2 et en activant les Treg (**Haas et al., 2009**). Chez les patients, l'AG agit en réduisant significativement jusqu'à 30% les symptômes de la maladie ainsi que le développement des nouvelles lésions dans la SEP-RR, bien qu'il n'ait montré aucune amélioration de son efficacité à long terme sur la progression de l'handicap (**Johnson et al., 1995**).

➤ **Le Fingolimod (Gilenya®)**

Le Fingolimod est un lysophospholipide dérivé d'un métabolite fongique de l'ascomycète. Il s'agit d'un modulateur du récepteur de la sphingosine 1-phosphate (S1-P), qui agit comme un super-agoniste du récepteur S1-P. Le fingolimod provoque l'internalisation du récepteur S1-P et réduit l'infiltration des lymphocytes potentiellement auto-réactifs dans le SNC (**Brinkmann et al., 2002; Choi et al., 2011**).

Les résultats des essais cliniques de phase III sur des patients atteints de SEP-RR traités par le Fingolimod ont montré une réduction significative des lésions en IRM, une réduction de la progression de l'invalidité et une atténuation de l'atrophie cérébrale par rapport au placebo ou aux patients traités par l'IFN β -1 (**Kappos et al., 2010**). Ces résultats ont conduit à approuver le Fingolimod, en 2010, comme étant le premier traitement oral (0,5 mg une fois par jour) disponible pour les patients atteints de SEP-RR.

➤ **Le Tériflunomide (Aubagio®)**

Le Tériflunomide est un métabolite actif du léflunomide. C'est un traitement par voie orale, d'une efficacité reconnue et d'une relative innocuité dans la gestion de la polyarthrite

rhumatoïde (PR). Le tériflunomide agit principalement en inhibant l'enzyme mitochondriale, la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH) ainsi que la prolifération des cellules B et T (**Palmer, 2010; Claussen and Korn, 2012**).

Le Tériflunomide exerce une action anti-inflammatoire en inhibant les cellules Th1 pro-inflammatoires productrices d'IFN-gamma et en favorisant la différenciation des cellules Th2 anti-inflammatoires (**Korn et al., 2004**). Il s'est révélé ainsi prometteur dans le modèle murin EAE, en réduisant la gravité de la maladie, et en inhibant l'inflammation, la démyélinisation et la perte axonale (**Korn et al., 2004; Merrill et al., 2009**).

Dans la SEP, l'administration orale de Tériflunomide réduit les taux de rechute, les lésions de SEP ainsi que la progression de l'invalidité (**O'Connor et al., 2011; Vermersch et al., 2014**). Certains effets indésirables ont été observés chez les patients SEP-RR traités par le Tériflunomide incluant la diminution du nombre de globules blancs, une alopécie, des effets hépatiques, nausée, diarrhée, engourdissement des mains et pieds, réactions allergiques, problèmes respiratoires et augmentation de la tension artérielle (**Dargahi et al., 2017**).

➤ **Le diméthyle fumarate (BG-12) (Tecfidera®)**

Au cours de ces dernières années, les traitements de la SEP sont passés de traitement par voie parentérale au traitement par voie orale, dans le but d'améliorer l'acceptation et l'observance du traitement par les patients.

Le diméthyle fumarate, pris par voie orale, est un ester d'acide fumarique récemment approuvé dans le traitement des patients atteints de SEP-RR afin de diminuer la fréquence des exacerbations cliniques et de retarder la progression de l'incapacité.

En effet, l'acide fumarique semble avoir des effets prometteurs en tant que modulateur potentiel des composantes inflammatoires et neurodégénératives de la SEP. C'est un produit intermédiaire du cycle de l'acide citrique, processus essentiel à la production d'adénosine triphosphate (ATP) et au maintien des fonctions cellulaires. Les esters d'acide fumarique, en particulier, le diméthyle fumarate (DMF) et son métabolite majeur le monométhyle fumarate (MMF), utilisés depuis des décennies dans le traitement du psoriasis (**Altmeyer et al., 1994**), semblent être prometteurs en tant que médicament pour la SEP-RR. Le DMF a obtenu son AMM en Europe et il est commercialisé sous le nom de **Tecfidera®, ou BG12**. Cette molécule possède des effets immunomodulateurs, anti-inflammatoires et antioxydants mais ses mécanismes d'action restent encore mal connus (**Lin et al., 2011; Scannevin et al., 2012; Huang et al., 2015**).

Le DMF, ainsi que son métabolite majeur le MMF, agissent en activant la voie Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)). L'activation de cette voie métabolique induit une immunomodulation et pourrait favoriser l'inhibition de la production des radicaux libres *via* la stimulation du système de défense antioxydant et l'induction de l'expression d'enzymes inhibitrices du stress oxydant (**Lin et al., 2011**). En effet, dans les conditions physiologiques, le Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par son interaction avec une protéine répressive « protéine 1 associée à l'ECH de type kelch » (Keap1). Le traitement avec des composés électrophiles, comme le DMF, entraîne des modifications conformationnelles des résidus de cystéine sur Keap1 (**Linker et al., 2011**), ce qui permet l'activation par phosphorylation et la translocation nucléaire de Nrf2 afin de promouvoir l'expression de certains gènes protecteurs tel que l'hème-oxygénase-1 (**Lin et al., 2011**), la NADPH-quinone et l'oxydoréductase-1 (**Linker et al., 2011**). L'activation de ces enzymes est associée à des réponses cytoprotectrices et anti-oxydantes (**Matusheski et al., 2004**). De plus, l'activation de la voie Nrf2-médiée par le DMF, peut être associée à des réponses anti-inflammatoires. Ceci intervient dans l'activation de récepteur 2 de l'acide hydroxycarboxylique (HCA2 : hydroxycarboxylicacidreceptor 2) et dans l'inhibition du facteur de transcription NF-κB (nuclear factor kappa B) entraînant une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et de l'expression des molécules d'adhésion du système immunitaire ainsi qu'une modulation des lymphocytes T et B (**Gillard et al., 2015; Parodi et al., 2015**).

Par ailleurs, des études sur le modèle EAE (Encéphalomyélite Allergique Expérimentale : modèle expérimental murin de la SEP) ont montré que l'administration orale de DMF aux souris EAE améliorait l'évolution clinique de la maladie et protégeait les oligodendrocytes, la myéline, les axones et les neurones du stress oxydant, quelque soit administré à titre préventif (avant l'apparition de la maladie) ou comme traitement thérapeutique (au stade chronique de la maladie) (**Schilling et al., 2006; Linker et al., 2011**).

L'action des esters d'acides fumariques (DMF et MMF) en tant que molécules protectrices contre la mort et les lésions cellulaires du SNC, représente une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de la SEP. Grâce à ces propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et neuroprotectrices, le BG-12, un dérivé d'acide fumarique de deuxième génération dont le principe actif est le DMF, a été utilisé dans plusieurs essais cliniques. Le BG-12 a maintenant progressé vers les essais de phase III sur des patients atteints de SEP-RR après des résultats encourageants dans les études de phase II qui ont montré une diminution des lésions cérébrales par IRM. Les résultats préliminaires de l'étude DEFINE de phase III ont montré

une réduction de 49% du nombre de rechutes chez les patients traités deux fois par jour au BG-12 par rapport au placebo sur une période de 2 ans (**Gold et al., 2011**). L'avantage important du BG-12 est de disposer de données de sécurité à long terme. Le traitement à long terme avec du BG-12 ou d'autres dérivés du fumarate chez les patients atteints de psoriasis n'a montré aucun signe de toxicité évident depuis les premiers traitements dans les années 1950 (**Schweckendiek, 1959**) et depuis son utilisation plus répandue à partir de 1994 (**Altmeyer et al., 1994**). Cependant, comme chaque médicament, il possède des effets indésirables, dans ce contexte jusqu'à 12% des patients traités par BG-12 ont arrêté le traitement, principalement en raison de troubles gastro-intestinaux ou de bouffées vasomotrices du visage (**Phillips et al., 2012**).

➤ **La Mitoxantrone (Novantrone®) (Elsep®)**

La mitoxantrone est principalement utilisée pour traiter certains types de cancers, en particulier les cancers de type lymphome, leucémie myéloïde aiguë, cancer du sein et cancer de la prostate. En raison de ses propriétés cytotoxiques ciblant les cellules immunitaires, la mitoxantrone a été validée en 2003 comme un traitement pour la SEP-RR et la SEP-SP (**Edan et al., 1997; Hartung et al., 2002**). Cependant, la mitoxantrone est associée à plusieurs effets secondaires, allant des nausées, vomissements, chute des cheveux, cardiotoxicité, jusqu'aux leucémies. En conséquence, son utilisation a été considérablement réduite.

➤ **Biotine à forte dose (MD1003)**

Le MD1003 (MedDay Pharmaceuticals, Paris, France) est une préparation de biotine à fortes doses appelée aussi vitamine H ou B8. La biotine joue le rôle de coenzyme pour cinq carboxylases essentielles impliquées dans le cycle de Krebs et le métabolisme des acides gras (composants essentiels de la gaine de la myéline): acétyl-CoA carboxylases 1 et 2 (ACC1, ACC2), pyruvate carboxylase (PC), propionyl-CoA carboxylase (PCC) et 3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) (**Zempleni et al., 2009; Tong, 2013**), favorisant différentes réactions de carboxylation, impliquées dans la synthèse des acides gras, le métabolisme du glucose et le catabolisme des acides aminés (**Tong, 2013**). Il augmente ainsi la synthèse d'ATP dans les axones démyélinisés et favorise la rémyélination, une stratégie intéressante pour le traitement de la SEP progressive (incluant la SEP-SP et la SEP-PP) (**Franklin, 2008; Sedel et al., 2016**). En 2015, la biotine à forte dose a bénéficié d'une autorisation temporaire en France, une étude pivot de phase III *versus* placebo sur des patients atteints de SEP progressive traités par MD1003 a montré des bénéfices confirmant ainsi la découverte d'une molécule prometteuse par ses activités biologiques, son mécanisme d'action, son efficacité et

sa sécurité (Sedel et al., 2016). Cette étude a été menée sur 23 patients atteints de SEP progressive traités par MD1003 pendant une durée moyenne de 9,2 mois (entre 2 et 36 mois) ; il a été montré une amélioration des signes cliniques qualitatifs ou quantitatifs, pour plus de 90% des patients (21/23), tels que la réduction de l'invalidité chronique, de l'handicap ainsi que la progression de la maladie. Une autre étude cohorte menée sur 154 personnes souffrant de SEP progressive traités par MD1003 a présenté une diminution du score EDSS (Expanded Disability Status Scale (EDSS) : échelle de Cotation de l'Handicap) chez 12,6% des patients traités par rapport au placebo (Sedel et al., 2016). Ceci est en faveur d'une efficacité de la biotine à forte dose comme traitement thérapeutique pour la SEP progressive (Sedel et al., 2015).

9.3. Traitement par des anticorps monoclonaux

➤ Le Natalizumab (Tysabri®)

Le Natalizumab est le premier anticorps monoclonal humanisé qui cible la sous-unité $\alpha 4\beta 1$ de l'intégrine « $\alpha 4$ -intégrine » protéine transmembranaire exprimée à la surface des lymphocytes et qui se lie à VCAM-1 exprimé à la surface des cellules endothéliales de la BHE. En effet, le Natalizumab a des effets anti-inflammatoires. Ce dernier bloque les interactions intégrine $\alpha 4\beta 1$ / VCAM-1 entraînant une inhibition de la migration lymphocytaire au sein du SNC (Ramos-Cejudo et al., 2011). Le Natalizumab a été approuvé comme traitement de la SEP-RR en 2007 à la suite d'études de phase III montrant une amélioration clinique, une disparition de prise de contraste sur les IRM et une diminution du risque de développement de la maladie avec une stabilité neurologique (Polman et al., 2006). Cependant, le traitement au Natalizumab n'est pas sans risque. Plus de 200 cas ont été rapportés avoir des infections notamment la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP), chez des patients traités par Natalizumab (Bloomgren et al., 2012).

➤ Le Daclizumab (Zinbryta®)

Le Daclizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre CD25 qui est le récepteur de l'interleukine 2 (IL-2) exprimé à la surface des lymphocytes T. En effet, le Daclizumab agit en bloquant le récepteur de l'IL-2 sur les cellules T, empêchant ainsi l'activation de ces cellules (Kim et al., 2006; Lutterotti and Martin, 2008). Ces dernières années, son utilisation a refait surface pour traiter les patients atteints de SEP-RR. Les effets indésirables associés au Daclizumab sont mineurs comparés aux autres traitements de SEP. Des infections,

des éruptions cutanées et des complications hépatiques peuvent apparaître suite au traitement au Daclizumab.

9.4. Traitements symptomatiques

Les patients atteints de SEP présentent une vaste gamme de symptômes importants et invalidants, notamment la fatigue, les troubles cognitifs, le dysfonctionnement de la vessie et des douleurs. Les symptômes ne sont pas tous dotés de traitements efficaces. Le Partenariat James Lind Alliance, une initiative de cliniciens pour la prise en charge des patients atteints de SEP, ainsi que la Société britannique de la SEP, ont souligné que l'une des 10 premières priorités est de déterminer les traitements efficaces pour améliorer la cognition chez les personnes atteintes de SEP sachant que cela a des effets socio-économiques dévastateurs sur cette jeune population. Les modalités de prise en charge actuellement disponibles sont pharmaceutiques et non pharmaceutiques (**Perry et al., 2014; Stevenson et al., 2016**).

9.5. Les nouvelles stratégies immunothérapeutiques

L'immunothérapie spécifique par un antigène, peptide ou l'utilisation de cellules immunitaires (cellules souches) vise à rétablir la tolérance tout en évitant l'utilisation d'immunosuppresseurs non spécifiques. C'est une approche prometteuse pour lutter contre les maladies auto-immunes, y compris la SEP. A ce titre, un certain nombre d'approches ont été utilisés.

➤ Cellules souches

Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes (CSH) sont des cellules isolées soit de la moelle osseuse, du sang de cordon ombilical ou du sang périphérique qui sont transplantés chez le receveur. Plus communément utilisé pour les hémopathies malignes (leucémie, myélome multiple), leur utilisation s'est étendue à des maladies auto-immunes. La première greffe de moelle osseuse faite en 1997 chez un patient atteint de leucémie myéloïde chronique souffrant aussi de SEP a montré une nette diminution des lésions cérébrales (**McAllister et al., 1997**). Rapidement la greffe de CSH a été utilisée chez les patients atteints de SEP-RR active et a montré une réduction de taux des poussées chez environ 70% des patients (**Mancardi and Saccardi, 2008**). L'efficacité clinique de la transplantation de CSH dans la SEP n'a pas été établie à long terme.

➤ **Les vaccins à ADN**

Le BHT-3009 est un vaccin à ADN codant pour la « Myelin Basic Protein » (MBP) humaine complète (**Katsara et al., 2008**). Chez 30 patients atteints de SEP-RR ou de SEP-SP ayant reçu 4 injections de BHT-3009, il a été montré que 3 mg était sans danger et conférait des améliorations à l'IRM cérébrale et une réduction du nombre des lymphocytes T CD4 + (**Katsara et al., 2008**). Cependant, dans une étude de phase II rétrospective et randomisée en double aveugle, le BHT-3009 n'a montré aucun impact sur la perte axonale et la progression de l'handicap.

➤ **Les nanoparticules fonctionnalisées**

Les nanoparticules polymériques biodégradables d'acide lactique-glycolique (PLGA) chargées de peptide MOG35–55 (« Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein ») ont été associées à l'IL-10 recombinante. *In vitro*, ces nanoparticules ont montré une grande affinité pour les cellules dendritiques qui les phagocytes (**Cappellano et al., 2014**). Des expériences *in vivo* menés sur des EAE, ont montré que l'encapsulation des nanoparticules MOG35–55 + IL-10 améliorait significativement l'évolution de l'EAE associée à une réduction de la sécrétion d'IL-17 et d'IFN- γ par les cellules T spléniques (**Cappellano et al., 2014**).

Récemment, autres types de nanoparticules tels que le poly-caprolactone porteuses de MBP humain a été montré capable de diminuer les lésions histopathologiques dans le tissu nerveux centrale au niveau de la gaine de myéline et d'inhiber la sécrétion de l'IFN- γ (**Al-Ghobashy et al., 2017**). L'ensemble de ces données suggèrent que les nanoparticules fonctionnalisées pourraient constituer un outil prometteur pour traiter la SEP.

II. Neurodégénérescence et dysfonction cellulaire

1. La neurodégénérescence

La neurodégénérescence est un phénomène qui se produit au niveau du SNC, caractérisée par une altération chronique et progressive de la structure et/ou des fonctions neuronales, entraînant des déficiences fonctionnelles et mentales (**Campbell et al., 1999**). Bien que les causes associées à la neurodégénérescence restent mal comprises, son incidence augmente avec l'âge (**Hof and Mobbs, 2010**).

La neurodégénérescence est une caractéristique de nombreuses maladies débilitantes et incurables dites « maladies neurodégénératives » dont la prévalence augmente rapidement, telles que la maladie de Parkinson (MP), la maladie d'Alzheimer (MA) et la sclérose en

plaques (SEP) qui se différencient par leurs pathophysiologies. Tandis que les principales causes des maladies neurodégénératives soient très différentes, le processus de la « neurodégénérescence » est présent dans la pathogenèse de ces différentes maladies. En effet, la neurodégénérescence est hétérogène, elle peut être myélinique ou non myélinique, et est souvent progressive d'une population précise de cellules nerveuses : des neurones dopaminergiques localisés au niveau de la substance noire dans la MP (**Fahn, 2003**), des neurones GABAergiques du striatum dans la maladie de Huntington (**Zoghbi and Orr, 2000**), des neurones cholinergiques au niveau de l'hippocampe et du cortex dans la MA (**Sabbagh and Cummings, 2011**), des motoneurones dans les maladies affectant le système moteur dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (**Swarup and Julien, 2011**). La neurodégénérescence peut être corticale (**Lucchinetti et al., 2011**) ou sous-jacente cérébrale et médullaire dans les axones dans le cas de la SEP (**Mahad et al., 2015**) dont la dégénérescence axonale est estimée de 60 à 70% (**Bjartmar et al., 2000**).

Dans la SEP, la neurodégénérescence, sous-jacente cérébrale et médullaire, est précoce, chronique et indépendante de la phase initiale de la maladie. Elle peut survenir dès le début de la maladie conduisant à une perte axonale qui se traduit cliniquement par une progression de l'handicap tant sur le plan moteur que cognitif, et qui correspond de façon prépondérante à la symptomatologie des formes progressives, contribuant ainsi à l'évolution de la SEP progressive.

La dégénérescence axonale, au niveau des lésions actives ou aiguës de la SEP, contribue d'une manière substantielle à l'atrophie cérébrale, mais ne cause pas initialement une invalidité neurologique en raison de la capacité du SNC humain à compenser la perte axonale (**Bjartmar et al., 2003**).

Les axones démyélinisés peuvent être réparés, mais cela dépendra du degré d'atteinte axonale. En effet, les axones peuvent s'échapper de la démyélinisation aiguë, mais pas de la démyélinisation chronique. Les lésions chroniques persistent pendant des décennies, tandis que les lésions aiguës durent que quelques semaines.

Le processus de la dégénérescence axonale n'est pas bien documenté. Toutefois, il peut varier d'un patient à un autre selon la taille, le nombre et la localisation des lésions (**Kornek et al., 2000**). Ainsi, l'atteinte axonale dans le cas d'une démyélinisation chronique des axones est une caractéristique de la SEP progressive. La lésion axonale est généralement considérée comme un événement secondaire à la démyélinisation, ou la lésion se propage de la myéline vers l'axone (modèle « extérieur »). Cependant, une lésion axonale primaire pourrait

déclencher une démyélinisation secondaire et une inflammation (modèle « inversé »). La question de savoir si le processus d'inflammation contribuant à une démyélinisation est exclusivement responsable du déclenchement de la pathologie de la SEP ou si les deux mécanismes (neurodégénérescence et inflammation) ont lieu simultanément dans la pathogenèse de la SEP, reste encore un sujet de débat (**Stys et al., 2012**).

Le concept d'atteinte primaire dirigée contre la myéline et l'oligodendrocyte avec une préservation axonale (dissociation axono-myélinique) a été récemment remis en question par la démonstration que l'atteinte neuro-axonale est un phénomène précoce, parallèle au processus inflammatoire, qui peut se rencontrer à l'écart des lésions myéliniques, et est directement lié à la progression de la maladie.

Le processus neurodégénératif dans la SEP, a été toujours considéré comme un mécanisme secondaire à la démyélinisation, est maintenant reconnu comme un phénomène majeur dans la physiopathologie de la SEP. Il est donc primordial de faire avancer la recherche dans ce domaine afin de développer des nouvelles pistes thérapeutiques efficaces (**Mahad et al., 2015**). Outre la démyélinisation, la dégénérescence axonale pourrait également être due à d'autres facteurs notamment à un stress oxydant et/ou à un dysfonctionnement mitochondrial au niveau des axones associé à une production diminuée d'ATP et une perturbation du bilan énergétique au niveau des axones (**Su et al., 2009; Mahad et al., 2015**).

Dans la SEP, plusieurs facteurs ont été rapportés comme étant potentiellement impliqués dans le processus de neurodégénérescence. Parmi ces facteurs figurent les facteurs génétiques, environnementaux et endogènes liés au vieillissement (**Jellinger, 2010**). Il est aussi important de signaler que plusieurs mécanismes et acteurs interviennent dans le processus de la neurodégénérescence en particulier la dégénérescence axonale tels que: l'inflammation, le dysfonctionnement mitochondrial et l'altération de la fonction bioénergétique, la rupture de l'équilibre RedOx et l'augmentation des dommages oxydants, les altérations du métabolisme du fer, des lipides et des glucides, les dysfonctionnements peroxysomaux et lysosomaux et l'implication de différents types de mort cellulaire (**Sheikh et al., 2013**).

2. Neurodégénérescence et inflammation

Plusieurs études ont montré l'implication du processus inflammatoire dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives (**Parajuli et al., 2013; Bassani et al., 2015; Chen et al., 2016**).

Le SNC est un organe à immunité privilégiée dont la réponse immunitaire innée et acquise est étroitement contrôlée en relation avec la périphérie. En effet, les effecteurs inflammatoires du système immunitaire ainsi que les cellules gliales, en particulier les cellules microgliales (microglies), agissent en tant que capteurs de la perturbation de l'homéostasie du tissu cérébral, contribuant ainsi à la perte neuronale *via* la surproduction des cytokines pro-inflammatoires et de radicaux libres conduisant à un déséquilibre du stress oxydant (**Kato et al., 2013**). Ceci suggère le rôle potentiel de la neuroinflammation dans le processus de la neurodégénérescence (**Peterson and Toborek, 2014; Tremblay and Sierra, 2014**). De ce fait, la neuroinflammation est définie comme une réaction inflammatoire qui se produit au niveau du SNC, suite à une infection ou une réponse à un traumatisme, favorisant la production, la prolifération et l'activation des microglies (microglies) et / ou des astrocytes (astroglies) au niveau du SNC, permettant ainsi la libération des médiateurs pro-inflammatoires et neuro-toxiques (**Wilkins et al., 2017**), qui sont impliqués dans la dégradation des protéines, le dysfonctionnement mitochondrial, la mort cellulaire par apoptose et même à la perte axonale et neuronale (**Chen and Chan, 2009**). En effet, la neuroinflammation est une caractéristique importante dans les maladies neurodégénératives en particulier la SEP.

Dans la MA, des taux élevés en cytokines pro-inflammatoires ont été observés dans le sérum et le tissu cérébral des patients atteints de MA (**Farooqui, 2014; Zhou et al., 2014**). Des microglies et des astrocytes activés ont été également identifiés au niveau des plaques séniles du cortex cérébral associés à une présence de peptide A β (dans les microglies activées et les astrocytes) (**Campos-Peña and Meraz-Ríos, 2014; Thériault et al., 2015**). Ceci laisse supposer que la dérégulation de la réponse inflammatoire est directement responsable de la perte neuronal dans la MA (**McGeer and McGeer, 2013**). En effet, les cellules microgliales et astrocytaires activées libèrent des enzymes protéolytiques, des cytokines, des chimiokines (interleukine-1 β (IL-1 β), interleukine-6 (IL-6), interleukine-8 (IL-8)) et des protéines de complément tels que le « macrophage inflammatory protein » (MIP)-1 α , le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α ou le facteur de croissance tumorale TGF- β (**Heppner et al., 2015**). Ces médiateurs neuro-inflammatoires initiés par l'exposition au peptide A β (**Vassar et al., 2009**), seraient impliqués dans l'activation de la voie du facteur nucléaire NF- κ B, l'induction d'un stress oxydant, la surproduction d'espèce réactives oxygénées (ERO) et nitrées (ERN) ainsi que la rupture de l'homéostasie ionique (**Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012**).

Le processus neuroinflammatoire a été également décrit dans la MP. Plusieurs études ont montré une augmentation du nombre des cellules microgliales activées, contribuant ainsi dans la production des radicaux libres (anions superoxydes et d'oxyde nitrique (NO)), et l'augmentation de la réponse inflammatoire par la libération des cytokines pro-inflammatoires dans la substance noire des patients atteints de la MP. Etant donné que les cellules microgliales activées sont les principaux acteurs de la neuro-inflammation, ces dernières sont impliquées activement dans le processus de la neurodégénérescence dans la MP. Ainsi ces microglies activées sont responsables à la perte des neurones dopaminergiques dans la MP via la sécrétion accrue des agents neurotoxiques et de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines et chimiokines) conduisant à la génération des radicaux libres et à l'altération de l'homéostasie RedOx (**McGeer and McGeer, 2004; Hirsch and Hunot, 2009**).

De plus, le phénomène de la neuro-inflammation a été largement étudié dans la pathogenèse de la SEP, contribuant initialement à la perturbation du système immunitaire ce qui pourrait conduire à une perte des oligodendrocytes (cellules productrices de myéline) et à la démyélinisation ou même à une perte axonale associée à une perte neuronale.

Au cours de la SEP, la rupture de la BHE et l'activation excessive des microglies cérébrale entraînent une infiltration importante de lymphocytes autoréactifs, provoquant la mort des oligodendrocytes et des lésions axonales, associés à une démyélinisation, une altération synaptique et une perte neuronale (**Compston and Coles, 2008; Calabrese et al., 2015; Mahad et al., 2015**) (**Figure 4**). Ce processus inflammatoire met en jeu les cellules de l'immunité adaptative, à savoir les lymphocytes T CD8 et CD4 auto-réactifs spécifiques de la myéline (T-helper1 et T-helper 17), et les lymphocytes B qui produisent des taux élevés d'autoanticorps dirigeant contre la gaine de la myéline participant ainsi à neurodégénérescence. Ces attaques immunitaires conduisent à la destruction de la gaine de myéline, nuisant ainsi à la conduction axonale de l'influx nerveux et à la communication entre les différents compartiments du système nerveux (**Gandhi et al., 2010; Mahad et al., 2015**). Ces processus sont soutenus ultérieurement par le recrutement des cellules de l'immunité innée à la périphérie ce qui amplifieront d'avantage l'activation des cellules T contribuant ainsi à la perte des oligodendrocytes et à la destruction axonale et neuronal. En outre, ces phénomènes sont accompagnée par une activation permanente des microglies et des astrocytes qui potentialisent d'avantage la réponse neuro-inflammatoire en produisant médiateurs pro-inflammatoires (**Gandhi et al., 2010**). Le recrutement et l'activation des microglies et des astrocytes conduit à ce qu'on appelle astrogliosis, caractéristique de la neuro-inflammation,

qui conduit à des cicatrices gliales empêchant la régénération axonale (Jensen et al., 2013) (Figure 4).

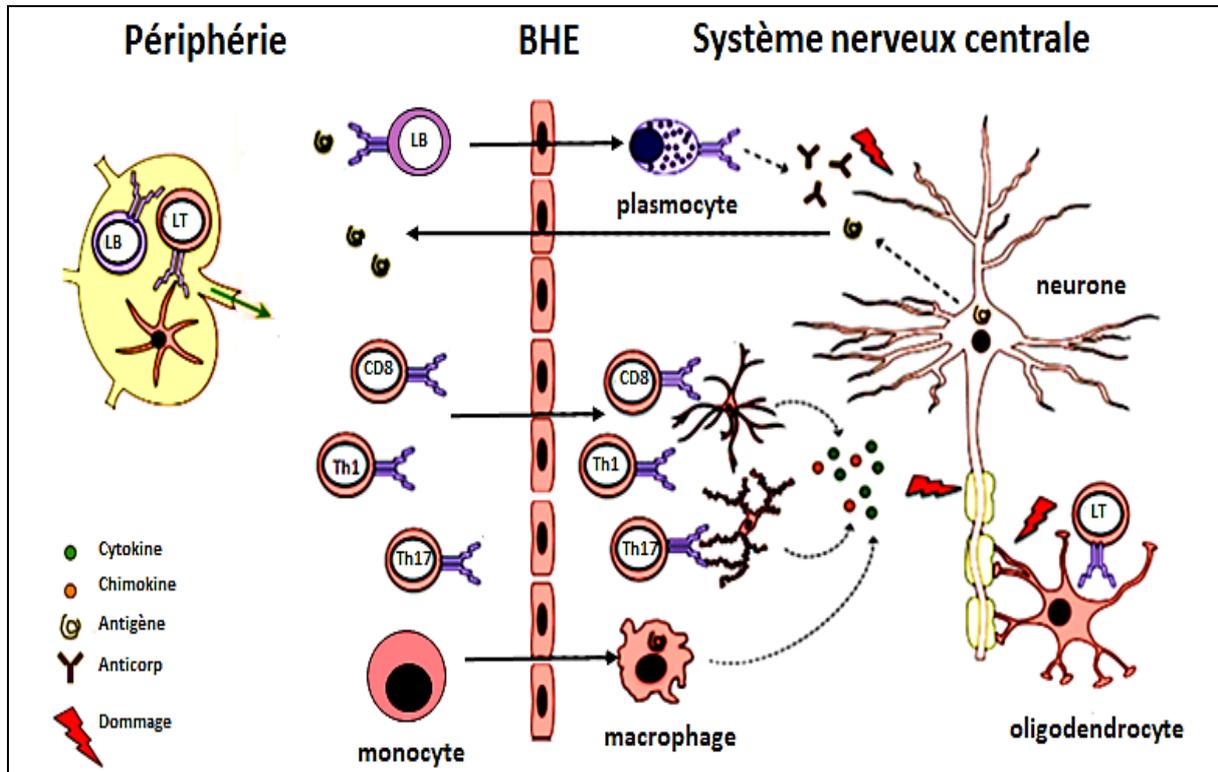


Figure 4 : Processus de la neuro-inflammation dans la SEP

La lésion de la BHE et / ou l'hyperactivation des cellules microgliales au niveau du SNC entraînent une infiltration massive des cellules T autoréactives (cellules T auxiliaires CD8 et CD4), des cellules B et des cellules présentatrices d'antigène (CPA) comprenant des monocytes et des macrophages. Dans le cerveau, les lymphocytes T et les monocytes / les macrophages libèrent des cytokines et des chimiokines conduisant à une destruction des cellules oligodendrocytaires et une démyélinisation. De manière concomitante, les cellules B (cellules plasmiques) produisent des anticorps spécifiques, qui forment des complexes d'attaque membranaire qui endommagent la gaine de myéline. Ces processus conduisent à une suractivation des microglies et des astrocytes, qui potentialisent d'avantage la réponse inflammatoire et le processus neurodégénératif (Chiurchiù et al., 2018).

3. Neurodégérescence et stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production des espèces pro-oxydantes et leurs destruction par des systèmes de défense anti-oxydant engendrant des dégâts souvent irréversibles. Il est caractérisé par une augmentation de la production des radicaux libres et la diminution du pouvoir des systèmes de défenses anti-oxydantes

(Dizdaroglu and Karakaya, 2012). En effet, le stress oxydant est un composant critique, qui peut entraîner des dommages aux macromolécules cellulaires, jouant ainsi un rôle important dans la physiopathologie d'une variété de maladies neurodégénératives en particulier la sclérose en plaque.

3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Le dioxygène (O_2) est un élément indispensable au fonctionnement normal de tous les organismes vivants. Son rôle dans la survie cellulaire est associé à son potentiel RedOx élevé, ce qui lui fait un excellent agent oxydant capable de capter facilement des électrons libres à partir de substrats réduits. Selon leurs nécessités métaboliques, les cellules ont des besoins différents en oxygène. Les neurones et les astrocytes, qui sont les deux principaux types de cellules cérébrales, sont en grande partie responsables de la consommation massive d'oxygène et du glucose dans le cerveau; en effet, le cerveau ne représente qu'environ 2% du poids total du corps, cependant il requiert plus de 20% de la consommation totale d'oxygène **(Halliwell, 2006)**. Malgré la nécessité des organismes aérobies en oxygène, l'état d'hyperoxie (due à un excès d'apport d'oxygène) induit une toxicité, notamment une neurotoxicité **(Zhang et al., 2015)**. La toxicité et l'activité chimique de l'oxygène dépendent de sa structure électronique, en raison de la présence de deux électrons non appariés sur la couche externe. Les états de spin identiques de ses deux électrons orbitaux externes confèrent à l'oxygène une très grande stabilité, à l'exception des catalyseurs appropriés qui brouillent les états spin des électrons pour produire des formes d'oxygène partiellement réduites, forment des intermédiaires radicalaires, très réactifs et très instables, connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO incluent à la fois des espèces radicalaires, tels que le radical hydroxyl ($\bullet OH$) et l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), et des espèces non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et le trioxygène (ozone (O_3)) qui peuvent être facilement convertis en radicaux libres **(Chen et al., 2012; Halliwell, 2006)**.

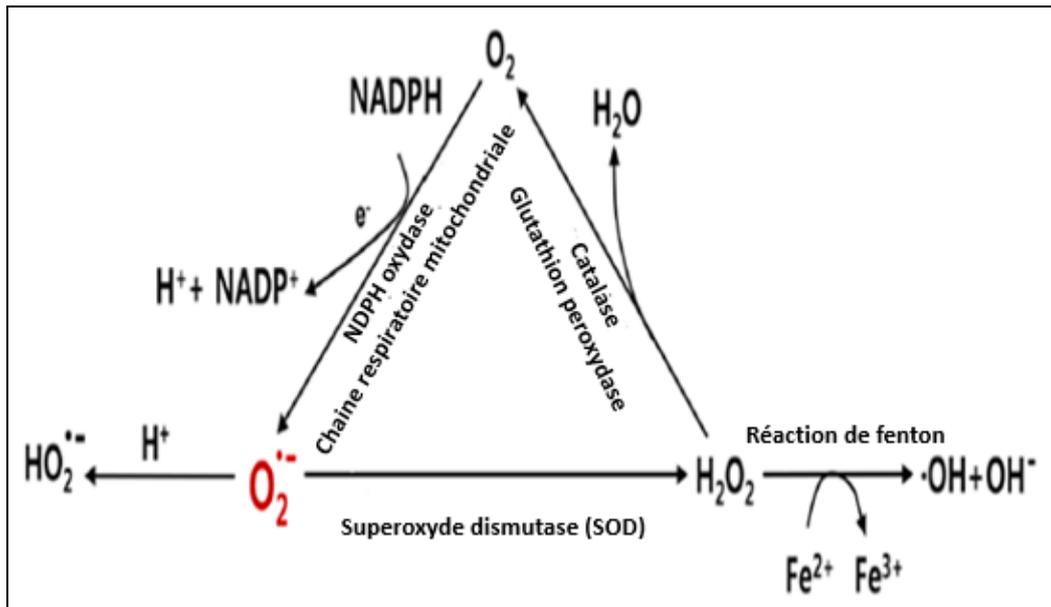


Figure 5 : Génération des ERO

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), est généré à partir d' O_2 en tant que sous-produit du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale ou par la NADPH oxydase. La superoxyde dismutase (SOD), transforme le $O_2^{\bullet-}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peut ensuite être transformé en plusieurs autres ERO tels que le radical hydroxyl ($\cdot OH$) et l'anion hydroxyl (OH^-).

L' $O_2^{\bullet-}$ est un radical précurseur d'autres ROS. Ainsi, il peut former d'autres espèces plus réactives. En effet, il peut être converti, lors d'une réaction enzymatique par la superoxyde dismutase (SOD), en H_2O_2 qui est extrêmement réactif, possédant ainsi un fort pouvoir oxydant. Le H_2O_2 peut potentiellement générer, suite à sa décomposition par le Fe^{2+} selon la réaction de Fenton, des radicaux hydroxyles ($\cdot OH$) qui sont hautement réactifs (Patten et al., 2010; Zorov et al., 2014) (Figure 5), et il peut aussi se dégrader en H_2O et O_2 par des enzymes antioxydantes tels que la catalase, la glutathion peroxydase ou d'autres peroxydases (Song and Zou, 2015). L' $\cdot OH$ est connu pour être l'un des ERO le plus réactif et le plus instable, responsable aux effets cytotoxiques des ERO (Bolisetty and Jaimes, 2013).

3.1.1. Les sources de production d'ERO au niveau du cerveau

Les ERO cellulaires sont générées à la fois par des sources exogènes et des sources endogènes (Kim et al., 2015; Song and Zou, 2015).

- **Les sources exogènes** comprennent les ultraviolets (UV), les rayonnements ionisants, les médicaments, les toxines et les produits environnementaux chimiques qui peuvent produire des ERO en tant que sous-produit de leurs métabolismes (Kim et al., 2015).

- **Les sources endogènes de production d'ERO** sont médiées par des enzymes mitochondriales et non-mitochondriales, notamment les nicotinamides adénines dinucléotides phosphates (NADPH), les oxydases (Nox), les xanthines oxydases (XO), les cytochrome P450 du réticulum endoplasmique (RE) et les flavines oxydases du peroxyosome (**Kim et al., 2015; Song and Zou, 2015**).

3.1.1.1. Les sources d'ERO au niveau mitochondrial et peroxysomal

La mitochondrie est un organe très abondant dans les cellules humaines, dont les plus part contiennent environ 2 000 mitochondries, ceci varie selon le type cellulaire et leurs besoins énergétiques. Les mitochondries constituent les principales sources de production des ERO. Elles produisent elles seules près de 50% des ERO dans les cellules.

Dans les conditions physiologiques, jusqu'à 2% de la consommation totale d'O₂ cellulaire mitochondriale peut être liée à la génération d'ERO, notamment d'O₂^{•-} (**Orrenius, 2007**). Il existe d'ailleurs plusieurs voies de production mitochondriale des ERO, qui sont principalement modulées par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Widlansky and Gutterman, 2011**). La chaîne du transport d'électrons mitochondriale (ETC) consiste en cinq complexes protéiques comprenant la NADH-coenzyme Q (CoQ) réductase (NADH déshydrogénase, Complexe I), la succinate déshydrogénase (Complexe II), la coenzyme Q-cytochrome c réductase (Complexe III), le cytochrome C oxydase (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V) (**Song and Zou, 2015**).

- ✓ **Le complexe I** est responsable de la production des ERO de type O₂^{•-} et facilite le transfert des électrons du NADH vers le CoQ. Au cours de cette étape, les protons sont transférés de la matrice à l'espace intermembranaire (**Bolisetty and Jaimes, 2013**).
- ✓ **Le complexe II** est impliqué dans la réduction de CoQ et il est connu pour être impliqué dans la production de faibles niveaux de O₂^{•-} (**McLennan and Degli Esposti, 2000**).
- ✓ **Le complexe III**, en revanche, participe à la génération d'O₂^{•-} dans l'espace intermembranaire.
- ✓ **Le complexe IV** est le dernier de la chaîne de transport d'électrons. Il catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau
- ✓ **Le complexe V**, l'ATP synthase, utilise le gradient de protons pour synthétiser de l'ATP dans la matrice mitochondriale

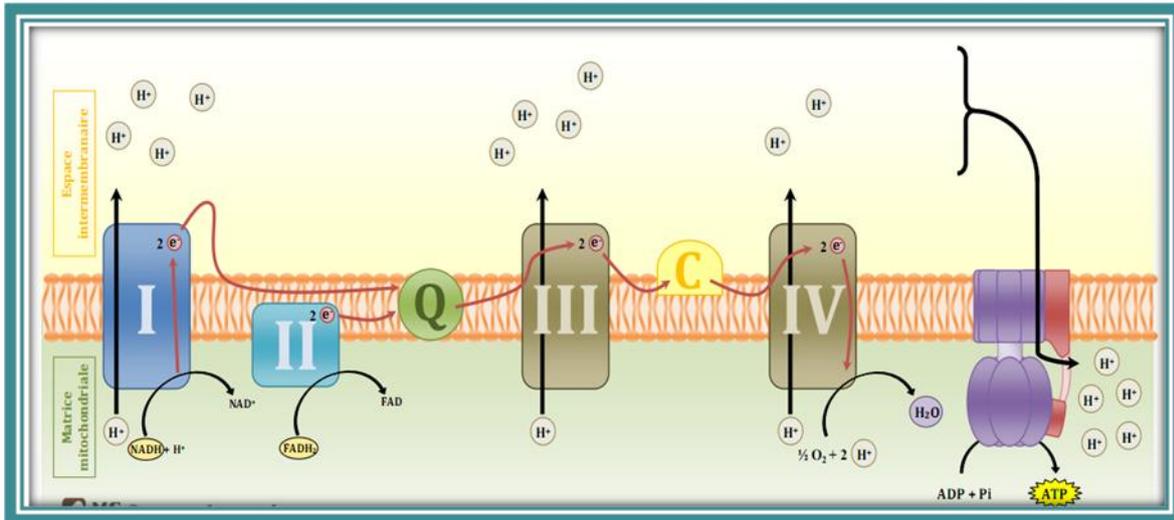


Figure 6 : Schéma représentatif de chaîne de transport des électrons et des sites de production des ERO au niveau de la membrane interne mitochondriale

Le complexe I et III de la chaîne respiratoire sont impliqués dans la génération de l'anion $O_2^{\bullet -}$. NAD et $FADH_2$ transfèrent respectivement les électrons vers les complexes I et II qui subissent un cheminement vers le complexe III et IV constituant ainsi la fin de la chaîne d'oxydo-réduction. Le transfert des électrons implique également le passage des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter membranaire, ce qui établit un gradient électrochimique de protons et une différence de potentiel (potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$).

La génération d' $O_2^{\bullet -}$ est particulièrement augmentée lorsque le transfert des électrons est réduit et du fait le potentiel transmembranaire mitochondrial est augmenté (**Bolisetty and Jaimes, 2013**). La capacité de ces enzymes à produire des ERO peut être variée selon les organes ou en cas de maladie.

La chaîne respiratoire, associée au transport des électrons, est considérée comme la principale source endogène de production des ERO via les complexes I et III (**Song and Zou, 2015**). Le complexe I semble contribuer à la production de la plus grande partie d' $O_2^{\bullet -}$ dans le cerveau, tandis que le complexe III est considéré comme la source principale d' $O_2^{\bullet -}$ dans le cœur et les poumons. En effet, dans les conditions pathologiques telles que la survenue des maladies neurodégénératives, le complexe I joue un rôle important dans la production des ERO à savoir les $O_2^{\bullet -}$ (**Zorov et al., 2014**). L' $O_2^{\bullet -}$ peut traverser la membrane mitochondriale interne ou il peut être réduit en H_2O_2 sous l'action des SOD. Les H_2O_2 peuvent être convertis en H_2O et O_2 sous l'action de la catalase peroxysomale. Cependant, en cas d'un dysfonctionnement peroxysomal et en présence des métaux de transition (Fe^{2+}), le H_2O_2 libéré dans le cytosol

peut être converti en OH^\bullet , hautement réactif et nocif, via la réaction de Fenton (**Valko et al., 2007**) (**Figure 4-5**).

Les peroxysomes sont considérés également comme source endogène importante de production des ERO. Ce sont des organites cellulaires ubiquitaires présents dans toutes les cellules à l'exception des érythrocytes. Les peroxysomes sont de petites structures sphériques ou ovoïdes de 0,1 à 1 μm qui possèdent une simple membrane phospholipidique de 6 à 8 nm d'épaisseur limitante une fine matrice granulaire contenant des inclusions cristallines d'enzymes matricielles, qui peuvent parfois former des noyaux cristalloïdes structurés. Les peroxysomes sont divers et dynamiques. Ils peuvent changer leurs formes et être allongés ou même former des réticules dans certains types cellulaires et certains environnements (**Grabenbauer et al., 2000**).

Dans les conditions physiologiques, la consommation d'oxygène au niveau des peroxysomes peut conduire à la surproduction de H_2O_2 , mais pas d' $\text{O}_2^{\bullet -}$. Les peroxysomes produisent la majorité de H_2O_2 cellulaire *via* un certain nombre d'oxydases, telles que l'acyl-CoA oxydase, la D-aspartate oxydase et l'urate oxydase. En outre, les peroxysomes possèdent également des catalases capables de décomposer le H_2O_2 et de maintenir l'équilibre entre la production et l'élimination des ERO (**Valko et al., 2007**). Cependant, lorsque les peroxysomes sont endommagés, la quantité de catalase diminue et la libération de H_2O_2 dans le cytosol augmente, ce qui peut entraîner un stress oxydant (**Valko et al., 2007**).

3.1.1.2. Les sources d'ERO au niveau du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire à base de membrane, qui a pour principale fonction la synthèse de protéines membranaires, le repliement des protéines et la biosynthèse des lipides. Le RE peut générer des ERO selon deux mécanismes (**Bhandary et al., 2012**).

✓ Dans les conditions physiologiques, le RE est le siège de la formation des liaisons disulfures et de repliement des protéines, par l'intermédiaire de l'oxydoréduction-1 du RE (REO-1) et de la protéine disulfure-isomérase (PDI), afin d'assurer la stabilité et la maturation de la membrane. Ceci favorise la production des ERO en tant que sous-produits lors du transfert des électrons de la protéine contenant des ponts S-S vers l'oxygène (**Bhandary et al., 2012**).

✓ Les ERO sont également produites par un mauvais repliement des protéines, en

particulier en cas d'épuisement du glutathion réduit (GSH) (**Bhandary et al., 2012**). Ainsi, les thiols oxydés sont réparés pour interagir avec REO-1 et PDI par le glutathion (GSH). Ces étapes initieraient des cycles répétitifs de rupture et de formation de liaisons disulfures au sein de la lumière du RE, générant davantage d'ERO.

3.1.1.3. Les NADPH oxydases (Nox)

Les Nox, sont des complexes enzymatiques transmembranaires connus comme source endogène importante de production d' $O_2^{\cdot -}$ (**Babior, 2004**). Les Nox sont fortement présentes dans les phagocytes (neutrophiles, éosinophiles, monocytes et macrophages, appelés Phox ou Nox2), ainsi que dans l'endothélium des tissus cardiovasculaires (**Babior, 2004**). Jusqu'à présent, 7 isoformes de Nox ont été identifiées dans des cellules des mammifères, notamment les Nox1 à Nox5 et les doubles oxydases (Duox1 et Duox2) (**Lambeth, 2004**). Chaque isoforme de Nox a une localisation, une régulation et une fonction cellulaire unique (**Song and Zou, 2015**). Par exemple, Nox4 et Nox2 sont abondants, alors que Nox1 est moins présent dans les cellules endothéliales (**Gorlach et al., 2000**). En revanche, Nox1 et Nox4 sont les isoformes les plus fortement exprimées dans les cellules du muscle lisse vasculaire (**Wingler et al., 2001**). Nox2, est principalement exprimée dans les phagocytes et produit de grandes quantités d'ERO, dont le rôle est de neutraliser les xénobiotiques (**Babior, 2004; Patten et al., 2010**).

3.2. Les sources de production des espèces réactives de l'azote (ERN) au niveau du cerveau

L'oxyde nitrique (NO) est un produit d'oxydation de la L-arginine catalysée par les différentes formes d'oxyde nitrique synthase (NOS). C'est une molécule de signalisation biologique importante qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la défense immunitaire. De plus, le NO joue un rôle essentiel dans la modulation de la fonction vasculaire et du débit sanguin et peut potentiellement jouer le rôle de neurotransmetteur dans certains contextes. Le NO réagit avec l'anion superoxyde entraînant la formation de peroxyde nitrique hautement réactive (ONOO). L'oxyde nitrique peut avoir des effets pro- et anti-inflammatoires sur les tissus en fonction de l'état de l'équilibre RedOx. Le stress nitrosatif peut entraîner des réactions de nitrosylation susceptibles d'altérer la structure et la fonction de l'ADN, des protéines et des lipides (**Valko et al., 2007**).

3.2. Les mécanismes anti-oxydants

Dans le cas d'un stress oxydant, la cellule doit s'opposer contre le développement et la propagation du stress, en maintenant l'équilibre entre la production des ERO et leurs destructions par des systèmes de défense anti-oxydants. Ces systèmes antioxydants peuvent être des antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques.

3.3.1. La superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD) joue un rôle important dans la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ hautement réactif en H_2O_2 et en oxygène (**Dasuri et al., 2013**). La SOD existe sous trois isoformes distinctes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme nucléaire ou cytosolique associée aux ions cuivre et/ou au zinc ; SOD-cuivre / SOD-zinc (SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse ; Mn-SOD (SOD2) et une troisième forme extracellulaire (SOD3). La SOD1 et la SOD2 sont principalement impliqués dans l'élimination d' $O_2^{\bullet -}$ dans le cytosol et les mitochondries (**Dasuri et al., 2013**).

3.3.2. La glutathion peroxydase (GP_X)

Les GP_X appartiennent à une famille de multiples isoenzymes qui métabolisent une grande variété d'hydroperoxydes (R-OOH). Elles catalysent aussi la réduction de H_2O_2 en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons (**Powers et al., 1998; Mates et al., 1999**). Les GP_X sont situées à la fois dans le cytosol associé à des phospholipides (PHGP_X) et/ou dans les membranes mitochondriales impliquées dans la diminution de la peroxydation lipidique. Il existe cinq isoformes différentes de GP_X séléno-dépendantes caractérisées par la présence d'un atome de sélénium au niveau de leur site actif (GP_X1-4 et 6) et trois isoformes non-séléno-dépendantes (GP_X 5, 7 et 8) qui ont de la cystéine au lieu de sélénocystéine (**Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013**). La fonction antioxydante de GP_X dépend de la nature du chaque isoforme et de leur localisation dans les cellules; par exemple la GP_X 1 est localisée universellement dans le cytosol et les mitochondries, la GP_X2 dans l'épithélium de l'intestin et la GP_X 3 dans le plasma cellulaire (**Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013**). Il convient de noter que la GP_X1 est considérée comme l'une des principales enzymes anti-oxydantes du cerveau, qui s'exprime principalement dans la microglie mais non pas dans les neurones (**Power and Blumbergs, 2009**). Des études antérieures ont suggéré que la régulation de la GP_X1 pourrait être l'une des mécanismes protectrices contre les lésions neuronales (**Power and Blumbergs, 2009**).

3.3.3. La catalase

La catalase est une enzyme responsable de la conversion de H₂O₂ en eau (H₂O) et en oxygène (O₂) en utilisant le fer ou le manganèse comme cofacteur. La catalase est localisée préférentiellement au niveau du peroxysome et en faible quantité dans le cytoplasme et les mitochondries. L'affinité de la catalase pour le H₂O₂ est mineure en cas d'une faible concentration en H₂O₂, mais elle devienne de plus en plus importante lorsque les teneurs en H₂O₂ sont élevées (**Gandhi and Abramov, 2012**).

3.3.4. Les peroxiredoxines (PRX)

Les PRX sont des peroxydases thiol-spécifiques qui catalysent la réduction de H₂O₂ de peroxy-nitrites, ainsi que d'autres hydroperoxydes organiques (**Espinosa-Diez et al., 2015**). Il existe six isoformes de PRX qui se différencient par leurs localisations cellulaires. Par exemple; la PRX 1, 2 et 4 sont présentes à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. En outre, la PRX1 est également exprimé dans les mitochondries et les peroxysomes, tandis que la PRX4 peut se trouver à part dans les cytoplasmes dans les lysosomes des cellules (**Espinosa-Diez et al., 2015**). La PRX3 est exclusivement localisée dans les mitochondries (**Espinosa-Diez et al., 2015**), tandis que la PRX5 se trouve dans les mitochondries, les cytoplasmes, les noyaux et les peroxysomes des cellules (**Seo et al., 2000**). Tous les PRX partagent le même mécanisme catalytique. Elles utilisent le résidu cystéine du site actif pour réduire le H₂O₂ (**Hall et al., 2011**). Comme les PRX sont abondantes dans les cellules eucaryotes, elles constituent environ plus de 1% des protéines cellulaires et présentent une réactivité élevée ; elles sont responsables de la réduction de 90% de H₂O₂ mitochondrial et de presque 100% de H₂O₂ cytoplasmique (**Hall et al., 2011**).

3.3.5. Le glutathion

Le glutathion constitue la première ligne de défense anti-radicalaire. Il existe en deux formes : une forme réduite (GSH) très abondante, et une forme oxydée (GSSG). Le GSH joue un rôle important dans la protection cellulaire contre le stress oxydant (**Dasuri et al., 2013**). C'est un tripeptide synthétisé à partir de glutamate, de la cystéine et de la glycine d'où le nom de γ -glutamine-cystéine-glycine. La synthèse intracellulaire de GSH implique deux réactions enzymatiques ATP-dépendante. Le γ dipeptide de γ -glutamyl-cystéine est formé par la γ -glutamylcystéine synthétase, en utilisant le glutamate et la cystéine comme substrats. Le GSH est ensuite synthétisé par la glutathion synthétase à partir de γ -glutamyl-cystéine en présence

de la glycine et de l'ATP. (Lee et al., 2010) (Figure 7). Le GSH est impliqué dans les deux types de réactions suivantes:

- Le GSH, sous sa forme réduite, est connu pour interagir (réaction non enzymatique) avec les ERO tels que le $O_2^{\bullet -}$ et le $\cdot OH$ jouant ainsi un rôle important dans la détoxification des ERO (Dringen et al., 2000).
- Le GSH est une source principale d'hydrogène ; il constitue un substrat pour le GPx. Cette réaction enzymatique produit une molécule de GCCG. Ce dernier peut être régénérer par le système glutathion réductase / NADPH. Dans des conditions de stress oxydant, la capacité de la cellule à réduire le GCCG sera diminuée ce qui induit son accumulation (Dringen, 2000).

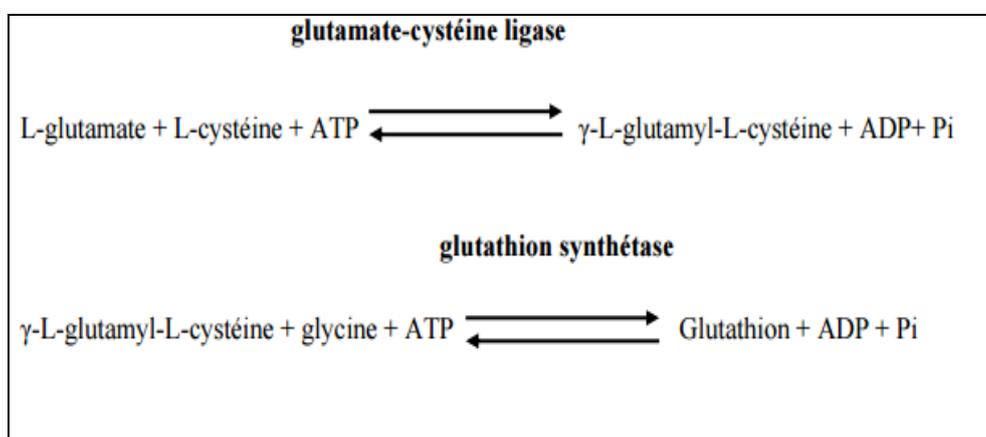


Figure 7 : Schéma simplifié de synthèse du glutathion (Dickinson and Forman, 2002)

Plusieurs études ont montré que le GSH est impliqué dans de nombreux processus métaboliques tels que la prévention de l'oxydation de groupement thiols grâce à son pouvoir réducteur et sa capacité de maintenir des connexions intracellulaires. En effet le GSH piège les ERO puisqu'il réagit avec les radicaux hydroxyls et il peut chélater les ions Cu^{2+} ce qui limite ainsi leur participation dans la réaction de fenton et la génération des radicaux libres. Il est aussi impliqué dans l'inhibition de la mort cellulaire par apoptose (Abramov et al., 2007) et les dommages à l'ADN (E Presnell et al., 2013).

3.3.6. La Vitamine E

La vitamine E (Vit E) est un anti-oxydant liposoluble, qui protège les membranes cellulaires des dommages causés par les ROS grâce à sa capacité de neutraliser les radicaux peroxydes ($ROO\bullet$). En effet, la Vit E se fixe aux membranes cellulaires et peut ainsi séquestrer les radicaux libres. Elle agit en cédant son hydrogène, pour réduire le radical $O_2^{\bullet -}$ et dans le but

d'empêcher la propagation radicalaire et d'inhiber la peroxydation lipidique (**Gandhi and Abramov, 2012; Dasuri et al., 2013**). Il existe plusieurs isoformes de tocophérols, parmi lesquels l' α -tocophérol est la forme la plus active.

3.3.7. La Vitamine C

La vitamine C appelée aussi acide ascorbique, est synthétisée à partir de l'acide glucuronique un dérivé de glucose. C'est un anti-oxydant hydrosoluble qui participe à l'élimination des radicaux libres comme l' $O_2^{\cdot-}$ et l' OH^{\cdot} par le transfert d'électrons et joue également le rôle de cofacteur de plusieurs enzymes anti-oxydantes. Cette vitamine possède aussi la capacité de réduire le radical α -tocophérol, ce qui permet une meilleure efficacité à la vitamine E (**Packer., 1997; Evans., 2000**). En effet, la vitamine C a un potentiel réducteur (**Dasuri et al., 2013**).

3.4. Importance du stress oxydant dans la neurodégénérescence

Dans les conditions physiologiques, les cellules génèrent les ERO en faible quantité afin d'assurer l'activation de diverses voies de signalisation indispensables à la survie cellulaire tels que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (**Stone and Yang, 2006; Brown and Griendling, 2009**), la régulation de l'excitabilité neuronale, la plasticité synaptique, la transcription génique et l'activité des enzymes qui contrôlent la phosphorylation des protéines (**Farooqui and Farooqui, 2011**). La production cellulaire et/ou tissulaire des ERO est contrôlée par un système anti-oxydant pour prévenir et empêcher leur accumulation excessive (**Barouki, 2006**). Cependant, à des concentrations élevées d'ERO, ou lorsque le système de défense antioxydant est insuffisant ou impuissant, une répture intra-cellulaire de l'équilibre RedOx peut se produire associée à de nombreuses affections pathologiques et à des maladies, notamment des maladies neurodégénératives (**Halliwell, 2006**).

Les radicaux libres en particulier les ERO peuvent contribuer au développement et à la propagation des processus de la neurodégénérescence qui se traduit par diverses altérations biochimiques intracellulaires, provoquant ainsi l'oxydation des protéines, des lipides, de l'ADN et de l'ARN (**Gandhi and Abramov, 2012**). Bien que la neurodégénérescence dans les troubles neurologiques soit un processus multifactoriel (**Farooqui, 2010**), il est de plus en plus évident que le principal facteur sous-jacent est l'augmentation du stress oxydant (**Fernstrom, 1999**). En effet, la perte progressive ou la dégradation, par les radicaux libres, de la structure et/ou de la fonction des neurones est connue sous le nom de neurodégénérescence.

Le cerveau est un organe particulièrement vulnérable au stress oxydant. En effet, le besoin accru en oxygène est associé à un métabolisme oxydatif élevé. Cependant, il est relativement déficient en enzymes anti-oxydantes (**Nunomura et al., 2006**), ce qui favorise l'augmentation de la production des ERO et des ERN. En plus, le SNC est riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont facilement oxydés par des ERO (peroxydation lipidique) (**Perry et al., 2002**). La présence de la BHE est considérée comme un inconvénient supplémentaire pour le cerveau qui lui rend encore plus sensible au stress oxydant. La BHE est conçue pour protéger le cerveau contre les toxines en limitant leur diffusion dans les neurones et dans les cellules gliales. Cependant, elle empêche ou réduit l'absorption de certains agents antioxydants comme la vitamine E dans le cerveau, ce qui facilite la propagation des radicaux libres et leurs effets toxiques. Le stress oxydant est donc un dénominateur commun de toutes les maladies neurodégénératives, puisqu'il est l'événement principal conduisant à la dégénérescence (**Lin and Beal, 2006**).

Dans la MA, le stress oxydant est associé à une augmentation de l'oxydation d'ADN nucléaire dans le cortex pariétal (**Indo et al., 2015**) et à des niveaux accrus de produits de la peroxydation lipidique tels que les malondyaldéhydes (MDA) et les 4-hydroxynonénals (4-HNE) dans le cerveau et liquide céphalo-rachidien (LCR) et une augmentation du niveau des produits d'oxydation des protéines (protéines carbonylées) dans le front, le cortex pariétal et l'hippocampe du cerveau des patients atteints de la MA (**Luca et al., 2015**). Ces données cliniques ont été aussi supportées par des études *in vivo* chez un modèle animal transgénique MA, qui ont révélé des niveaux élevés des produits d'oxydation protéiques et des produits de peroxydation lipidiques dans le cortex et l'hippocampe avant l'apparition des plaques et la survenue de la MA (**Praticò, 2008**). Plusieurs évidences suggèrent l'association entre les effets délétères du stress oxydant et le dysfonctionnement mitochondrial dans la MA. Ces altérations sont associées à l'accumulation des ERO dans la mitochondrie, entraînant ainsi une perturbation de la perméabilité membranaire mitochondriale et une accumulation de calcium mitochondrial qui pourrait être responsable de la translocation des molécules pro-apoptotiques de la mitochondrie vers le cytosol entraînant une apoptose. (**Gandhi and Abramov, 2012**). En outre, les ERO entraînent également des altérations de l'ADN mitochondrial des patients atteints de la MA (**Wang et al., 2014**).

Dans la MP, le stress oxydant est manifesté par une diminution de la concentration des acides gras polyinsaturés associé à une augmentation du niveau des marqueurs de peroxydation lipidique (malondialdéhyde et 4-hydroxynonéal) (**Dalfó et al., 2005**) et des produits

d'oxydation protéiques (**Beal, 2002**), des altérations des acides nucléiques qui se traduit par une oxydation d'ADN et d'ARN et une augmentation du niveau du 8-hydroxydeoxyguanosine (**Seet et al., 2010**), accompagné des délétions de l'ADN mitochondrial des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire des patients atteints de la MP (**Bender et al., 2006**). Outre l'attaque des ERO, certaines données suggèrent que la nitration et la nitrosylation de certaines protéines pourraient conduire à l'accumulation des espèces réactives d'azote dans le cerveau des patients atteints de la MP (**Brown and Borutaite, 2004**).

L'implication du stress oxydant a été également mise en évidence chez des patients atteints SEP, caractérisé par des niveaux élevés en ERO et une altération du système de défense antioxydant. Ce déséquilibre entre la production excessive des ERO et la baisse de l'activité antioxydante entraîne la propagation du stress oxydant et l'évolution de la pathologie (**Ferretti et al., 2005; Van Meeteren et al., 2005; Koch et al., 2006**).

Dans la SEP, la survenue des dommages oxydants est corroborée par une augmentation de l'expression de marqueurs des dommages oxydants dans le tissu cérébral. Ceci est manifesté par des niveaux élevés de produits de la peroxydation lipidiques tels que le (4- HNE). Dans les lésions démyélinisantes actives de SEP (**Van Horsen et al., 2008**). Ces dommages oxydants sont associés à la production du peroxy-nitrite (suite à la réaction entre l'oxyde nitrique et le superoxyde), qui est un radical libre diffusible capable d'intégrer avec les résidus tyrosine des protéines pour former la nitrotyrosine, qui est présent en grande quantité dans les macrophages et les astrocytes hypertrophiques de grande taille au niveau des lésions actives du SEP. Ceci suggère que les macrophages et les astrocytes sont des cibles directes des dommages oxydants (**Van Horsen et al., 2008**). Le stress oxydant est associé également à un taux accru en 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine, révélant des dommages d'ADN mitochondrial, d'ADN nucléaire ou d'ARN (**Van Horsen et al., 2008**), ainsi qu'une augmentation du niveau des protéines carbonylés et du stress nitrosatif dans la matière blanche et grise du tissu cérébral des patients atteints de la SEP (**Bizzozero et al., 2005**).

Outre l'attaque des biomolécules essentielles, les radicaux libres contribuent à des dommages cellulaires associés à de nombreux processus impliqués dans la pathogenèse de la SEP. En effet, au cours de la phase initiale de la formation des lésions de la SEP, les ERO produites induisent des modifications de la cytosquelette et des jonctions serrées dans les cellules endothéliales du cerveau, facilitant ainsi la migration transendothéliale des monocytes (**van der Goes et al., 2001**) et la phagocytose de la myéline (**van der Goes et al., 1998**).

Les oligodendrocytes sont particulièrement vulnérables aux dommages oxydants vu leur teneur en AGPI qui sont susceptibles d'interagir avec les ERO, induisant ainsi une peroxydation lipidique. Ces altérations sont souvent associées à une forte concentration intracellulaire de fer, et une baisse de l'activité des enzymes antioxydantes et de piègeurs de radicaux libres, favorisant ainsi l'accumulation des ERO hautement toxiques (**Butts et al., 2008**). Les progéniteurs d'oligodendrocytes immatures (OPC) sont également sensibles au stress oxydant, en raison de leurs faibles taux d'enzymes antioxydantes et de protéines anti-apoptotiques associés à des niveaux accrus des agents pro-apoptotiques (**Butts et al., 2008**). Les radicaux pro-oxydants tels que le H₂O₂ inhibent d'une manière frappante l'expression des gènes de la myéline dans les oligodendrocytes primaires humaines via l'altération de l'équilibre RedOx cellulaire. Il est important de noter que le stress oxydant altère la différenciation des OPC par des mécanismes épigénétiques et diminue l'expression des gènes impliqués dans la différenciation des oligodendrocytes (**French et al., 2009**).

L'ensemble de ces données indique qu'il existe un fort lien entre les dommages oxydants et l'initiation ainsi que la progression de la pathogenèse de la SEP. Il est donc intéressant de noter que les stratégies thérapeutiques visant à rétablir l'équilibre RedOx peuvent offrir une protection contre les altérations des oligodendrocytes et favoriser la différenciation des OPC en cellules matures productrices de myéline. Ils peuvent ainsi participer à la remyélinisation et donc à la prévention de l'évolution de la maladie.

4. Neurodégénérescence et altération des organites cellulaires

4.1. Neurodégénérescence et altération du métabolisme mitochondrial

Le dysfonctionnement mitochondrial est également un dénominateur commun de toutes les maladies neurodégénératives, en particulier la SEP (**Wilkins et al., 2017**). On sait que les mitochondries jouent un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires, notamment la génération d'ATP, le Ca²⁺ intracellulaire, la formation d'espèces réactives oxygénées (ERO) et l'apoptose. Les neurones sont particulièrement dépendants des mitochondries en raison de leurs besoins énergétiques élevés. Il semble donc raisonnable de supposer que les neurones sont relativement intolérants au dysfonctionnement mitochondrial.

Les mitochondries sont des organites particulièrement importants dans le SNC. Outre leurs rôles dans la production des ERO principalement l'O₂^{•-} et la modification de l'état d'oxydo-réduction cellulaire, les mitochondries jouent également un rôle important dans l'homéostasie du calcium, la régulation de l'inflammation, le métabolisme des acides aminés, des lipides et

du glucose, la croissance cellulaire, la mort cellulaire (apoptose, l'autophagie), la communication cellulaire et la plasticité synaptique (**Grimm et al., 2016**). Par conséquent, les altérations mitochondriales (fonctionnelles et structurales), associées à une mutation dans le génome mitochondrial, une anomalie de la dynamique mitochondriale, un dysfonctionnement d'une ou des activités mitochondriales, qui peuvent être due à des agrégations protéiques ou à des facteurs environnementaux, accompagnées des altérations du métabolisme énergétique, entraînent ainsi des dommages cellulaires impliqués directement ou indirectement dans les différents processus de vieillissement, de désordre métabolique et de la neurodégénérescence (**Wallace, 2005; Filosto et al., 2011; Zhu and Chu, 2010**).

Plusieurs études suggèrent un fort lien entre les dysfonctionnements mitochondriaux et la pathogenèse de la MA. Il a été avéré que la protéine amyloïde β (β A) pourrait avoir un impact sur l'état et le fonctionnement mitochondriale. Elle est impliquée dans la réduction de la dynamique mitochondriale (fusion et fission), ce qui pourrait impacter les fonctions bioénergétiques de la mitochondrie (**DuBoff et al., 2013**), en inhibant l'activité de certaines enzymes clés y compris le cytochrome oxydase (COX), l' α -cétoglutarate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase ainsi que l'activité des complexes mitochondriales impliquées dans la chaîne respiratoire notamment le complexe I et IV (**Casley et al., 2002; David et al., 2005**). D'autres études ont montré que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau est également impliquée dans le dysfonctionnement mitochondrial. La présence de la protéine Tau 1 anormalement phosphorylée conduit à une altération du transport des mitochondries axonale vers les synapses, associée à une mort neuronale (**Eckert et al., 2014**). Elle est aussi impliquée dans le dysfonctionnement de l'activité du complexe I mitochondrial induisant une diminution du taux d'ATP et une augmentation de la production des ERO provoquant ainsi un environnement du stress oxydant (**Schulz et al., 2012**). L'analyse post-mortem de cerveau MA, a révélé une diminution du nombre de mitochondries intactes, de la fonction du cytochrome oxydase (COX), et une augmentation de l'autophagie mitochondriale (**Swerdlow, 2012**). En outre, des preuves de mutations, de délétions et de modifications oxydatives de l'ADNmt ont été révélés chez les patients atteints de la MA (**Chang et al., 2000**). En effet, les modifications de l'ADNmt entraînent des altérations au niveau de la signalisation cellulaire et des déficits de la voie bioénergétique (**Wilkins et al., 2014**).

Le dysfonctionnement mitochondrial est également impliqué dans la pathogenèse de la MP. Il a été initialement observé chez les toxicomanes développant un syndrome parkinsonien aigu et irréversible après avoir utilisé la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP),

drogue qui s'accumule dans les neurones dopaminergiques et qui inhibe le complexe I mitochondrial (**Nicklas et al., 1985**), associée à une mort des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire (**Beal, 1998**). Depuis cette observation plusieurs autres études ont montré une diminution de l'activité du complexe I et de l'ubiquinone dans le substrat noir des patients atteints de la MP associée à une dégénérescence neuronale (**Keeney et al., 2006**). Des déficits de l'activité du complexe I, qui peuvent être dûe aux dommages oxydants et/ou des modifications (mutations) au niveau de l'ADNm, ont été également observés au niveau post mortem, du cerveau, des plaquettes et des fibroblastes, des patients atteints de la MP (**Haas et al., 1995; Keeney et al., 2006**), ont mets l'accent sur l'implication des altérations mitochondriales dans la pathogenèse de la MP. En plus, les mutations et les polymorphismes de l'ADNmt sont associés à certaines formes héréditaires de la MP. L'ensemble de ces données indique que la fonction mitochondriale ainsi que l'héritage et le maintien de l'ADNmt sont fortement altérés dans la MP.

L'implication du dysfonctionnement mitochondrial dans la physiopathologie de la SEP a été également mise en évidence (**Carvalho, 2013; Mahad et al., 2015**). Plusieurs études se sont intéressées aux défauts de la chaîne respiratoire et leurs implications dans le déséquilibre énergétiques des axones et dans la dégénérescence axonale et neuronale (**Su et al., 2009**), d'autres ont étudié l'effet de la mutation de l'ADNmt sur la susceptibilité et la survenue de la SEP (**Andalib et al., 2013**). Par ailleurs, de multiples travaux se sont focalisés sur le rôle de l'hypoxie dans les altérations mitochondriales et les lésions axonales (**Lucchinetti et al., 2000**) au niveau des axones, des oligodendrocytes et des astrocytes des patients SEP (**Mahad et al., 2015**). Ces données suggèrent que les lésions mitochondriales se diffusent dans plusieurs types cellulaires associées à une défaillance énergétique et ultérieurement à des dommages structuraux et fonctionnelles cellulaires. En effet, la diminution de l'expression génique des sous-unités protéiques codées pour la chaîne OXPHOS (**Dutta and Trapp, 2006**), est associée à une perte de l'activité du complexes I, III et IV des neurones corticaux et à une augmentation du taux d'ADNmt altérés (**Campbell et al., 2011**). Ce défaut dans l'activité de différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, provoque non seulement un déficit énergétique, mais également un désordre dans l'homéostasie calcique ce qui rend les axones plus vulnérables aux lésions excitotoxiques (**von Kleist-Retzow et al., 2007**). L'hypoxie joue ainsi un rôle important dans les différents processus de la neurodégénérescence dans la SEP. En effet, les lésions de la SEP, caractérisées par l'activation des microglies et macrophages activés au niveau des axones démyélinisés

chroniques, sont associées à des lésions mitochondriales, une génération des ERO et des ERN, une fuite d'électrons et une libération du fer des oligodendrocytes, entraînant ainsi un déficit énergétique, ce qu'on appelle « hypoxie virtuelle ». Ce phénomène pourrait inclure un dysfonctionnement mitochondrial, un influx du Na^+ via des canaux Na^+ voltage-dépendants, une libération du Ca^{2+} toxique du réticulum axoplasmique, une sur-activation des récepteurs ionotropes et métabotropes du glutamate et une activation des canaux voltages dépendants du glutamate, conduisant à une stimulation excessive des voies de dégradation dépendantes du Ca^{2+} ce qui favorise la perte de l'intégrité axonales et même la perte des neurones (**Trapp and Stys, 2009**).

En outre, une analyse post mortem du cerveau des patients SEP, a montré que les défauts de l'activité mitochondriale jouent un rôle important au sein des lésions SEP actives. Les axones démyélinisés possèdent des mitochondries altérés, de grosses tailles avec une activité accrue des enzymes de la chaîne respiratoire (**Mahad et al., 2009**). Ces mitochondries affectées sont très actives et très mobiles au sein des axones démyélinisés (**Kiryu-Seo et al., 2010**) associées à une altération du transport, de la fission/fusion, de la répartition et de la biogenèse mitochondriale (**Mahad et al., 2015**). En effet, cette réponse mitochondriale au niveau des axones démyélinisés, à savoir (i) une présence accrue des mitochondries, (ii) une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire, et (iii) une grande vitesse de mobilité, apparaît donc comme un phénomène adaptatif ou compensatoire à la perturbation de la myéline. Cette dynamique mitochondriale stimule ultérieurement des processus cellulaires fondamentaux tels que le déséquilibre de l'homéostasie calcique, la redistribution des canaux ioniques et des pompes voltages dépendant, et la génération d'espèces radicalaires et implique également dans les processus d'apoptose et de la mitophagie (**Zambonin et al., 2011**).

Il est important de noter que le dysfonctionnement mitochondrial contribue à la neurodégénérescence dans la SEP selon trois mécanismes: (i) lors des lésions inflammatoires aigues de la SEP, les mitochondries intra-axonales endommagées, sous l'action des espèces radicalaires, entraînent des dysfonctionnements mitochondriaux associés à des lésions axonales (ii) au niveau des axones démyélinisés, le déséquilibre entre la demande accrue d'énergie et l'incapacité à satisfaire cette demande, en raison de l'accumulation des mitochondries altérées, déclenchent une cascade d'événements délétères conduisant à une dégénérescence et une perte axonale (iii) les taux élevés de mutation de l'ADNmt et l'augmentation de la production des radicaux libres induisent de manière synergique un

dysfonctionnement mitochondrial neurochimique, impliquant dans le processus neurodégénératif au niveau du cortex cérébrale de SEP. Bien que certaines données confirment l'implication des dysfonctionnements mitochondriaux à différents stades de la SEP, des études *in vivo* sur des modèles EAE suggèrent que ces altérations mitochondriales précèdent même les lésions axonales et l'afflux de leucocytes vers les lésions SEP (Qi et al., 2006).

Dans l'ensemble, ces données montrent que les lésions mitochondriales dans la SEP entraînent des événements à effet domino (un déficit énergétique, un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, une lésion oxydative et une altération de l'homéostasie calcique et des canaux Na⁺ voltage dépendant), menant à une destruction axonale et une dégénérescence neuronale (Mahad et al., 2015). Ces multiples fonctions de la mitochondrie, fait de cet organelle un acteur essentiel dans le SNC. De ce fait, le maintien d'un bon fonctionnement mitochondrial peut se considérer comme une alternative thérapeutique dans la SEP.

4.2. Neurodégénérescence et altération du métabolisme peroxysomal

Les peroxysomes sont des organites très dynamiques (Grabenbauer et al., 2000) assurant de nombreuses fonctions dans la cellule. Outre leur rôle dans la détoxification cellulaire *via* dégradation des du H₂O₂ et le maintien de l'équilibre RedOx (Nordgren and Fransen, 2014), les peroxysomes interviennent dans multiple voies métaboliques. On peut citer la biosynthèse des phospholipides (plasmalogènes), d'acide docosahexaénoïque (DHA), des acides biliaires et du cholestérol, la β -oxydation de certains acides gras à longues chaînes et les acides gras à très longues chaînes (AGLC, AGTLC (C \geq 22: 0)) (Fourcade et al., 2015), et l'alpha-oxydation de l'acide phytanique ainsi que le catabolisme du méthanol, des purines, des acides aminés, des leucotriènes et des polyamines peuvent avoir lieu au niveau des peroxysomes (Valko et al., 2007; Baarine et al., 2009; Fourcade et al., 2015).

Plusieurs études ont montré que la taille et le nombre de peroxysomes peuvent augmenter d'une manière conditionnelle, souvent en coordination avec les modifications morphologiques d'autres compartiments subcellulaires, notamment les mitochondries (Hoivik et al., 2004), les gouttelettes lipidiques (Ishizuka et al., 2004) et la membrane plasmique (Jung et al., 2013). Une telle «prolifération péroxysomale» s'accompagne souvent d'une augmentation de la synthèse des enzymes péroxysomales entraînant un désordre de multiple fonctions cellulaires (Smith and Aitchison, 2013).

L'altération d'une ou des fonctions peroxysomales impacte la structure et la fonction mitochondriale, ce qui peut entraîner des dommages cellulaires liée à la neurodégénérescence. **(Ivashchenko et al., 2011)**. En outre, une biogenèse peroxysomale anormale ou une β -oxydation défectueuse favorise l'accumulation des AGTLC au niveau du cytoplasme, contribuant ainsi à la démyélinisation **(Trompier et al., 2014)**. Bien que les AGTLC confèrent à la myéline ses propriétés d'isolation, leur présence en excès peut la déstabiliser et même avoir des effets toxiques au niveau des cellules nerveuses responsables de sa synthèse (les oligodendrocytes).

Des études récentes suggèrent que la fonction peroxysomale décline également avec l'âge et pourrait entraîner des troubles neurologiques liés à l'âge, tels que la MA.

Chez les patients MA, les dysfonctionnements peroxysomaux sont associés à une diminution de l'activité catalase, une altération de la synthèse des lipides peroxysomales et une oxydation des AGTLC, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité cellulaire et une mort cellulaire notamment par nécrose **(López-Erauskin et al., 2013)**. L'analyse post-mortem des cerveaux MA, a révélé des niveaux réduits en plasmalogène et une accumulation des AGTLC accompagné d'une augmentation de la densité peroxysomale dans les cellules neuronales **(Schönenberger and Kovacs, 2015)**. Plusieurs données neurolipidomiques, ont révélé d'une manière constante une augmentation de l'hydrolyse des plasmalogènes membranaires contenant de l'éthanolamine et une diminution des taux d'autres phospholipides structurels liés à l'éther, contribuant potentiellement à la déplétion vésiculaire **(Bennett et al., 2013)**. Conformément à ces données, une étude *in vivo* sur des modèles de rats Alzheimer dépourvu de l'activité β -oxydation a révélé une accumulation de la β -amyloïde dans le cerveau MA associée à une production accrue des ERO **(Shi et al., 2016)**. En outre, les dysfonctionnements peroxysomaux sont associés à une altération de la libération des neurotransmetteurs dans la fente présynaptique et à une perte de vésicules synaptiques (caractéristique de la MA), ainsi qu'une diminution de la synthèse des enzymes peroxysomales tels que le dihydroxacétone phosphate acyle transférase (DHAPAT) qui catalyse la première étape de la synthèse de plasmalogène **(Brodde et al., 2012)**

L'ensemble de ces données suggèrent que le dysfonctionnement peroxisomal joue un rôle important dans la pathogenèse et dans la progressive de la MA.

Les dysfonctionnements peroxysomaux ont été également associés à d'autres troubles neurodégénératifs, en particulier la MP. Plusieurs études ont montré que le dysfonctionnement peroxisomal contribue à l'accumulation de la protéine α -synucléine (α S) dans le cerveau MP.

En effet, des faibles taux de plasmalogènes ont été révélés dans les radeaux lipidiques du cortex frontal post mortem des patients atteints de la MP (**Fabelo et al., 2011**).

Par ailleurs, plusieurs données suggèrent l'implication du peroxyosome dans la pathogenèse de la SEP. Chez les patients SEP, l'altération d'une ou des fonctions peroxyosomales est associée à une réduction de la proportion des neurones présentant une immunoréactivité pour la protéine clé de la membrane peroxyosomale (PMP70), caractérisée par une diminution de l'expression du gène codant pour la PMP70 (ABCD3) et de l'expression des protéines peroxyosomales au niveau des sites lésionnels et non lésionnels de la matière grise du cerveau SEP, favorisant ainsi la progression et l'aggravation de cette maladie (**Gray et al., 2014**). La présence des neurones possédant un faible taux de PMP70 au niveau des sites non lésionnels dans le cortex du cerveau SEP montre que l'inflammation et/ou la démyélinisation elles seules ne conduisent pas à la dégénérescence et que les altérations peroxyosomales pourraient participer activement dans le processus neurodégénératif dans la SEP.

Des études *in vivo* sur le modèle expérimental (EAE) ont montré une diminution de la transcription et de l'activité des enzymes peroxyosomales clés (DHAPAT et catalase) dans le cerveau et la moelle épinière associée à une réduction du niveau de plasmalogènes (composants clés de la membrane de la myéline), une inhibition de la dégradation des AGTLC entraînant ainsi leurs accumulations (**Singh et al., 2004**), ce qui suggèrent un défaut dans la β -oxydation peroxyosomale (**Senanayake et al., 2015**). L'ensemble de ces données, renforce l'hypothèse de l'implication du dysfonctionnement peroxyosomal dans la survenue et la potentialisation de la SEP

En effet, la réduction de l'expression des gènes et des protéines peroxyosomales dans la matière grise du cerveau SEP est susceptible de contribuer aux processus pathologiques selon ces deux arguments **i)** les modèles animaux conçus pour exprimer des niveaux réduits de la fonction peroxyosomale dans le SNC montrent des signes d'inflammation, de démyélinisation et de dégénérescence axonale; **ii)** les réductions de la fonction peroxyosomale dans certaines pathologies tels que l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) et sa variante phénotypique, l'adrénomyélonéuropathie (AMN) (qui sont causées par des mutations du gène peroxyosomal ABCD1) sont associées à des dommages au niveau de la myéline et de l'axone (**Mar and Noetzel, 2010**).

4.3. Neurodégénérescence et altération lysosomale

Les lysosomes sont des organites cellulaires, sphériques de quelques centaines de nanomètres de diamètre, contenant environ 50 enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation de macromolécules telles que les protéines, les lipides, les sucres et les acides nucléiques. Les lysosomes sont dérivés de l'espace extracellulaire par endocytose ou phagocytose ou du cytoplasme par autophagie. Le pH de la lumière des lysosomes est régulé par une pompe à proton (V-ATPase) qui permet l'établissement d'un pH acide (entre 4-5), ce qui est nécessaire pour un bon fonctionnement des enzymes lysosomales (**Mindell, 2012**). Les lysosomes sont impliqués dans trois types de fonction : la dégradation, la sécrétion et la signalisation (**Settembre et al., 2013**). Ils sont aussi impliqués dans la dégradation du matériel extracellulaire (par endocytose) et du matériel intracellulaire (agents pathogènes), ou de molécules nécessaires pour leur survie (autophagie) (**Mizushima, 2007**).

Les lysosomes participent ainsi à la régulation de nombreuses voies de signalisation afin de favoriser la disponibilité cellulaire en nutriments (**Settembre et al., 2012**).

De plus, les lysosomes subissent une exocytose régulée par le Ca^{2+} dans le but de produire leur contenu dans l'espace extracellulaire et de réparer les membranes plasmiques endommagées (**Andrews et al., 2014**), ce qui pourrait moduler directement la clairance cellulaire (**Medina et al., 2011**). Etant donné le rôle joué par ces organites, une altération de leurs fonctions pourrait entraîner des dommages cellulaires liées au processus de vieillissement et au développement de maladies liées à l'âge notamment les maladies neurodégénératives ; tels que la MA, la MP et la SEP (**Cuervo and Dice, 2000; Nixon et al., 2008**).

Des données *in vitro* sur des cultures de l'hippocampe ont révélé que la perturbation de la fonction lysosomale entraîne une réduction des protéines synaptiques et des réponses excitatrices évoquées, caractéristique du cerveau MA (**Bendiske et al., 2002**), associée à une perte synaptique contribuant ainsi à la réduction de l'activité cérébrale et de la déficience cognitive. Ceci a été confirmé chez les patients MA ou un fort lien entre le dysfonctionnement lysosomal et la pathologie synaptique a été reporté (**Masliah et al., 1996**). En effet, la diminution de l'expression des gènes synaptique tels que la synaptophysine est associée à une accumulation de la protéine tau dans les neurones (**Bendiske et al., 2002**) caractéristiques de la MA.

Par ailleurs, les dysfonctionnements lysosomaux sont également impliqués dans la pathogenèse de la MP. Des études génétiques ont montré que les patients MP sont hétérozygotes pour les mutations du gène codant pour l'enzyme lysosomale β -glucocérébrosidase (GBA) (hydrolase catalysant le clivage entre l'unité céramide et le résidu glucose d'un glucocérébroside). En effet les faibles taux de GBA entraînaient une accumulation accrue de glucosylcéramide dans le lysosome, associé à une accélération de la synthèse d'oligomères de l' α -synucléine (**Sidransky et al., 2009**), et par conséquent un blocage du trafic de GBA nouvellement synthétisé, d'où l'accumulation de glucosylcéramide (**Mazzulli et al., 2011**). En outre, des mutations de l'ATPase de type 13A2 (ATP13A2), composant du mécanisme d'acidification lysosomale, observées chez les patients MP, sont liées à une accumulation de l' α -synucléine (**Ramirez et al., 2006**).

Les troubles lysosomaux ont été également observés chez les patients atteints de la SEP. Le lien entre les lysosomes et la pathogenèse de la SEP a été initialement établie, par des études histologiques, biochimiques et histochimiques combinées décrivant une sur-expression de l'enzyme β -glucosaminidase lysosomale dans la substance blanche du cerveau SEP, associée à une instabilité inhérente des lysosomes cérébraux (**Allen and McKeown, 1979**). En effet, les lysosomes interviennent dans la dégradation de la myéline et son phagocytose dans des vacuoles autophagiques (**Raine and Scheinberg, 1988**).

Plusieurs études montrent que les patients ayant une maladie de stockage lysosomal sont initialement diagnostiqués pour une «SEP soupçonné» ou une SEP cliniquement définie (**Kazibutowska et al., 2002; Weisfeld-Adams et al., 2013**). Des données plus récentes ont montré qu'une déficience lysosomale associée à un manque de LAMP2 (lysosomal associated membrane protein 2) et un défaut du GAA (lysosomale acido glucosidase) est fortement liée à la maladie de la SEP, qui par conséquent impacte le processus d'autophagie dans la SEP (**Igci et al., 2016**).

L'ensemble de ces données sont en faveur de l'implication du dysfonctionnement lysosomal dans la pathogenèse de la SEP.

5. Neurodégénérescence et dysfonctions du métabolisme lipidique

Les lipides sont des corps gras qui constituent une famille de molécules hétérogènes ayant pour point commun leur insolubilité dans l'eau (**Vance and Vance, 2008**). La classification des lipides est encore un sujet complexe qui se heurte à la difficulté de définir des critères objectifs permettant de les distinguer des autres classes de molécules organiques. La

classification la plus acceptée sépare les acides gras, des glycérolipides, des glycérophospholipides, des sphingolipides et des stérols incluant le cholestérol et ses dérivés.

Les lipides sont des constituants essentiels des cellules et des tissus en particulier du cerveau, assurant de nombreuses fonctions telles que la maintenance de la structure cellulaire, la production de l'énergie et la signalisation cellulaire. Le métabolisme lipidique (anabolisme et catabolisme) génère une variété d'intermédiaires biologiques, appelées molécules lipidiques bioactives ou molécules de signalisation ou seconds messagers qui participent également dans la régulation de multiples voies de signalisation associées à la croissance, la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose, l'inflammation, la motilité et l'homéostasie membranaire des cellules (**Mattes, 2005; Hannun and Obeid, 2008; Zechner et al., 2012**).

Plus de 60% du cerveau est constitué de lipides (**Luchtman and Song, 2013**), dont 70% est localisé dans la myéline (**Björkhem et al., 2004**). On distingue le cholestérol, les glycérophospholipides et les sphingolipides qui sont sous un flux dynamique afin de maintenir l'équilibre homéostatique dans le plasmalemme (**Eggeling et al., 2009**). Ceci est essentiel non seulement pour le maintien de la structure membranaire et le bon développement neurologique, mais également pour assurer de multiples fonctions exécutées par le cerveau, telles que le trafic membranaire, la transmission du signal, la synaptogenèse et la neurogenèse (**Piomelli et al., 2007**). Les lysophospholipides, les endocannabinoïdes et les sphingolipides sont également impliqués dans la signalisation cellulaire, y compris la régulation de nombreuses pompes, canaux et transporteurs d'ions (**Hardie and Muallem, 2009**).

Une meilleure connaissance du métabolisme des lipides, en particulier de cholestérol, des acides gras et des phospholipides au niveau du SNC est donc une nécessité pour mieux comprendre la physiopathologie des maladies neurodégénératives, en particulier la SEP, identifier de biomarqueurs ainsi que de nouvelles cibles pharmacologiques pour permettre sinon de guérir, mais tout au moins de traiter et de retarder le plus possible l'évolution de ces maladies neurodégénératives.

Malgré la présence de nombreuses preuves de l'implication des lipides dans le développement et la progression de différentes maladies neurodégénératives, en particulier la SEP, leurs rôles dans l'activité normale et pathologique au niveau SNC sont malheureusement encore peu explorés.

Maintenant, il est bien établie que les anomalies lipidiques sont associées au processus de la neurodégénérescence (**Adibhatla and Hatcher, 2008**). En outre, de nombreuses études ont

révélé des altérations du métabolisme des lipides (acides gras, cholestérol, phospholipides) chez les malades atteints de différentes maladies neurodégénératives démyélinisantes ou non démyélinisantes (**Grimm et al., 2013**). En effet, des modifications quantitatives et qualitatives de certains lipides à savoir les acides gras, le cholestérol et les stérols, ont été mises en évidence chez les patients atteints de différentes maladies neurodégénératives y compris la SEP, la MA (**Leoni et al., 2005; Zarrouk et al., 2015; Zarrouk et al., 2018**). Sur cette base, on pourrait considérer que les lipides sont des bons candidats dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives.

L'ensemble de ces observations suggère que les lipides pourraient être considérés comme des bons marqueurs de diagnostics, de pronostiques et d'efficacité thérapeutique pour les maladies neurodégénératives. Nous détaillons ainsi, dans ce qui suit l'implication des acides gras, de cholestérol et des oxystérols dans le processus de la neurodégénérescence et la pathogenèse de certaines maladies neurodégénératives, en particulier la SEP.

5.1. Anomalies des acides gras

5.1.1. Définition et classification des acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaînes aliphatiques. Ils possèdent une chaîne carbonée (de 4 à 36 atomes de carbones) composée d'une tête hydrophile à l'extrémité de la chaîne portant une fonction carboxyle et d'une longue chaîne hydrophobe de groupement CH_2 se terminant par un groupement méthyle.

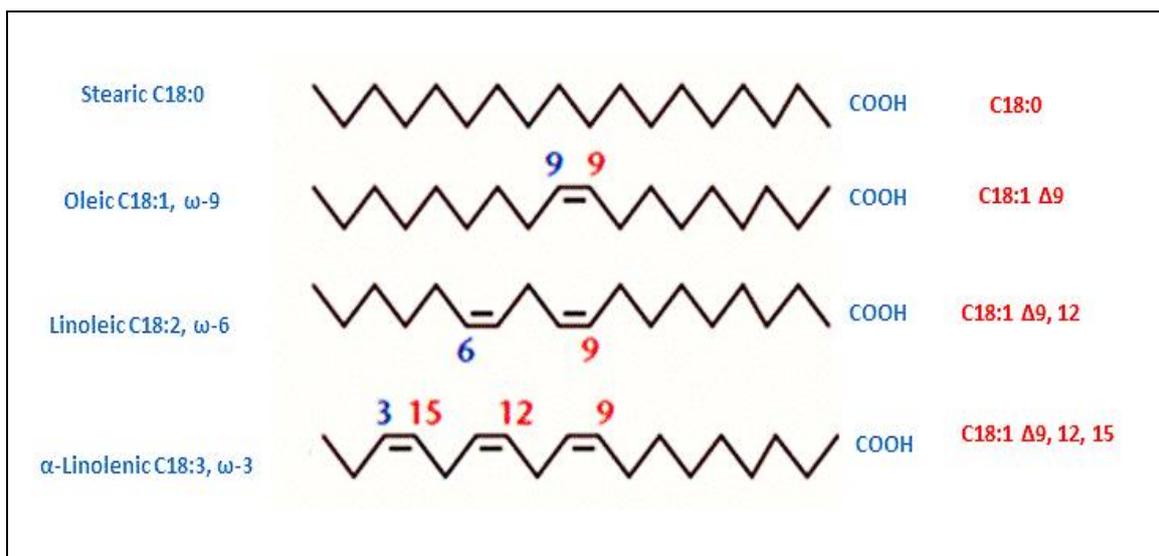


Figure 8 : Nomenclature de certains acides gras non ramifiés avec une extrémité méthyle et une extrémité carboxyle.

Il existe plusieurs nomenclatures pour désigner les acides gras à partir de la position de leur première double liaison par rapport au groupement carboxyle (indiqué par le symbole delta(Δ)), leur nombre d'atomes de carbone et leur nombre double liaison ainsi que la position de la première double liaison (désigné par le symbole ω (à partir de l'extrémité méthyle)) et la nature de la fonction acide (Nomenclature, 1977) (Figure 8-9).

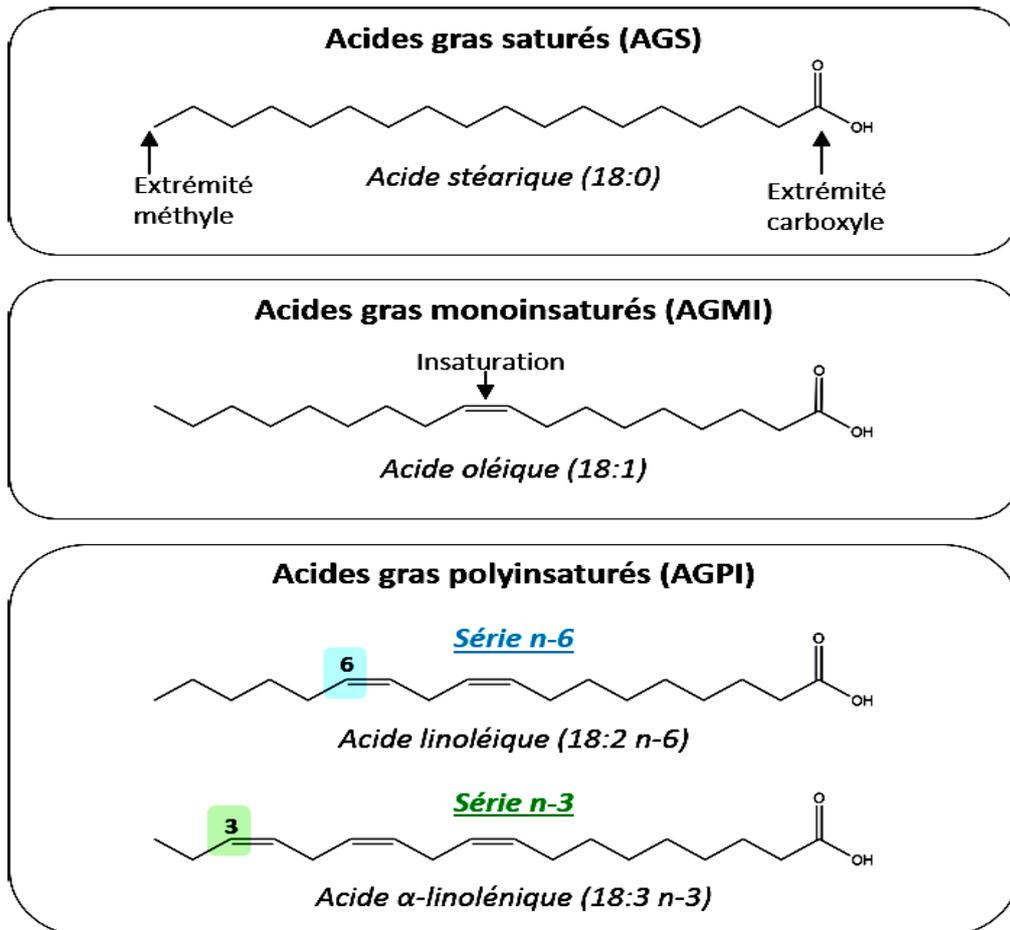


Figure 9: Structure et nomenclature des différentes familles des acides gras.

Exemple de l'acide gras saturé : acide stéarique (C18 :0), exemple de l'acide gras mono-insaturé : acide oléique (C18 :1), exemple de l'acide gras polyinsaturé : acide linoléique (C18 :2 n-6) et acide α -linoléique (C18 :3 n-3).

Les AG sont des constituants majeurs de la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Ils s'interviennent à la formation des esters de cholestérol (Johnson and Schaefer, 2006). Ils sont également des substrats énergétiques importants, stockés sous forme de triglycérides, représentant environ 30 % de l'apport énergétique totale chez l'homme.

Certains acides gras sont dits « essentiels » et doivent être apportés par l'alimentation tels que l'acide linoléique et l'acide α -linoléique. D'autres sont néfastes s'ils sont consommés en grande quantité.

Les acides gras peuvent être classés en deux grands groupes selon leurs structures, les acides gras saturés et les acides gras insaturés dont ce dernier peut être subdivisé en deux sous-groupes; les acides gras monoinsaturés et les acides gras polyinsaturés (**Tvrzicka et al., 2011**).

- **Les acides gras saturés (ACS)**

Les acides gras saturés sont constitués par une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue et ne possèdent aucune double liaison. Ces AGS ont été reportés associés à de nombreuses pathologies tels que le diabète, l'obésité et les maladies coronariennes (**Tremblay et al., 2014**).

- **Les acides gras insaturés (AGI)**

Ce sont des chaînes hydrocarbonées possèdent une ou plusieurs doubles liaisons, ce qui leurs confèrent des propriétés physico-chimiques particulières. Ils ont des propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires (**De Lau et al., 2005**). Ces acides gras sont ainsi subdivisés en 2 sous-groupes, les acides gras mono-insaturés (AGMI) et les acides gras poly- insaturés (AGPI).

Les acides gras mono-insaturés

Les acides gras mono-insaturés (AGMI) possèdent une seule double liaison qui peut s'effectuer à diverses positions de la chaîne carbonée. Ils sont impliqués dans la réduction de risque des troubles métaboliques tels que le diabète et les maladies cardiovasculaires (**Guasch-Ferré et al., 2015**). Les AGMI peuvent être subdivisés en deux sous-groupes les acides gras mono-insaturé cis et les acides gras mono-insaturés trans,

- ✓ **Les acides gras mono-insaturés Cis**

Les acides gras possèdent la configuration cis lorsque les deux atomes d'hydrogène se trouvent du même côté au plan de la double liaison. Parmi les principaux AGMI *cis* figurent l'acide oléique (C18 :1n-9), l'acide vaccénique (C18 :1n-7) et l'acide palmitoléique (C16 : 1n-7).

✓ **Les acides gras mono-insaturés Trans**

La configuration trans se produit lorsque les deux atomes d'hydrogène se présentent de la part de d'autre du plan de la molécule leurs confèrent une structure plane semblable à celle des acides gras saturés. Parmi les principaux acides gras trans, on peut citer l'acide élaidique (C18 :1n-9) et l'acide vaccénique (C18 :1n-7)

Les acides gras poly-insaturés

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) possèdent deux ou plusieurs doubles liaisons dans leurs chaînes carbonées. On distingue trois familles des AGPI selon la position de la première double liaison à partir du groupement méthyl (indiqué par ω): les AGPI oméga-3 (n-3), les AGPI oméga -6 (n-6) et les AGPI oméga -9 (n-9).

5.1.2. Métabolisme et fonction biologique des acides gras polyinsaturés

Chez les mammifères, la totalité des AGPI à longues chaînes dérivent de l'acide linoléique (LA, C18:2 n-6) et l'acide alpha linoléique (ALA, C18:3 n-3), ces deux précurseurs, «acides gras essentiels », ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères (ne possèdent pas les enzymes nécessaires à leurs synthèse ($\Delta 12$ et $\Delta 15$ dénaturase)), et doivent donc être apportés par l'alimentation (**Legrand, 2007; Michalak et al., 2016**).

L'ALA et le LA peuvent ensuite être métabolisés dans l'organisme en dérivés d'AGPI à longues chaînes (AGPI-LC) ($C \geq 20$), suite à une succession de désaturations et d'élongation, qualifiés d'« acides gras conditionnellement indispensables » puisque ils sont synthétisables mais strictement obligatoires. Parmi les métabolites les plus importants figurent l'acide arachidonique (AA ; C20:4 n-6), produits à partir de LA, l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5 n-3), l'acide docosapentaénoïque (DPA ; C22:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6 n-3) qui sont métabolisés à partir de l'ALA (**Guillou et al., 2010**) (**figure 10**).

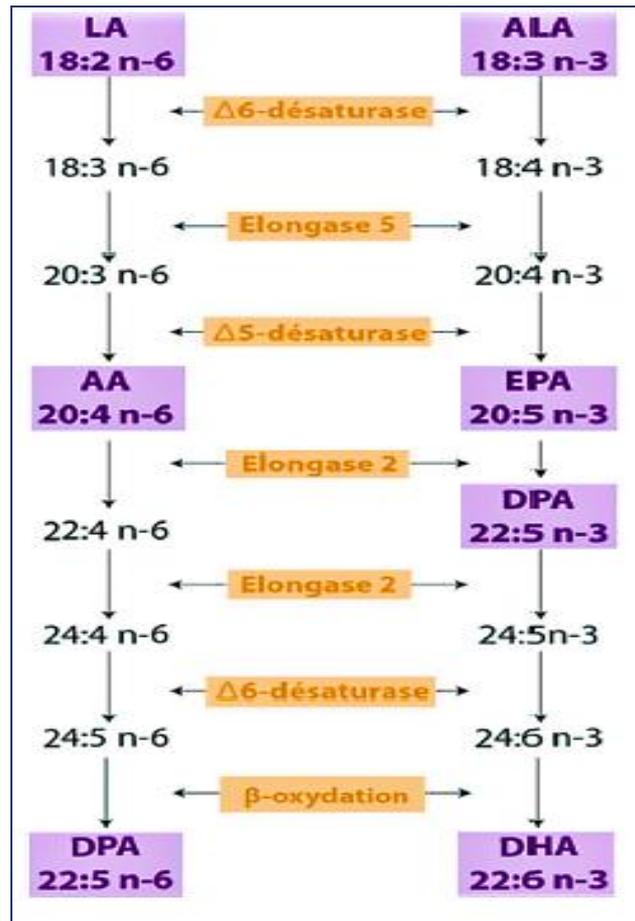


Figure 10 : Biosynthèse des AGPI à longue chaîne (Innis, 2008)

Les AGPI sont principalement intégrés dans les phospholipides membranaires. Une fois libérées par la phospholipase A2 (PLA2), elles sont transformées en plusieurs molécules de signalisation biologiquement actives (Capra et al., 2015).

On distingue ci-dessous trois majeurs voies du métabolisme des AGPI :

***La voie des cyclooxygénases (COX)** qui fait intervenir deux types d'enzymes : la cyclooxygénase 1 (COX1) et la cyclooxygénase 2 (COX2). Ces dernières agissent sur les AGPI n-3 et n-6, conduisant à la synthèse des prostaglandines (PG), des prostacyclines et des thromboxanes (TX) qui sont des molécules pro-inflammatoires.

***La voie des lipooxygénases (LOX)**, convertissent l'AA en lipoxines (LX) et en leucotriènes (LT).

Les voies de COX et de LOX produisent également des protectines, des maresines et des résolvines (Rv) à partir d'AGPI n-3.

***La voie des cytochromes P450 (Cyp 450)** catalysent la conversion des AGPI n-3 et n-6 en acides époxyéicosatriénoïques (EET) et l'acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) qui sont biologiquement actifs.

Les AGPI peuvent également être produits par oxydation non enzymatique, créant ainsi des isoprostanes et des isofuranes (**Roy et al., 2016**). Globalement, il existe une grande variété de métabolites d'AGPI, qui possèdent des propriétés pro-et anti-apoptotiques, qui jouent un rôle important dans l'inflammation et la modulation des réponses immunitaires et qui affectent probablement de nombreux processus qui restent encore inconnu (**Masoodi et al., 2015**).

Les AGPI assurent de nombreuses fonctions dans la cellule. Ils ont un rôle structural en raison de leur incorporation dans les membranes phospholipidiques, induisant ainsi des modifications des propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire, permettant la modulation de l'activité des enzymes, des transporteurs canaux ioniques et des récepteurs membranaires impliqués dans la signalisation inter- et intracellulaire. Les AGPI sont aussi des précurseurs de médiateurs bioactifs ayant des propriétés anti-inflammatoires (**Calder, 2011**) et neuroprotectrices (**Layé, 2010; Bazan et al., 2011**). Ils sont également impliqués dans un bon fonctionnement du système nerveux en modulant les processus de stockage et de libération présynaptique des neurotransmetteurs, contribuant ainsi à une bonne efficacité de l'influx nerveux (**Kodas et al., 2004; Fedorova and Salem Jr, 2006**).

Dans le cerveau, les AGPI sont présents majoritairement, sous forme estérifiée, dans les phospholipides (PL) qui représentent 50% des lipides totaux cérébraux. Ils sont incorporés dans les phosphatidyl cholines (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS), les phosphatidyl inositols (PI) ou encore les phosphatidylglycérols (PG). Prenant l'exemple d'acide arachidonique (AA) qui est majoritairement présent dans les PC et les PI tandis que l'acide docosahéaénoïque (DHA) est porté par les PE et les PS (**Bascoul-Colombo et al., 2016**).

Par ailleurs, sur la base de multiples travaux, il est bien établi que les AGPI sont importants dans le maintien des fonctions cognitives chez l'adulte associées à une meilleure capacité de mémorisation (**Eskelinen et al., 2008**) et sont capables de lutter contre les processus de vieillissement cérébral (**Janssen and Kiliaan, 2014**).

5.1.3. Rôle des acides gras dans le processus neurodégénératif

De nombreuses études justifient l'implication des lipides en particulier les AG dans le processus de neurodégénérescence ainsi que dans la pathogenèse de différentes maladies

neurodégénératives. Les AG, en particulier les AGPI jouent un rôle primordial dans le cerveau. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que la survie cellulaire, la transmission nerveuse, la neuroinflammation et le développement neuronal. Par conséquent, une altération de synthèse et/ou du métabolisme de ces acides gras pourrait contribuer à des dommages cellulaires impliqués dans les processus de neurodégénérescence et associés au développement des maladies neuropsychiatriques et neurodégénératives. Dans certaines troubles neuropsychiatriques, tels que la dépression et la schizophrénie, des anomalies quantitatives et qualitatives d'AG ont été rapportées (**Hamazaki et al., 2012**).

Plusieurs études ont montré des altérations qualitatives et quantitatives au niveau des AG chez les patients atteints de la MA. Une analyse post-mortem a révélé une diminution du taux des AGPI n-3, notamment le taux de DHA et de l'acide oléique, dans l'hippocampe et le lobe frontale des patients atteints de MA (**Yehuda, 2002**). Ces données ont été appuyées par des études *in vivo* sur des modèles de souris Alzheimer soumis à un régime déficient en DHA. Ceci a révélé une perte massive de marqueurs post-synaptiques associée à une activation des caspases. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la déficience en AGPI n-3 augmente la susceptibilité à la MA (**Calon and Cole, 2007**). Toutefois, un régime enrichi en DHA est capable de diminuer l'inflammation en inhibant l'activation des microglies (marqueur de l'inflammation) associé à une diminution de l'accumulation de l'A β intraneuronale et de la protéine Tau dans l'hippocampe (**Lim et al., 2005; Green et al., 2007**).

Une nette diminution du taux de DHA et d'AA a été aussi observée au niveau du cortex frontale des patients atteints de MP (**Fabelo et al., 2011**).

Les altérations des AG ont été également rapportées dans la SEP. Une augmentation des taux des AGS et des AGMI a été révélée dans le LCR des patients SEP (**Neu, 1983**).

D'autres travaux, ont montré une diminution des taux des AGPI n-6, en particulier le LA (C18:2 n-6), l'AA (C20:4 n-6), et l'acide dihomog-linolénique DGLA (C20:3 n-6) dans le plasma, les plaquettes, les érythrocytes, les leucocytes et le LCR, associée à une perturbation des taux des AGI dans la substance blanche des patients atteints de SEP, ce qui suggère un désordre dans l'activité des désaturases en $\Delta 6$ et $\Delta 5$ (**Holman et al., 1989**). Néanmoins, la diminution de LA n'a pas été montrée spécifique pour les patients SEP (**Love et al., 1974; Harbige and Sharief, 2007**). Les anomalies métaboliques des AGPI n-6 membranaires à longue chaîne voire le DGLA et l'AA, affectent l'intégrité physiologique des cellules immunitaires associée à une diminution de la production des cytokines régulatrices anti-inflammatoires (TGF- β) et une surproduction des cytokines pro-inflammatoires, tels que le

TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , qui pourraient favoriser la destruction des oligodendrocytes et la démyélinisation ainsi que la progression de la maladie de SEP (**Harbige and Sharief, 2007**).

Une augmentation des AA a été également soupçonnée chez les patients SEP-RR, en raison de l'augmentation des taux cérébraux de prostaglandines pro-inflammatoires bioactives (PG), incluant la PGI₂, PGF₂ α , PGD₂ et PGE₂, issus du métabolisme d'AA via l'activité de la cyclooxygénase (COX)-1 et -2 (**Greco et al., 1999; Carlson et al., 2006**).

L'ensemble de ces données conforte l'hypothèse d'une implication des altérations du métabolisme des AG dans la pathogenèse de la SEP. En effet, l'identification d'éventuelles altérations des AG chez les patients atteints de maladie neurodégénératives en particulier la SEP a pour but de mettre en évidence des biomarqueurs lipidiques pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie dans le but d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques.

5.2. Anomalie du cholestérol

5.2.1. Généralité sur le cholestérol : Définition, fonction et métabolisme

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols amphipatiques, qui est un composant essentiel des membranes cellulaires. Il est formé de quatre cycles (A, B, C, D), constituant le squelette cholestane, d'une chaîne aliphatique branchée, d'une insaturation entre C5 et C3 et d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3. Sa structure plane et rigide lui permet de jouer un rôle structural et la fonctionnel au niveau des membranaires cellulaires. Il est impliqué dans la régulation de la fluidité et de la perméabilité membranaire, ainsi que dans l'organisation, la dynamique et le fonctionnement des membranes cellulaires (**Maxfield and Tabas, 2005; Segatto et al., 2014**). Grâce à sa structure très hydrophobe, le cholestérol peut réagir avec les AG pour former les esters de cholestérol. Le cholestérol est également un précurseur des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes et de la vitamine D, qui à leurs tours participent dans de nombreuses fonctions biologiques (**van der Kant et al., 2013**). En outre, le cholestérol participe à la modulation de la fonction des protéines membranaires ainsi que de nombreux processus de signalisation transmembranaire (**Egawa et al., 2016**).

Dans le cerveau, le cholestérol est nécessaire pour différents processus cellulaires notamment la prolifération des cellules gliales, la croissance des neurites, la stabilité des microtubules, la synaptogenèse et la myélinisation (**Goritz et al., 2005**). Plusieurs études suggèrent que la disponibilité du cholestérol dans les oligodendrocytes joue un rôle limitant dans la maturation du cerveau, la myélinisation et la neurotransmission (**Liu et al., 2010**). Bien que le cerveau ne représente que 2,1% du poids corporel, il contient 23% du cholestérol total de l'organisme.

Ainsi le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol et présente une concentration 10 fois supérieure à celle des autres tissus (**Vance, 2012**), la BHE est imperméable aux lipoprotéines plasmatiques (transporteur du cholestérol) et donc au cholestérol sanguin. Le cerveau doit donc synthétiser leurs propres cholestérol grâce à une synthèse *de novo* qui est essentiellement assurée par les astrocytes (**Zhang and Liu, 2015**). En effet, cette synthèse *de novo* n'est pas homogène entre les différents types cellulaires : par exemple, les oligodendrocytes ont une capacité plus élevée de biosynthèse du cholestérol que les astrocytes, qui ont une capacité de deux à trois fois supérieure à celle des neurones (**van der Kant et al., 2013**).

La plupart (au moins 99%) du cholestérol cérébral est présent sous forme non estérifiée, distribuée dans deux principaux groupes: (i) 70% sont présents dans les gaines de myéline (substance blanche) et (ii) 30% sont présents dans les membranes plasmalemmes et subcellulaires des astrocytes et des neurones (substance grise). Chez l'homme, le cholestérol est synthétisé activement dans le SNC pendant les premières semaines suivant la naissance. A ce stade natale, toute interruption dans sa synthèse peut entraîner des troubles neurodégénératifs (**Cunningham et al., 2015**). Toutefois, cette synthèse diminue avec l'âge avec une perte minimal (demi-vie allant jusqu'à 5 ans) (**Martins et al., 2009**).

Dans le SNC, le transport du cholestérol est assuré par des lipoprotéines spéciales, telles que les apolipoprotéines E (Apo-E), sécrétées par des astrocytes (**Kiray et al., 2016**). Le complexe cholestérol-Apo-E fusionne avec des lysosomes permettant ainsi la libération du cholestérol dans la cellule qui va être soit i) stocké sous forme de gouttelettes lipidiques, après une estérification par une Acyl-CoA cholestérol acyl transférase (ACAT), impliquant ainsi dans la formation et le remodelage des membranes synaptiques et dendritiques, ii) dirigé, sous sa forme libre, vers les membranes cellulaires, assurant ainsi un rétrocontrôle négatif en régulant l'homéostasie du cholestérol au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (**Arenas et al., 2017**).

Par ailleurs, la dégradation et l'excrétion du cholestérol cérébral est principalement assurée par des enzymes de la famille des cytochromes P450 oxydases, notamment le cholestérol 24-hydroxylase (CYP46A1) et le 27S-hydroxylase (CYP27A1). En effet, la voie de CYP46A1 constitue la voie majoritaire d'élimination du cholestérol au niveau cérébrale. Cette enzyme converti l'excès du cholestérol en 24S-hydroxycholestérol (24-OHC) (**Xue-Shan et al., 2016**) pour maintenir l'homéostasie du cholestérol. Le CYP27A1 hydrolyse le cholestérol en 27S-hydroxycholesterol, (27OHC) (**Repa et al., 2000**).

5.2.2. Rôle du cholestérol dans le processus neurodégénératif

Il est maintenant bien établi que les altérations de l'homéostasie du cholestérol cérébral sont à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives démyélinisantes et non démyélinisantes. Bien que, plusieurs études ont montré une association entre l'augmentation des taux de cholestérol totaux et la neurodégénérescence, d'autres ont révélé une association plutôt avec les faibles taux de cholestérol.

Plusieurs travaux ont suggéré que la perturbation du métabolisme du cholestérol est un facteur de risque pour la MA. En effet, les taux élevés en cholestérol membranaire conduisent à une accumulation des A β associée à une augmentation des taux de calcium cytosolique ce qui pourrait contribuer à la mort des cellules neuronales (**Kodis et al., 2018**). D'autres études in vivo ont montré qu'un régime alimentaire riche en cholestérol provoque une accumulation des peptides A β (**Vázquez et al., 1998**). Des études cliniques ont révélé une augmentation des taux sériques de cholestérol chez les patients atteints de la MA (**Wood et al., 2014**). Il est important de noter que l'agrégation du cholestérol dans le système endosomal-lysosomal conduit à la transformation de l'APP (précurseur de protéine amyloïde) en A β dans le cerveau des patients MA. D'autre part, l'augmentation de la concentration du LDL et la diminution de la concentration du HDL sont associées à la formation et à l'accumulation des A β et le développement de la MA (**Chung et al., 2018**). Par ailleurs, des études génomiques ont montré qu'un individu portant l'allèle $\epsilon 4$, qui est un isoforme de l'Apo-E (principal transporteur du cholestérol), présente un risque élevé pour développer une MA. Cette lipoprotéine se lie à des nombreux récepteurs membranaires participant ainsi à la formation des A β associée à de nombreux processus impliqués dans la neurodégénérescence et le dysfonctionnement synaptique dans la MA (**Oveisgharan et al., 2018**). En plus, elle altère le métabolisme du cholestérol et conduit à la formation des produits d'oxydation du cholestérol, appelés oxystérols (**Gamba et al., 2012**).

L'altération du métabolisme du cholestérol a été également observée dans la MP. Des taux élevés en cholestérol et en leurs dérivés oxydés (oxystérols) ont été identifiés chez les patients atteints de MP, associés à une agrégation de l' α -synucléine, une inflammation et un stress oxydant ce qui pourrait entraîner une mort des neurones dopaminergiques. Ces données justifient que les taux anormaux en cholestérol et/ou en d'oxystérols pourraient contribuer au développement et à la progression de la MP (**Hu, 2010; Doria et al., 2016**).

De plus, plusieurs études suggèrent que l'altération de l'homéostasie du cholestérol pourrait également jouer un rôle important dans la pathogenèse de la SEP. Poynder and Russell ont

identifié, pour la première fois en 1926, des taux accrus en cholestérol dans le LCR des patients atteints de SEP. Ces données sont à la bases de l'hypothèse d'un «gaspillage des structures nerveuses» et d'une association entre la perturbation du métabolisme de cholestérol et la pathogenèse de la SEP (**Poynder and Russell, 1926**). Des analyses post mortem ont rapporté que l'estérification du cholestérol libre est une caractéristique de démyélinisation au niveau de la substance blanche et la moelle épinière d'un cerveau SEP (**Yu et al., 1982**). D'autres études ont montré une association positive entre le taux cérébral en cholestérol estérifié et l'aggravation des signes cliniques ainsi que l'apparition de l'handicap chez les patients SEP (**Pedersen, 1974**). Plus récemment, la découverte de nouvelles formes de cholestérol et de marqueurs de cholestérol a ouvert de nouvelles pistes de recherche. En effet, plusieurs travaux associent l'augmentation des taux cérébraux en précurseurs du cholestérol (lanostérol), en oxystérols (24-OHC et 27-OHC) et en apolipoprotéine (Apo) E à l'évolution de la SEP (**Van de Kraats et al., 2014; Vuletic et al., 2014**). Il existe également un fort lien entre le taux de cholestérol circulant lié aux lipoprotéines et la survenue de la SEP ainsi que les facteurs de risque associés à la progression de cette pathologie tels que la carence en vitamine D et les réponses humorales au virus (EBV) (**Palavra et al., 2013**).

Ces observations ont été confirmées par d'autres études cliniques qui ont montré qu'une dose élevée en « imvastatine », médicament qui abaisse le taux de cholestérol, atténue l'atrophie du cerveau et la progression de la maladie chez 140 patients atteints de SEPP sur un intervalle de 2 ans (**Chataway et al., 2014**).

L'ensemble de ces données suggèrent que le cholestérol ainsi que son transporteur, ses précurseurs et ses dérivés oxydés (oxystérols) pourraient être utilisés, cliniquement, comme des biomarqueurs de surveillance de la progression de la SEP et pourraient ainsi constituer une nouvelle piste intéressante dans l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques (**Zhornitsky et al., 2016**).

5.3. Implication des oxystérols dans la neurodégénérescence

Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol, qui peuvent être accumulés au niveau des membranes plasmiques et/ou à l'intérieur des cellules (**Mutemberezi et al., 2016**). Bien que les oxystérols soient présents sous forme de trace, ils sont impliqués dans divers processus biologiques. Cependant ; à des fortes concentrations, les oxystérols deviennent toxiques peuvent ainsi être impliqués dans la pathogenèse de nombreuses maladies telles que les maladies neurodégénératives (**Vejuj and Lizard, 2009**).

Les oxystérols peuvent provenir de l'alimentation ou former par voie endogène; soit par voie enzymatique grâce à diverses enzymes dont majoritairement appartiennent à la famille des cytochromes P450 soit par auto-oxydation non enzymatique impliquant des agents chimiques et/ou physiques (Iuliano, 2011; Olkkonen et al., 2012). Ils sont composés d'un noyau stérol et de 27 atomes de carbones. Tous les oxystérols possèdent une structure chimique similaire; un cyclopentaphénanthrène tétracyclique avec une chaîne latérale en C17 et un groupe hydroxyle en C3. La différence entre eux se réside dans l'addition d'un groupement hydroxyle, cétone ou époxyde à différentes positions, particulièrement sur le cycle carboné B du cholestérol au niveau de carbone 4, 5, 6 et 7, ou sur la chaîne latérale aux positions 22, 24, 25 et 27(Olkkonen et al., 2012).

Ainsi; nous avons centré notre étude sur les effets cytotoxiques d'un oxystérol formé par oxydation au niveau de la position C7 du cholestérol c'est le « 7 β -hydroxycholesterol » (7 β -OHC) qui sera détaillé dans la suite de ce chapitre.

5.3.1. Origine des oxysrérols

5.3.1.1. Source endogène

Généralement, il existe deux catégories principales d'oxystérols, ceux qui ont subi une oxydation au niveau cycle B du cholestérol (principalement en position C7), tels que le 7-cétocholestrol (7-KC) et le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC); et ceux qui ont subi une oxydation au niveau de la chaîne latérale, tels que le 25-hydroxycholestérol (25-HC) et le 27-hydroxycholestérol (27-HC). La plupart des oxystérols oxydés au niveau du cycle B du cholestérol sont formés par la voie non enzymatique alors que ceux qui sont oxydés sur les chaînes latérales sont les produits de la réaction enzymatique. Cependant, il ya une exception à cette règle puisque on trouve des oxystérols qui peuvent être formés à la fois par des réactions enzymatiques et non enzymatiques, c'est le cas du 7 α -OHC 25-OHC, 7-KC et du 7 β -OHC.

➤ **Sources enzymatiques** : La synthèse enzymatique des oxystérols fait intervenir différentes enzymes. Ces dernières sont classées en trois groupes: **les oxydoréductases** (les cytochromes P450, les cholestérol hydroxylases, les hydroxystéroïdes déshydrogénases et la squalèneépoxydase, **les hydrolases** (cholestérol époxyde hydrolase, cholestérol estérase) et **les transférases** (hydroxystéroïde, sulfotransférase, acyl-CoA cholestérol transférase, lécithine-cholestérol acyltransférase) (Mutemberezi et al., 2016).

Parmi les enzymes oxydoréductases, figure le **corticostéroïde 11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD)**, qui appartient à la famille des hydroxystéroïdes déshydrogénases, dont le rôle principal est d'amplifier l'action de glucocorticoïde intracellulaire en convertissant la cortisone inerte en cortisol actif. Cette enzyme est présente sous deux isoformes le 11 β -HSD1 et le 11 β -HSD2. En effet le 11 β -HSD1, exprimé dans différents régions du cerveau, est responsable de l'inter-conversion réversible du 7-cétocholestérol (7-KC) en 7 β -OHC et vice versa (**Holmes and Seckl, 2006; Mitić et al., 2013**). Ces derniers sont trouvés associés à de nombreuses maladies neurodégénératives tels que la MA, la MP et la SEP (**Zarrouk et al., 2014**).

Le **CYP7A1** appelé aussi **7 α -hydroxylase** appartient à la famille des cytochromes P450. Cette enzyme catalyse la formation du 7 α -hydroxycholestérol (7 α -OHC) ainsi que la formation du 7KC à partir du 7-déshydrocholestérol (précurseur du cholestérol) et de la vitamine D3. Elle est également responsable de la synthèse des acides biliaires. L'oxydation de la chaîne latérale du cholestérol (la région hydrophobe des lipoprotéines) est principalement produite par voie enzymatique fait intervenir différentes enzymes. Parmi ces les quelles figure **la 27-hydroxylase** appelée aussi **CYP27A1** qui est une enzyme mitochondriale exprimée essentiellement dans le foie et les macrophages (**Pikuleva, 2006**). Cette enzyme catalyse la formation du 27-hydroxycholestérol et joue également le rôle d'un intermédiaire dans l'anabolisme des acides biliaires. La **24S-hydroxylase ou CYP46A1**, localisée dans le réticulum endoplasmique et hautement exprimée dans les cellules neurales du cerveau (**Björkhem et al., 1998**), permet l'hydroxylation en position 24S du cholestérol et la formation du 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC). **La 25-hydroxylase** n'est pas une enzyme à P450. Elle appartient à la famille des désaturases et des hydroxylases à motif tripartite au niveau du site actif. Cette enzyme catalyse la synthèse du 25 hydroxycholestérol (25-OHC) par addition d'un groupement hydroxyl en position 25 du cholestérol (**Lund et al., 1998**).

➤ **Sources non enzymatiques** : L'oxydation non enzymatique du cholestérol, appelée également auto-oxydation, peut être déclenchée par des traces de métaux (par exemple, Cu²⁺), de l'ultraviolet light, et /ou des ERO qui comprennent les peroxydes, les superoxydes, les radicaux hydroxyles ainsi que des espèces non radicalaires tels que l'oxygène singulet (1 O₂) et l'azone (O₃), menant à former de nombreux intermédiaires et produits finaux stables ou instables.

Cette auto-oxydation peut se produire dans les membranes cellulaires ou dans les lipoprotéines (LDL) qui transportent le cholestérol (Iuliano, 2011). Elle s'effectue préférentiellement au niveau du cycle B du cholestérol souvent localisée sur le carbone 7 (Figure 11) puisque la liaison carbone (C)-hydrogène (H) est relativement faible au niveau de cette position. Cette oxydation forme principalement le 7-hydroxypéroxycholestérol (7-OOHC) qui va former à son tour le 7 α -OHC, le 7 β -OHC et le 7-KC (Girotti et al., 2002).

En effet, différents oxystérols peuvent se former selon le type des espèces radicalaires ou non radicalaires qui affecte le cholestérol et la position sur laquelle ces espèces vont interagir. Les radicaux peroxydes formés en contact avec l'oxygène de l'air, s'interviennent dans l'oxydation du cholestérol au niveau cycle B du cholestérol formant principalement le 7 α -OHC et 7 β -OHC et le 7-KC (Murphy and Johnson, 2008).

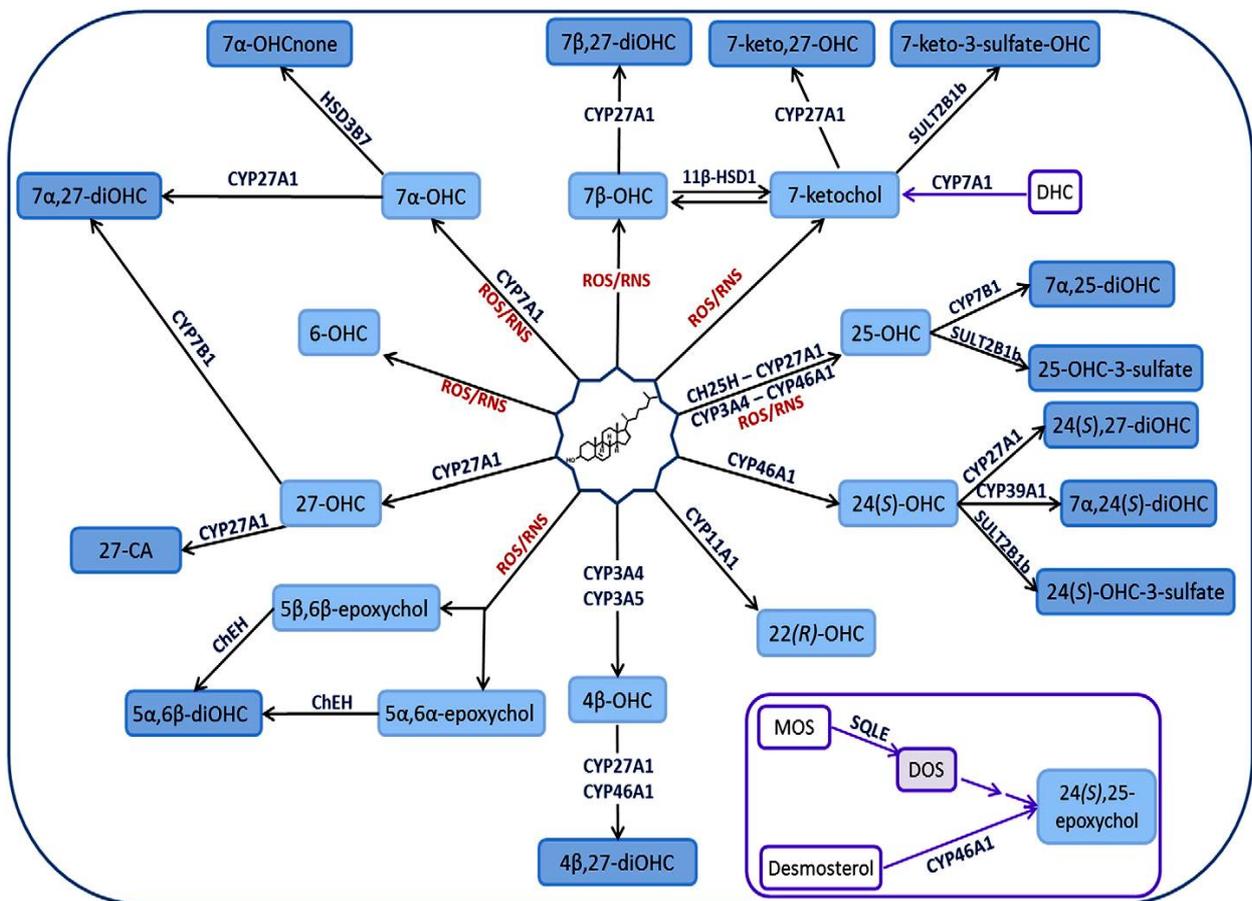


Figure 11: Schéma représentant la synthèse des différents oxystérols par voie enzymatiques et non enzymatiques

L'oxydation du cholestérol se fait généralement selon deux étapes: une étape d'initiation et une étape de propagation. L'**initiation** est la première étape de la réaction de peroxydation lipidique qui se produit au niveau d'un carbone contenant un hydrogène labile, générant ainsi

la formation des espèces réactives qui vont ensuite recruter d'autres lipides non oxydés pour démarrer une réaction en chaîne appelée « **phase de propagation** ». En effet, la génération des radicaux hydroxyles (HO \cdot) peut mener, par différents mécanismes (réaction de Fenton, action du peroxyde d'hydrogène ou radiation ionisante), à la formation d'un radical lipidique en C7 (départ du proton aliphatique) qui va par la suite interagir avec une molécule de dioxygène à l'état triplet (3O_2) pour produire un radical hydroperoxyde qui est hautement réactif. Ce dernier est capable de propager la réaction en captant un hydrogène d'une autre molécule pour donner naissance aux 7α -OHC et 7β -OHC. Par ailleurs, ces hydroperoxydes peuvent être réduits en radicaux alkyloxydes qui vont former à leurs tours différents le 7α - et le 7β -OHC (en arrachant un H \cdot) ou le 7-KC (réaction avec un radical hydroperoxyde lipidique) (**Iuliano, 2011**).

L'oxydation du cholestérol peut s'effectuer sur d'autres carbones, comme le carbone 5 et 6 pour former le 5,6-époxycholestérols. Elle peut également se produire au niveau de la chaîne latérale à différentes positions, au niveau du carbone 24, 25 ou 27 pour former le 24 (S)-hydroxycholestérol (24 (s)), le 25-OHC et le 27-OHC respectivement (**Figure 11**).

Comme cité précédemment, les oxystérols peuvent aussi être formés par des espèces non radicalaires, parmi lesquels figurent l'oxygène singulet (1O_2), qui induit la formation de 6-hydroperoxydes et de 7-Hydroperoxydes, et l'ozone (O_3) qui est impliqué dans la formation de 5,6 β -EC et de 5,6-secostérol (**Pulfer and Murphy, 2004**).

Il est important de souligner qu'il existe des oxystérols formés à la fois par voie enzymatique et voie non enzymatique (auto-oxydation) c'est le cas du 25-OHC, 7α -OHC, 7KC et 1 7β -OHC (**Figure 11**).

5.3.1.2. Sources exogènes liées à l'alimentation

Les oxystérols peuvent aussi provenir de l'alimentation, notamment les aliments riches en cholestérol tels que le beurre, le lait, les œufs et la charcuterie. Ces derniers sont susceptibles d'être oxydés en raison de la haute température et/ou de la présence d'oxygène lors de leur cuisson, ou leurs conservations (**Schroepfer, 2000; Brzeska et al., 2016**). Parmi ces oxystérols issus de l'alimentation, on distingue le 7-KC, le 7α -OHC et le 7β -OHC (**Vejux and Lizard, 2009**). Ces oxystérols sont principalement absorbés dans l'intestin, qui sont rapidement transportés dans le plasma pour être distribués vers les tissus grâce aux LDL (**Vejux et al., 2008**).

5.3.2. Rôle des oxystérols

Les oxystérols sont des lipides bioactifs, qui participent principalement à la constitution des membranes (oxystérols estérifiés). Etant donné que les oxystérols sont plus hydrophiles que le cholestérol, ils peuvent donc circuler plus rapidement et plus facilement à travers les membranes lipophiles, ce qui leur permet de jouer un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol, participent ainsi dans le retrocontrôle de la synthèse du cholestérol afin de limiter son accumulation et d'éliminer son excès (Meaney et al., 2002). En outre, ils peuvent interagir avec des récepteurs nucléaires assurant ainsi le contrôle des gènes impliqués dans la régulation et l'homéostasie du cholestérol (Javitt, 2008). Les oxystérols sont aussi impliqués dans différents processus biologiques tels que la biosynthèse des hormones stéroïdiennes et la synthèse des acides biliaires (Russell, 2003; Griffiths et al., 2017). En raison de leurs capacités à traverser facilement la BHE, il a été soupçonné que les oxystérols pourraient jouer un rôle important dans le cerveau (Lütjohann et al., 1996)

Plusieurs études ont souligné les effets toxiques des oxystérols et leurs implications dans de nombreuses maladies liées à l'âge en particulier les maladies neurodégénératives tels que la MA, la MP et la SEP (Zarrouk et al., 2014). En effet, la toxicité des oxystérols est variable. Elle est principalement puissante avec le 7-KC le 7 β -OHC (Vejud et Lizard, 2009). Grâce à leurs propriétés hydrophiles, les oxystérols peuvent s'accumuler au niveau des membranes lipidiques modifiant ainsi la fluidité membranaire, la perméabilité membranaire, l'activité des protéines transmembranaires, ou même interagir avec les rafts lipidiques ce qui induit des changements biophysiques et biochimiques néfastes (Olkkonen and Hynynen, 2009).

Il est maintenant bien établi que le stress oxydant, l'inflammation, les dommages mitochondriaux et la mort cellulaire sont les principaux acteurs de développement des maladies neurodégénératives.

De nombreuses études *in vitro*, ont montré que les oxystérols notamment le 7KC et le 7 β -OHC possèdent des effets pro-apoptotiques, pro-oxydants et/ou pro-inflammatoires et pourraient contribuer à la neurodégénérescence (Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2018; Sghaier et al., 2019a). En effet, le 7 β -OHC est responsable de l'induction de la mort cellulaire par apoptose, sur différents types cellulaires en particulier les cellules monocytaires humaines U937 (Vejud et al., 2008), les cellules du gliome du rat C6 (Clarion et al., 2012), les cellules épithéliales de pigment rétinale (Malvitte et al., 2008), et les 158N cellules (modèle cellulaire de SEP) (Nury et al., 2015). Il est également responsable de l'induction de l'inflammation sur les cellules endothéliales, en stimulant l'activation des

molécules d'adhésion VCAM1, ICAM1, l'IL1 β et E séllectine (**Lemaire et al., 1998**), et sur les macrophage et les monocytes en augmentant la sécrétion des interleukines notamment l'IL8, qui intervient dans l'attraction et le recrutement des leucocytes dans les zones inflammatoires. Ces données soulignent le rôle majeur du 7 β -OHC dans l'inflammation qui est un dénominateur commun de toutes les maladies neurodégénératives (**Liu et al., 1997**).

Par ailleurs, il a été démontré que le 7 β -OHC, induit une mort cellulaire complexe connue sous le nom d'oxiapoptophagie, sur des cellules d'oligodendrocytes murins, impliquant simultanément l'oxydation, l'apoptose et l'autophagie (**Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015**). Ceci suppose que le 7 β -OHC pourrait être impliqué dans la mort des oligodendrocytes ainsi que dans la démyélinisation.

L'ensemble de ces données suggère que le 7 β -OHC, comme le 7KC, pourrait jouer un rôle potentiel dans l'initiation et/ou l'évolution des maladies neurodégénératives en particulier les maladies démyélinisantes comme la SEP (**Vejux and Lizard, 2009; Zarrouk et al., 2014**).

Plusieurs travaux ont souligné l'implication de ces oxystérols (7 β -OHC, 7KC) dans la pathogenèse de la MA. Des augmentations des taux plasmatiques et cérébraux du 7KC et du 7 β -OHC ont été rapportés chez les patients atteints de MA (**Vaya and Schipper, 2007**). En effet, le peptide β -amyloïd et son précurseur APP catalysent l'oxydation du cholestérol en 7 β -OHC, considéré comme un agent très toxique, contribuant à son tour à l'évolution de cette pathologie (**Nelson and Alkon, 2005**).

Les oxystérols sont également impliqués dans la pathogenèse de la MP. Une analyse lipidomique chez patients atteints de MP a révélé des taux accrus en oxystérols, notamment le 7KC et le 7 β -OHC, dans les plasmas et au niveau des cortex visuels (**Seet et al., 2010; Cheng et al., 2011**).

Par ailleurs, les oxystérols sembleraient largement contribuer au développement de la SEP. Etant donné que le cholestérol est le majeur composant de la myéline. Dans les conditions du stress oxydant, le cholestérol est susceptible d'être transformé en oxystérols, induisant ainsi des effets toxiques au niveau de la myéline, des axones et des neurones favorisant la démyélinisation et le développement des maladies démyélinisation telles que la SEP. En effet, des taux élevés en 7KC ont été détectés dans le plasma et le LCR des patients atteints de SEP, associés à des dommages neuronaux suite à l'activation et à la migration des cellules microgliales dans le cerveau (**Diestel et al., 2003**). Une autre étude a montré une légère augmentation du taux du 7 β -OHC cérébral chez les patients SEP (**Leoni et al., 2005**).

Il est important de signaler que le 7 β -OHC pourrait se convertir en 7-kétocholéstérol (7KC) et vice versa via l'activité de l'enzyme 11 β -HSD1 (**Holmes and Seckl, 2006**). De ce fait; le 7 β -OHC est souvent associé aux maladies dont le 7KC est impliqué. (**Nury et al., 2015**). L'accumulation de ces oxystérols dans le cerveau leurs rendent extrêmement toxiques. Ces données nous mènent à supposer que le 7KC et le 7 β -OHC pourraient contribuer au développement et à la potentialisation de la SEP. En effet, l'augmentations des taux des oxystérols, en particulier le 7KC et le 7 β -OHC, pourrait être associée aux multiples désordres tels que l'augmentation du stress oxydant, les altérations de métabolisme du choléstérol, les altérations du métabolisme lipidique, les dysfonctions mitochondriaux et la mort cellulaire (**Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2018a**).

Il est donc important de développer des stratégies visant à améliorer l'élimination et/ou la dégradation de ces oxystérols en particulier le 7 β -OHC, ce qui pourrait constituer une cible thérapeutique prometteuse.

Dans ce contexte, différentes stratégies pourraient être proposées afin d'opposer aux effets délétères du 7 β -OHC, ces stratégies sont les mêmes que celles décrites pour contrecarrer les effets du 7KC qui consistent à i) dégrader le 7 β -OHC et / ou ii) l'inactiver via une sulfonation ou à une estérification avec des enzymes spécifiques et / ou iii) inhiber ses voies de signalisations conduisant à des effets toxiques, avec des facteurs naturels et ou des molécules synthétiques. La dernière approche pharmacologique consiste à connaître les cibles cellulaires et les voies de signalisation activées par le 7 β -OHC ainsi que les altérations métaboliques associées, dans le but d'identifier des cibles thérapeutiques et de nouvelles molécules naturelles et ou synthétiques capables de contrecarrer les effets toxiques du 7 β -OHC. Dans ce contexte le DMF et la biotine, qui sont molécules utilisées dans le traitement de SEP-RR et SEP-P respectivement, sont supposées comme molécules capables de ralentir l'évolution et l'aggravation de la SEP.

L'étude du mécanisme d'action du DMF et de son métabolite majeur MMF, a montré que ces molécules agissent en contrôlant l'état RedOx par l'activation des enzymes impliquant dans les réponses cytoprotectrices et antioxydantes (**Havrdova et al., 2013**), le fonctionnement mitochondrial et le métabolisme lipidique (**Huang et al., 2015**), qui sont les principaux paramètres qui pourraient participer à la démyélinisation et au développement de la SEP.

De même la biotine est considérée comme molécule potentiellement promotrice via ses activités biologiques et cliniques, en agissant en tant qu'un cofacteur pour différentes carboxylases impliquées dans le cycle de krebs, contrôlant ainsi l'activité mitochondriale, et

le métabolisme lipidique. La biotine pourrait ainsi stimuler la formation et la régénération de la myéline au niveau des oligodendrocytes, ce qui est considéré comme un mécanisme puissant dans le traitement de la SEP. (Sedel et al., 2016).

L'ensemble de ces données met en faveur que le DMF, MMF et la biotine, auxquels nous nous sommes plus particulièrement intéressés dans cette thèse, pourraient contribuer à limiter les effets causals des oxystérols particulièrement du 7 β -OHC, selon différents mécanismes : i) le contrôle de l'homéostasie RedOx, ii) le maintien d'un bon fonctionnement mitochondrial, iii) la régulation du métabolisme lipidique ainsi que iiiii) la prévention de la mort cellulaire (des oligodendrocytes).

Nous pouvons aussi supposer que la quantification de ces oxystérols en particulier le 7 β -OHC et le 7KC (considéré comme un métabolite du 7 β -OHC) dans le plasma et/ou préférentiellement dans le LCR pourrait se conciderer comme une alternative prometteuse pour la détection de la SEP et une cible thérapeutique intéressante, pour guérir mais tout au moins retarder le plus possible l'évolution de la cette maladie.

6. Neurodégénérescence et mort cellulaire

Maintenant, il est bien établi que l'amplification du stress oxydant, le dysfonctionnement des organites cellulaires en particulier les mitochondries et les lysosomes ainsi que les altérations du métabolisme lipidique (AG, cholestérol, oxystérols) contribuent au déclenchement de différentes formes de mort cellulaire (Boya and Kroemer, 2008; Kroemer et al., 2009).

En effet; la mort cellulaire est un processus physiologique fondamental qui joue un rôle important dans l'ontogenèse et dans l'homéostasie cellulaire, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Cependant, sa dérégulation pourrait contribuer à l'apparition de nombreuses maladies en particulier les maladies neurodégénératives. Il existe trois types de mort cellulaire : une mort par apoptose (mort de type I), par nécrose (mort de type II) et par autophagie (mort de type III).

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée de type I) est induite par différents agents biologiques, chimiques et physiques. Elle est impliquée dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire, ainsi que dans le développement et la différenciation cellulaire (embryogenèse). Elle est également impliquée dans de nombreux processus pathologiques. L'apoptose est définie, morphologiquement, par une perte d'adhésion, une diminution du volume cellulaire accompagnée par une condensation du noyau et une fragmentation du

réseau mitochondrial. Ces changements sont associés à une fragmentation de l'ADN et à la formation du corps apoptotiques suite au bourgeonnement de la membrane plasmique.

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

* **Une voie extrinsèque (voie des récepteurs de mort)** qui est initiée par l'activation de récepteurs de mort appartenant à la superfamille des TNF, conduisant ainsi à l'activation directe des caspases, qui sont des protéines à cystéine (Salvesen and Dixit, 1997).

* **Une voie intrinsèque** appelée aussi **voie de signalisation mitochondriale (voie mitochondriale)** qui est activée par différents signaux intracellulaires, tels que le stress oxydant, qui peuvent modifier l'expression de certains facteurs membranaires. Ceci conduit à une dépolarisation mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) associée à une activation d'une cascade de caspases contribuant à de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques, y compris la fragmentation internucléosomale de l'ADN (Kerr, 2002).

Cependant dans certaines conditions, la perte de $\Delta\Psi_m$ peut favoriser la libération du facteur inducteur de l'apoptose (AIF) (Joza et al., 2009) et de l'endonucléase G (EndoG) qui pourraient déclencher **une mort cellulaire indépendante des caspases** (Widlak and Garrard, 2006).

L'apoptose peut conduire à une **nécrose secondaire** qui est caractérisée par un gonflement des cellules et des organites cellulaires et une augmentation de la perméabilité cellulaire associée à une rupture de la membrane plasmique (Fink and Cookson, 2005; Tobinick, 2009). Les cellules nécrotiques sont caractérisées par une externalisation de phosphatidylsérine et par une augmentation de la perméabilité à l'iodure de propidium ou à l'aminocaproïne D (Lecoeur et al., 2002). Dans ces conditions, la dépolarisation mitochondriale est souvent associée au gonflement mitochondrial résultant d'une rupture de l'osmolarité, ce qui entraîne une oncosé qui précède la nécrose (Fink and Cookson, 2005). Outre les changements morphologiques, les cellules nécrotiques se différencient de cellules apoptotiques par l'absence de l'activation de la caspase.

L'autophagie (mort cellulaire de type III) a fait l'objet de nombreuses études (Ogier-Denis and Codogno, 2003). Ce type de mort cellulaire est largement impliqué dans le renouvellement des protéines, des ARN et d'autres macromolécules cytoplasmiques. L'autophagie est stimulée par différents facteurs tels que la privation d'acides aminés le traitement par la rapamycine, les hormones stéroïdiennes et les oxystérols (Vejux et al., 2008; Nury et al., 2015). Elle est impliquée dans les mécanismes de survie cellulaire et de recyclage

des molécules ou des structures cellulaires altérées (**Hasima and Ozpolat, 2014**) et est indépendante des caspases (**Hayat, 2016**) et pourrait également contribuer à la mort cellulaire. En effet, les cellules qui ont subi une autophagie ayant une morphologie spécifique associée à une dégradation des composants cytoplasmiques formant ainsi de nombreuses vacuoles (**Badadani, 2012**).

Il existe maintenant des arguments en faveur de l'implication de ces différents modes de mort cellulaire dans les processus neurodégénératifs associés au développement de différentes maladies neurodégénératives.

L'apoptose semble impliquée dans la MA. Des des taux élevés de TNF α cérébraux ont été identifiés chez les malades MA (**Blasko et al., 2001**). Ces derniers sont impliqués dans la production de peptide A β et dans la potentialisation de sa neurotoxicité.

En outre, une augmentation de l'immunoréactivité du récepteur Fas et de son ligand Fas L a été révélée au niveau des plaques séniles et des neurites des patients de MA, associée à une activation de la caspase-8 (**Su et al., 2003**). En faveur de ces données, une autre étude a montré une augmentation du niveau de Fas et FasL associée à une activation de la voie JNK (**Morishima et al., 2001**). Dans la MA, l'apoptose peut se déclencher aussi par la voie mitochondriale. En effet, l'analyse *post-mortem* de cortex d'un cerveau MA a révélé une augmentation de l'expression des homologues pro-apoptotiques de Bcl-2 (**Zhao et al., 2016**). En outre, une augmentation des taux d'autres protéines pro apoptotiques (PAR-4 (prostate apoptosis response-4)) associée à une dégénérescence neuronale, via l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose, a été reportée chez les patients atteints de MA (**Passananti and Fanciulli, 2007**). Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence l'activation de différentes caspases dans la MA notamment les caspases-3, -6, -8 et -9, qui sont impliquées dans le clivage de la protéine Tau dans le cerveau des patients atteints de MA (**Lee and Shea, 2012**). L'autophagie joue également un rôle important dans la physiopathologie de la MA. Elle impliquée dans la production de peptide-amyloïde et l'augmentation de l'activité γ -sécrétase, d'où l'évolution de la MA (**Wolfe et al., 2013; Liang and Jia, 2014**).

Plusieurs études ont décrit également l'implication de l'apoptose dans la MP. En effet, un profil de dégradation d'ADN spécifique à l'apoptose et des noyaux apoptotiques ont été observés chez patients atteints de MP (**Anglade et al., 1997**). En outre, une forte expression de formes actives de caspases -1, -3, -8, -9 a été révélée dans les neurones dopaminergiques de la substance noire chez les patients MP. (**Tatton, 2000**). D'autre études ont suggéré l'implication des récepteurs de mort cellulaire (FAS et FADD) dans la MP (**Hartmann,**

2004). La voie d'autophagie semble aussi être impliquée dans la MP. Une dysrégulation de la voie d'autophagie a été révélée dans le cerveau MP, associée à une accumulation de α -synuclein et la formation des inclusions cytosoliques conduisant à la neurodégénérescence dans la MP (**Engelender, 2008**).

Passant maintenant à la SEP, ou le processus d'apoptose est fortement présent et est impliqué dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et le contrôle des réponses immunitaires dans SEP. Néanmoins il peut se trouver exacerbé dans cette pathologie (**M Reichardt and Luhder, 2012**).

L'une des causes importantes de la pathogenèse de la SEP est la capacité des cellules T à s'échapper l'apoptose (**Pender, 1998**). Par conséquent, l'incapacité du système immunitaire à éliminer les lymphocytes autoréactifs est due certainement à un défaut dans la machinerie de la mort cellulaire. Dans ce contexte, **Satoh et ses collaborateurs (2005)** ont révélé par la technique de puce à ADN, une dysrégulation de la plus part des gènes codant pour les protéines (pro-apoptotiques et/ ou anti-apoptotiques) associées à l'activation des voies de signalisation conduisant à l'apoptose, ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la réplication et le remodelage de l'ADN chez les patients atteints de SEP RR, ce qui suggère des dommages d'ADN liées à l'apoptose (**Satoh et al., 2005**).

L'amplification de l'action apoptotique a été aussi prouvée par une autre étude, qui a montré une élévation des taux d'ARNm de Fas (récepteur de mort), de son ligand Fas L et de ligand liée au TNF (TRAIL) dans les cellules mononuclées du sang périphérique des patients atteints de SEP RR, tandis que les lignées cellulaires des lymphocytes T présentent un défaut fonctionnel dans la voie de signalisation Fas (**Comi et al., 2000**). D'autre part, des études histopathologiques ont montré une augmentation de l'expression de la Bcl-2 dans les lymphocytes au niveau des lésions SEP (**Zetl et al., 1998**). La surexpression de la Bcl-2 pro-apoptotique est anticipée pour induire l'accumulation des cellules T auto-réactives impliquées dans la pathogenèse de la SEP et l'évolution de la cette maladie (**Dastmalchi et al., 2018**). Par ailleurs, étant donné que la casp-8 est vitale pour la suppression de la voie nécroptotique, une activation défectueuse de cette caspase favorise l'inflammation ce qui pourrait conduire au développement de la SEP (**Dastmalchi et al., 2018**).

Il est aussi important de noter que les oligodendrocytes sont de loin les cellules les plus sensibles au processus de mort cellulaire au niveau SNC. Ceci est lié au fait que la céramide, composant de sphingolipides de la myéline, peut activer la signalisation pro-apoptotique (voie sphingomyélinase / céramide) en réponse à une lésion oxydative (**Schenck et al., 2007**). Ces

données confirment l'implication des voies intrinsèques, extrinsèques (Initiation de l'apoptose) et nécroapoptotiques dans le développement de la SEP.

Il paraît également que l'autophagie est impliquée dans la pathogenèse de la SEP. En effet, dans les lésions SEP, une baisse de l'expression de Lamp2 (Lysosomal-associated membrane protein) a été identifiée, ce qui prouve une altération du mécanisme de l'autophagie (**Lindberg et al., 2004**). De plus, dans le modèle EAE aiguë et chronique, l'agrégation des protéines dans la moelle épinière et la diminution du ratio LC3-II / LC3-I suggèrent une altération du mécanisme d'autophagie (**Dasgupta et al., 2013**). Cependant, des données *in vivo* sur des patients atteints de SEP RR ont révélé une augmentation de l'expression d'un gène lié à l'autophagie (ATG 5) dans les lymphocytes T cérébrales chez les patients atteints de SEP RR de l'EAE et (**Alirezaei et al., 2009**). De plus, l'inhibition de l'autophagie suite à l'activation de la voie de signalisation mTOR, rétablit la régénération des axones dans le SNC, phénomène important pour la remyélinisation dans la SEP (**Park et al., 2008**). Une étude plus récente a montré une altération de l'expression de plusieurs gènes liés à l'autophagie (tels que ATG9A, GAA (lysosomal acide glucosidase)) chez des patients SEP (**Igci et al., 2016**).

L'ensemble de ces données indiquent que le mécanisme d'autophagie dans la pathogenèse de la SEP reste encore confus et mal connu. L'implication de l'autophagie à différents stades de la maladie et au niveau des différents types cellulaires nécessite des recherches plus poussées pour déterminer le lien de causalité entre l'autophagie et la SEP.

Par ailleurs, de nombreuses études *in vitro* ont montré que les oxystérols, notamment le 7 β -OHC, sont des puissants inducteurs d'apoptose, et peuvent également induire la nécrose et l'autophagie sur différents types cellulaires en particulier sur les 158N (modèle d'étude de SEP *in vitro*) (**Malvitte et al., 2008; Vejux and Lizard, 2009; Clarion et al., 2012; Nury et al., 2015**). Sur ces cellules, le 7 β -OHC induit un mode complexe de mort cellulaire « oxyapoptophagie » impliquant un stress oxydant, une apoptose associée à des dysfonctionnements mitochondriaux et possédant des caractéristiques d'autophagie (augmentation du ratio LC3-II/LC3-I) (**Vejux and Lizard, 2009; Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015**).

III. Modèles d'étude de la sclérose en plaques

1. Modèles *in vitro*

Le modèle cellulaire *in vitro* constitue une étape fondamentale pour mieux comprendre la physiopathogénèse de la maladie ainsi que ses mécanismes pathologiques associés. Cette approche (*in vitro*) permet d'étudier les mécanismes de certaines molécules et d'identifier des nouvelles cibles pharmacologiques.

Les oligodendrocytes murins: en cultures primaires, présents dans des cultures organotypiques, ou des lignées d'oligodendrocytes murins (158N), sont considérés comme des bons modèles pour l'étude de la SEP.

La lignée cellulaire 158N expriment les protéines de myéline telles que leMOG, MBP, PLP et possèdent des peroxyosomes fonctionnels (**Feutz et al., 2001; Simons and Trajkovic, 2006; Baarine M et al, 2009**). L'expression de ces protéines indique que cette lignée oligodendrocytaire 158N constitue un outil intéressant pour évaluer les effets de molécules sur des cellules présentant des caractéristiques d'oligodendrocytes différenciés matures.

Une autre lignée cellulaire a été également mise en évidence pour aborder la SEP, elle s'agit d'une lignée d'oligodendrocyte humain MO3.13 qui constitue également un modèle intéressant pour l'étude du développement de la SEP *in vitro* (**Huang and Freter, 2015**).

Dans la SEP, l'altération de la perméabilité de la BHE est suspectée comme étant l'une des premières étapes de la physiopathologie de cette maladie. Dans ce contexte, l'équipe de **Wong (2007)** a développé un modèle de BHE *in vitro* pour évoquer le contexte inflammatoire de la maladie (**Wong et al., 2007**). Par ailleurs, des méthodes microfluidiques en particulier des méthodes de « Body on Chips » faisant appel à des iPSCs (inducible pluripotent stem cells) ont été récemment mises en place pour l'étude de la SEP. Il s'agit d'une reprogrammation des érythroblastes en cellules souches pluripotentes induites et à partir de celles-ci obtenir des astrocytes, cellules clés dans la neuroinflammation. Une grande similitude a été observée entre ces astrocytes dérivés de cellules souches et des astrocytes isolés de cerveau humain, et décrire le profil réactif de ces astrocytes au contact de cytokines inflammatoires caractéristiques de la SEP. Ce modèle permet d'évaluer le profil inflammatoire et immunitaire de la maladie ainsi que les interactions possibles entre les cellules du système nerveux et les cellules immunitaires. Cette technologie ouvre de grandes possibilités d'étude dans le domaine de la SEP (**Perriot et al., 2018**)

2. Modèle *in vivo*

Le choix d'un modèle animal pour l'étude de la SEP reste encore un majeur problème, puisque les modèles animaux de la SEP disponibles actuellement ne développent qu'une partie des aspects de la pathologie. Le modèle animal le plus utilisé dans la SEP est celui de l'EAE qui est un modèle de maladie immunitaire du SNC (X-ALD). Ce modèle animal présente des signes cliniques semblables à ceux de la SEP sous sa forme inflammatoire (SEP-RR) **(Constantinescu et al., 2011)**.

Le modèle EAE est réalisé en injectant des extraits de cerveaux de lapin chez le singe ce qui entraîne une infiltration de cellules immunitaires et une démyélinisation périvasculaire du SNC **(Salou et al., 2013)**. Cependant, le modèle EAE murin est le plus utilisé dans la SEP. C'est un modèle basé sur la stimulation du système immunitaire périphérique, en injectant des émulsions d'adjuvants de Freund associées à des protéines de myéline (MBP, PLP ou MOG). Le modèle MBP a été identifié comme étant le modèle le plus inflammatoire. Par ailleurs, il a été démontré que le transfert de lymphocytes T de souris EAE à des souris naïves induit des symptômes évoquant la SEP **(Folch and Lees, 1951; Zhang et al., 2004; Bittner et al., 2014)**. Après une période de trois semaines, ces souris commencent à présenter des lésions péri-vasculaires au sein du SNC, ainsi qu'une surproduction d'anticorps dans le parenchyme cérébral et le LCR. Ces phénomènes biologiques sont associés à différents autres signes tels que: la perte de poids, la paralysie de la queue, les troubles de l'équilibre.

Les souris trembleuses « quaking viable mouse – qk(v) » ont été aussi considérées comme des modèles d'étude de la SEP. Ces souris présentent des tremblements après leurs naissances. La démyélinisation provient de l'incapacité de ces souris qk(v) à produire des oligodendrocytes matures **(Larocque and Richard, 2005)**. Il existe aussi un modèle de SEP progressive qui est obtenu par injection du cuprizone **(Torkildsen et al., 2008; Ransohoff, 2012)**.

OBJECTIFS

Objectifs

Actuellement, il est bien établi que la sclérose en plaque (SEP) est une maladie neurodégénérative associée à de nombreuses perturbations inflammatoires accompagnées d'un déséquilibre du statut Red/Ox, d'un désordre du métabolisme mitochondrial et peroxysomal et d'une altération du métabolisme lipidique conduisant à une destruction de la myéline et à une mort neuronale (**Mahad et al., 2015**). La myéline est synthétisée par des oligodendrocytes dont le cholestérol est le majeur constituant. Dans les conditions du stress oxydant, phénomène clé de la pathogenèse de la SEP, le cholestérol devient susceptible à l'oxydation générant ainsi des oxystérols, en particulier le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC) et le 7-kétocholestérol (7KC). Cet dernier est cytotoxique vu son implication dans l'altération de l'homéostasie lipidique, l'amplification du stress oxydant, les dysfonctions mitochondriaux et l'induction de la mort cellulaire (**Nury et al., 2015**). Des taux élevés en 7KC ont été identifiés chez des patients atteints de maladies neurodégénératives dont la SEP. En effet, le 7KC peut être converti en 7 β -OHC via l'activité de 11 β -HSD1 et *vice versa* (**Holmes and Seckl, 2006**). Il convient donc de supposer que le 7 β -OHC pourrait être impliqué directement ou indirectement dans la pathogenèse de la SEP.

Compte tenu du nombre croissant d'agents thérapeutiques présentant différents modes d'actions, d'applications, d'efficacités, et de tolérabilités, choisir un médicament efficace offrant des améliorations autant biologiques que cliniques pour les patients SEP, est un défi qui se heurte à la difficulté. De ce fait, il est important d'intégrer les études et les données cliniques à celles biologiques afin de trouver le ou les médicaments les plus efficaces pour chaque patient. Il convient donc de mieux connaître les activités des molécules utilisées et leurs cibles potentielles pour optimiser leurs efficacités afin de les utiliser dans des conditions optimales pour permettre sinon de guérir, mais tout au moins d'améliorer le plus possible l'état des malades et à défaut de retarder l'évolution de la maladie. Parmi ces molécules figure le DMF qui constitue un traitement de fond de la SEP RR ainsi que son métabolite majeur le MMF, et la biotine à fortes doses (MD1003) traitement de la SEP P.

Dans la présente étude, différents objectifs ont été fixés :

- Déterminer les paramètres associés à la pathogenèse de la SEP incluant les marqueurs du stress oxydant (les HODE et les oxystérols en particulier le 7 β -OHC), du métabolisme lipidique (profil d'acides gras) via une étude clinique préliminaire cas-témoins menée sur 10 patients atteints de SEP RR et 10 Témoins.
- Déterminer l'activité cytotoxique du 7 β -OHC sur des cellules oligodendrocytaires murines 158N, cellules productrices de la myéline, sur divers paramètres associés au développement de la SEP à savoir : le stress oxydant, le dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomal, l'altération du profil lipidique, la destruction de la gaine de myéline et la mort cellulaire.
- Evaluer l'efficacité de différents traitements (DMF, MMF et Biotine), actuellement employés pour soigner les malades SEP, à s'opposer aux effets toxiques du 7 β -OHC, et identifier leur cible cellulaire et leur mode d'action.

MATERIEL ET METHODES

I. Etude clinique préliminaire

Notre étude préliminaire est une étude cas-témoins. Cette étude a inclus des malades atteints de SEP RR recrutés sur la région dijonnaise (au CHU de Dijon) ainsi que des sujets présentant des atteintes neurologiques autre que la SEP (polyradiculo-neuropathies, polyneuropathies, myéloradiculopathies) en utilisant le matériel biologique suivant : plasma et liquide céphalorachidien (LCR) fournies par la bio-banque dijonnaise de Sclérose en Plaques (Responsable scientifique : Prof. Thibault Moreau).

Au total, nous avons étudiés 10 patients (SEP RR) et 10 patients non SEP. Nous avons, avec le consentement éclairé des patients, utilisé leurs plasmas et leurs liquides céphalo rachidien (LCR) pour effectuer des dosages d'acides gras, d'oxystérols, ainsi que des hydroxy-acides octodecadenœiques (HODEs). La fraction lipidique est extraite par la méthode de Folch et al (1957) (**Folch et al., 1957**). La composition en acides gras, en oxystérols ainsi qu'en HODES est évaluée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).

II. Culture cellulaire

1. Lignée cellulaire

Pour les tests *in vitro* on a utilisé comme outil biologique une lignée cellulaire murine 158N. Ce sont des cellules oligodendrocytaires murines, immortalisées par l'antigène T du virus SV40 à partir d'une culture primaire mixte de cerveau de souris mâles sauvages Tabby (Ta/Y) et présentant les caractéristiques des oligodendrocytes différenciés (**Baarine et al., 2009**). Cette lignée cellulaire constitue un modèle intéressant pour aborder les dysfonctionnements métaboliques et cellulaires associés aux oxystérols afin de mieux comprendre la physiopathologie de la SEP. Ces cellules expriment fortement les protéines de myéline notamment PLP, MBP, MOG et CNPase, les transporteurs peroxysomaux (Abcd1 et Abcd3) ainsi que les enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomale des AGTLC tels que l'Acox1 (**Baarine et al., 2009**).

2. Culture et traitement des cellules

Les cellules 158N sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Amboise, France), contenant les nutriments indispensables à la survie cellulaire tels que les ions minéraux, les cofacteurs, les vitamines, les acides aminés et le glucose, supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (chauffage à

56°C pendant 30 minutes), qui apporte les facteurs de croissance indispensable, et 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) (Dutscher), afin d'éviter les proliférations bactériennes. Ce qui constitue un milieu de culture complet.

Les 158N sont cultivées en boîtes de Pétri (100x20 mm style, BD Biosciences) à une densité de 2×10^6 cellules (10 mL de milieu de culture) à 37°C dans un incubateur à atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ et entretenues deux fois par semaine. Lorsque les cellules arrivent à confluence et en vue de leurs passages, le milieu de culture épuisé est éliminé et les cellules adhérentes sont rincées avec 2 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) sans calcium et sans magnésium afin d'éliminer toute trace d'inhibiteur de trypsine. Ensuite, les cellules sont décollées grâce à l'action conjuguée de trypsine (0,5 mg/mL) et d'EDTA (0,2 mg/mL) (Pan Biotech) (2mL par boîte de Pétri (100x20 mm style, BD Biosciences)), puis incubées à 37°C pendant 2 à 3 minutes. Une fois les cellules détachées, elles sont dispersées dans du milieu de culture (afin d'arrêter l'action de trypsine), puis centrifugées à 250 g pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu de culture. Les cellules sont ensuite comptées grâce à une cellule de Malassez. 2 mL de la suspension cellulaire ont été mises de nouveau en culture en ajoutant 8 mL de milieu de culture complet frais.

- Le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC) a été fourni par le professeur Mohammad Samadi (Metz, France) (**Carvalho et al., 2009**); le contrôle de la qualité est réalisé avec les spectres RMN 1H et 13C obtenus avec un spectromètre Bruker Avance 400; la pureté était > 99%. La solution mère de 7 β -OHC est préparée comme suit : 5mg de 7 β -OHC sont solubilisés dans 250 μ L d'éthanol absolue, ensuite dilués dans de milieu de culture complet pour avoir une solution de 800 μ g / mL (2 mM). Cette solution est soniquée pendant 10 min ensuite conservée à 4 ° C. La concentration d'éthanol correspondante est de 0.1%
- La solution mère de Diméthyle fumarate (DMF) (ref: 242926, Sigma-Aldrich) et celle de son métabolite majeur le Monométhyle fumarate (MMF) (ref: 651419; Sigma-Aldrich) sont préparées comme suit : 0,0144g et 0,0130g de DMF et de MMF respectivement sont dissous dans 2 mL de DMSO pour avoir une concentration de 5 mM, qui seront ensuite stockés à -20°C. La concentration du DMSO correspondante est de 0,05%.

- Une solution mère de la biotine (Sigma-Aldrich) est préparée à 0,5 mM dans le milieu de culture comme suit: 0,0012g de biotine sont dissous dans 10 mL de milieu de culture complet, ensuite vortexés pendant 5 min puis stockés à -20 ° C.
- La vitamine E (α -tocophérol, réf: T3251, Sigma-Aldrich) est préparée en dissolvant 0,34g dans un mL d'éthanol absolu pour avoir une concentration de 80 mM (utilisée à 400 μ M sur les cellules), comme décrit précédemment (**Ragot et al., 2013**). Dans ces conditions la concentration finale d'éthanol est de 0.6 %.

Les cellules 158N sont cultivées pendant 24 h soit dans des plaques à six puits à raison de 30 000 cellules par cm^2 (240 000 cellules par puits de 6 plaques à puits) avec 2 mL de DMEM, soit dans des boîtes de Pétri (10 cm de diamètre) à raison de 30 000 cellules / cm^2 ($2,35 \times 10^6$). Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 h en présence ou en absence du 7 β -OHC 20 $\mu\text{g/ml}$ (50 μM) associés ou non au DMF (25 μM), au MMF ((25 μM), à la Biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μM), ajoutés 2h avant l'ajout du 7 β -OHC.

- ✓ Le 7 β -OHC (50 μM) est choisi en raison de sa forte toxicité. A cette concentration (50 μM), le 7 β -OHC induit des dysfonctionnements mitochondriaux et peroxysomaux ainsi qu'une mort cellulaire complexe (oxiapoptophagie) notamment sur les cellules 158 (**Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015**).
- ✓ Le DMF et le MMF sont utilisés à 25 μM , c'est la faible concentration qui protège les cellules 158N contre les effets délétères du 7 β -OHC (50 μM).
- ✓ La biotine est utilisée à 10 et 100 nM en fonction de mesures effectuées sur du plasma humain de sujets sains et malades atteints de SEP (**Anagnostouli et al., 1999**). Ce sont les plus faibles concentrations qui induisent une protection sur les 158N contre la toxicité induite par le 7 β -OHC.
- ✓ Dans cette étude, l' α -tocophérol est utilisée comme un contrôle positif, en raison de sa capacité à contrecarrer les effets du 7 β -OHC sur les cellules 158N (**Ragot et al., 2011; Nury et al., 2015**).

3. Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie à contraste de phase

Après 24 heures de traitement avec ou sans 7 β -OHC (50 μ M) en présence ou en absence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M). La morphologie et la densité cellulaire des cellules 158N sont déterminées à l'aide d'un microscope à contraste de phase inversée (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Jena, Allemagne), équipée d'une caméra Axioacam ICm1 (Zeiss) avec un logiciel Axiovision (Zeiss).

4. Analyse de l'adhérence cellulaire par coloration au crystal violet

Le crystal violet est utilisé pour quantifier les cellules adhérentes (Colin et al., 2011), puisqu'il colore les noyaux avec une couleur violet foncé ce qui permet de visualiser les noyaux et d'évaluer ainsi l'adhérence et la confluence cellulaire. Les cellules 158N sont cultivées en présence ou en absence du 7 β -OHC (50 μ M) associées ou non au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M) pendant 24 h. À la fin du traitement, les cellules adhérentes sont lavées 2 fois avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes, puis colorées au crystal violet pendant 5 min. L'excès de colorant est éliminé en effectuant trois lavages avec de l'eau distillée. Après 10 min de séchage à température ambiante, le crystal violet est dissous avec du citrate de sodium à 0,1%, dilué dans de l'éthanol à 50%. L'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (TecanSunrise. Tecan, Lyon, France).

5. Evaluation du statut mitochondrial

5.1. Evaluation de l'activité de succinate déshydrogénase mitochondriale et/ou la prolifération cellulaire par le test MTT

Le test MTT est utilisé pour évaluer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale ce qui nous donne une indication sur la viabilité cellulaire et / ou la prolifération cellulaire. Cette méthode colorimétrique consiste à mesurer la capacité des cellules à réduire le bromure de sel de tétrazolium 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium (MTT) de couleur jaune en formazan de couleur violet foncé insoluble, par l'enzyme de la succinate déshydrogénase. Seules les cellules métaboliquement actives peuvent transformer le MTT en formazan (Malvitte et al., 2008).

Les cellules 158N sont cultivées en plaques 6 puits puis traitées avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10, 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) en présence ou en absence du 7 β -OHC (50 μ M). Après 24 h du traitement, le milieu épuisé est éliminé et

les cellules adhérentes sont incubées en présence d'une solution de MTT (0.05 mg/mL) pendant 3h à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. La solution de MTT est ensuite éliminée et les les cellules adhérentes sont rincées deux fois avec du PBS. Les cristaux de formazan insolubles formés sont dissous dans une solution de DMSO et l'absorbance est lue à 570 nm avec un lecteur de microplaques (TECAN Sunrise, Tecan, Lyon, France). L'activité de la succinate déshydrogénase correspondant à chaque condition est déterminée par rapport à celle des cellules contrôles.

5.2. Evaluation du potentiel transmembranaire mitochondrial par le 3,3'-dihexyloxycarbocyanineiodide : DiOC₆(3)

Le potentiel de la membrane mitochondrial est la résultante de mouvements de protons transmembranaires qui créent un gradient électrochimique entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale.

Cette variation du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) est évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'un colorant lipophile cationique 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodure (DiOC₆(3)) ($\lambda_{Ex\ max}=488\text{ nm}$; $\lambda_{Em\ max}=501\text{ nm}$), qui s'accumule dans la matrice mitochondriale en fonction de $\Delta\Psi_m$ (Berthier et al., 2004; Ragot et al., 2013). En effet, la mesure de $\Delta\Psi_m$ est souvent utilisée pour caractériser l'activité métabolique mitochondriale et/ou une mort cellulaire à un stade précoce (Chen., 1988).

La baisse ou la perte de $\Delta\Psi_m$ est indiquée par une diminution de l'intensité de la fluorescence verte collectée à travers un filtre passe-bande de $520 \pm 10\text{ nm}$.

La solution mère de DiOC₆(3) est préparée dans le DMSO à une concentration de 1 mM ensuite diluée dans l'eau distillée à une concentration de 20 μM et conservée à -20 °C. Cette solution est utilisée sur les cellules à une concentration finale de 40 nM.

À la fin du traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes sont collectées ensuite mises en suspension dans un 1 mL de PBS. Après 15 min d'incubation à 37°C avec de DiOC₆(3) (40 nM) l'analyse est réalisée extemporanément par cytométrie en flux (Galaxy / Partec). 10 000 cellules par échantillon sont recueillies et les données sont analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

Le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées correspond au pourcentage des cellules DiOC₆(3) négatives.

5.3. Evaluation de la masse mitochondriale par coloration au Mitotracker Red

Le Mitotracker (Thermo Fischer Scientific) est un fluorochrome qui permet de mesurer la masse mitochondriale grâce à sa capacité à diffuser à travers la membrane plasmique pour s'accumuler dans les mitochondries métaboliquement actives.

Pour évaluer l'effet des différentes molécules testées sur la masse mitochondriale, les cellules 158N (adhérentes et non adhérentes) traitées en présence ou en absence du 7 β -OHC (50 μ M), associées ou non au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M) pendant 24 h sont collectées par trypsination, lavées avec du DMEM préalablement préchauffé (37 ° C) sans SVF, puis incubées (30 min, 37°C) avec une solution de Mitotracker Red (100 nM) préparée dans du DMEM sans SVF.

A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS et suspendues dans 1 mL de PBS fraîchement préchauffé pour être analysées par cytométrie en flux (FACS Aria III (Becton-Dickinson, San José, CA, USA). Les données sont ensuite analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star Inc).

5.4. Mesure de la production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène (des anions superoxydes mitochondriaux) par coloration au MitoSOX

La production mitochondriale d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) est quantifiée par cytométrie en flux après coloration au MitoSOX (Thermo Fisher Scientific), qui s'accumule dans les mitochondries des cellules vivantes (**Zarrouk et al., 2012**). Une fois dans les mitochondries, cette sonde est oxydée par l' $O_2^{\bullet-}$ et émet une fluorescence orange / rouge (λ_{Ex} max = 510 nm; λ_{Em} max = 580 nm).

À la fin du traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes sont trypsinées et mises en suspension dans un 1 mL de PBS. La solution mère de MitoSOX est préparée à 5 mM dans du PBS. Les cellules sont incubées avec de MitoSOX (5 μ M, 15 min à 37 °C).

Les signaux fluorescents sont recueillis à travers un filtre passe-bande de 580 ± 20 nm avec un cytomètre de flux FACS Aria III (Becton-Dickinson) en prenant en compte 10 000 cellules par échantillon. Les données sont analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star Inc).

5.5. Caractérisation et analyse des taux de cardiolipines par spectrométrie de masse en tandem par chromatographie en phase liquide (LC-MS / MS)

Les cardiolipines sont des phospholipides qui se situent dans la membrane mitochondriale interne où elles sont biosynthétisées. Elles jouent un rôle important dans la mitochondrie *via* la régulation de la chaîne de transport des électrons, les processus bioénergétiques, la stabilité et la dynamique mitochondriale (**Paradies et al., 2014**).

L'analyse et la quantification des cardiolipines sont réalisées par spectrométrie de masse en tandem en chromatographie liquide (LC-MS / MS) sur un spectromètre de masse Agilent 6460 QqQ (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, États-Unis), selon la méthode de **Vial et al (2015)**.

Après traitement, les cellules sont collectées par trypsination, lavées avec du PBS puis centrifugées. Après comptage, les culots cellulaires sont dopés avec 100 ng de phosphatidyl éthanolamine et de cardiolipines utilisées comme étalon interne. Les lipides totaux sont extraits en utilisant un mélange chloroforme /éthanol (2V/1V) selon la méthode de **Folch et al., 1957**).

Les extraits sont dissous avec 100 µL de chloroforme / méthanol / eau distillée (60/30 / 4,5 µL). 1 à 8 µL sont utilisés pour l'analyse lipidomique. Les standards lipidiques et les produits chimiques utilisés provenaient respectivement d'Avanti Polar Lipids (Coger SAS, Paris, France) et de Sigma Aldrich. Les solvants de qualité de LC-MS / MS provenaient de Thermo Fischer Scientific.

6. Evaluation du statut peroxysomal: Etude de l'expression et de la topographie du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3 par immunofluorescence indirecte

L'ABCD3 (ATP binding cassette transporter D3), est un constituant majeur de la membrane peroxysomale. Ce transporteur peroxysomal joue un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires notamment dans le métabolisme lipidique (**Schrader and Fahimi, 2008**).

En effet, les peroxysomes sont impliqués dans le processus de la β -oxydation des AGTLC. Donc une altération d'une des fonctions peroxysomales peut induire un désordre dans le métabolisme lipidique. La topographie et la distribution d'ABCD3 sont déterminées par immunofluorescence indirecte ainsi la quantification et l'expression d'ABCD3 sont évaluées par cytométrie en flux (**Baarine et al., 2009**).

La quantification d'ABCD3 est réalisée sur des cellules cultivées dans des plaques de 6 puits et traitées pendant 24 h avec le DMF, le MMF ou la biotine en présence ou en absence du 7 β -OHC. A la fin du traitement, les cellules sont collectées par trypsination puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 2% pendant 10 min à + 4°C puis lavées par 2 mL de PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées et les sites non spécifiques sont saturés suite à une incubation des cellules avec une solution de saturation (PBS, 10% SVF, 0,05% saponine) pendant 30 min à température ambiante. Après lavage des cellules avec du PBS, 100 μ L d'anticorps polyclonal de lapin (Zymed) dirigés contre ABCD3 (Réf: # 11523651, Pierce / Thermo Fisher Scientific, Brumath, France) (dilués au 1/250 dans la solution de saturation) sont ajoutés sur les cellules. Après 1 h d'incubation à +4°C, les cellules sont lavées avec 1 mL de PBS et mises en présence de 100 μ L d'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (Invitrogen/Molecular Probes) (dilué au 1/300 dans la solution de saturation), puis incubées pendant 30 min à + 4°C. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS et resuspendues dans 1 mL de PBS. L'analyse est réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La lumière verte est collectée par un filtre passe-bande 520 \pm 20 nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence est quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. Les données sont acquises et analysées avec le logiciel FlowJo.

La taille et la topographie des peroxysomes sont observées sur des cellules cultivées sur lamelles en verre de 14 mm, dans des plaques de 6 puits et traitées pendant 24 h avec les différents traitements. A la fin de l'immunomarquage (comme décrit ci-dessus : réalisé selon la même procédure qu'en cytométrie en flux) les préparations sont lavées deux fois avec du PBS. 100 μ L d'une solution d'Hoechst 33342 (1mg/mL) sont ajoutées et les préparations sont ensuite incubées pendant 5 min à température ambiante. Les lames sont 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 au microscope à fluorescence Axioskop (Zeiss).

7. Caractérisation et analyse des acides organiques, des stérols et des acides gras par Chromatographie en phase gazeuse couplée en spectrométrie de masse

7.1. Extraction des acides organiques

Pour l'analyse des acides organiques, les homogénats cellulaires sont transmis dans des flacons à bouchon vissé en présence de standards internes (marqués au deutérium ou

structurellement homologues), de l'hydroxy toluène butylé (BHT) et de l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA). Les flacons sont scellés avec un septum teflon et leur contenu sont rincés avec l'argon pendant 20 min pour chasser l'air. Les hydrolyses alcalines sont ensuite incubées en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique (0,5 M), pendant 30 min à température ambiante (20°C) sous agitation magnétique (**Leoni et al., 2017**).

7.2. Extraction des acides gras

Les lipides totaux sont extraits selon la méthode de Folch (**Folch et al., 1957**).

A la fin du traitement, les culots cellulaires sont placés dans des tubes en verre en présence de diheptadecanoyl phosphatidylcholine (C17 :0) (1 mg /mL) utilisé comme standard interne. Ce composé est mélangé avec du chloroforme: méthanol (2V :1V), de BHT (50 mg/L) et de NaCl (150 mM). Les échantillons sont incubés pendant 30 min sous agitation puis centrifugés pendant 5 min à 2000 g. Ensuite, la phase organique inférieure est récupérée et évaporée à sec sous vide.

Pour l'analyse par CPG-SM, une étape de dérivation des AG doit être effectuée afin d'avoir des dérivés sous forme de pentafluorobenzyl esters (PFB). Pour cela, l'extrait sec est repris dans 100 µL d'acétonitrile, 5 µL de pentafluorobenzylebromide et 5 µL de diisopropylethylamine. Après agitation, le mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante. Les PFB formés sont extraits par l'ajout de 2 mL d'hexane dans 1 mL d'eau désionisée puis centrifugés à 1 000 g pendant 5min. A la fin de la centrifugation, la phase hexanique supérieure est récupérée puis évaporée sous vide. Ensuite l'extrait sec obtenu est repris dans 100 µL d'Hexane pour l'analyse.

7.3. Extraction des stérols

Les stérols sont recueillis par une extraction liquide-liquide en présence d'Hexane.

A la fin de l'hydrolyse alcaline, le pH est ajusté aux conditions acides avec l'ajout du HCl. Les métabolites sont ensuite extraits grâce à une extraction séquentielle liquide-liquide en présence de l'hexane et de l'acétate d'éthyle.

Les solvants organiques sont évaporés sous un léger courant d'argon. Ensuite, les extraits secs obtenus sont convertis en triméthylsilyl éthers par l'ajout d'un mélange de BSTFA (Bis (triméthylsilyl) trifluoroacetamide) et 1% de TMCS (Triméthylchlorsilane) (Pierce / Thermo Fisher Scientific). Après une incubation pendant 45 min à 80°C, la phase

organique est évaporée et l'extrait sec obtenu est ensuite repris dans 50 µL d'hexane pour être analysé par CPG-MS.

7.4. Analyse par CPG-MS

L'analyse par CPG-MS est réalisée sur un spectromètre Clarus 600D (Perkin Elmer, USA).

La séparation est faite sur une colonne Elite (film de 30 mx 0,32 mm di x 0,25 mm; Perkin Elmer, USA) et l'injection est réalisée en mode sans division en utilisant de l'hélium (1 mL / min) comme gaz vecteur. Le programme de température était comme suit: une température initiale de 80 °C est maintenue pendant 1 min, suivie d'une rampe linéaire de 10 °C / min à 220 °C, de 20 °C / min à 280 °C et de 5 °C / min à 290 °C qui est maintenue pendant 10 min. Le spectromètre de masse fonctionne en balayage de masse complet ou en mode de surveillance des ions sélectionnés. L'intégration maximale est réalisée manuellement et les métabolites sont quantifiés à partir du rapport entre les surfaces des pics correspondant aux ions sélectionnés pour les composés à doser et à celles des ions choisis pour les étalons internes en utilisant des courbes d'étalonnage réalisées dans les mêmes conditions d'analyse à partir de produits standards.

8. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**). C'est un dosage colorimétrique basé sur l'utilisation de bleu de coomassie qui se lie spécifiquement aux protéines (lorsqu'il est lié à la protéine la longueur d'onde d'absorbance maximale passe de 465 à 595 nm). Cette méthode est rapide (la fixation est complète après 5 min). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration protéique.

A la fin du traitement et après lyse cellulaire, 1 µL de lysat cellulaire est ajouté à 19 µL d'eau distillée et 980 µL du réactif de Bradford. Le mélange est ensuite incubé pendant 5 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, et l'absorbance est mesurée à 595 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution d'albumine bovine.

9. Evaluation du statut RedOx

9.1. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

9.1.1. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) est déterminée selon la méthode de Flohé et Günzler (**Flohé and Günzler, 1984**). À la fin du traitement, les cellules 158N sont

collectées par trypsinisation, subits trois cycles de congélation et de décongélation successive, puis lysées par sonication. Ensuite, les lysats cellulaires sont incubés avec 0,1 mM de glutathion réduit (GSH) en présence d'une solution saline tamponnée au phosphate (50 mM, pH 7,8). La réaction est initiée par addition de 50 µL de H₂O₂ et arrêtée par incubation du mélange avec de 250 µL d'acide trichloroacétique (TCA 1%) pendant 30 min à 4 ° C, puis centrifugée à 1000 g pendant 10 min. L'absorbance est lue par spectrophotométrie à 412 nm (spectrophotomètre Lambda 25, Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France). L'activité de la GPx est exprimée en µmol de GSH/min/mg de protéines.

Le dosage de protéine est effectué selon la méthode de Bradford.

$$\text{Activité du GSH consommé /min/mg de protéines} = \frac{0.04 * (\text{DOE} - \text{DOB}) * 5 * 1000}{\text{DOB} * 10 * X}$$

Avec :

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

DOB : Densité optique du Blanc

DOE : Densité optique de l'échantillon

9.1.2. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la superoxyde dismutase cellulaire (SOD) est mesurée selon la méthode de **Beauchamp & Fridovich (Beauchamp and Fridovich, 1971)**. Cette méthode repose sur la capacité de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) de réduire le Nitro Bleu de Tétrazolium (NBT). En aérobie, le mélange Riboflavine, L-méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre. Cependant, en présence de la SOD, l'oxydation du NBT est inhibée d'où l'atténuation de la coloration bleue. Les lysats cellulaires sont mis en présence d'un tampon phosphate (50 mM pH 7,8), d'EDTA (0,1 mM), de la L-méthionine (13 mM), de la riboflavine (2 µM) et du NBT (75 mM). Le mélange est ensuite exposé à un faisceau de lumière blanche pendant 20 min. l'activité de la SOD est mesurée à 560 nm. L'unité d'activité est exprimée comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50 % la réduction du NBT.

La mesure de l'activité spécifique de la SOD : **Y/50 (unités SOD/ mg de protéine)**

$$\text{Avec } Y = [(\text{DOB} - \text{DOE}) / \text{DOB}] * 100 * 20 * 5$$

X : la concentration des protéines totales

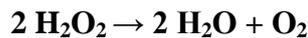
DOB : Densité optique du Blanc

DOE : Densité optique de l'échantillon

9.1.3. Mesure de l'activité Catalase

L'activité de la catalase (CAT) est déterminée en mesurant la consommation de H₂O₂ à 240 nm. À la fin du traitement, les cellules sont collectées par trypsination et incubées avec du tampon RIPA en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, États-Unis) pendant 30 minutes dans la glace. Les lysats cellulaires sont recueillis après centrifugation (12 000 g, 20 min, +4 ° C). La réaction est initiée par l'addition de Tris-HCl (1 M, pH 7,4), H₂O₂ (400 mM) et de milliQ H₂O (1: 1: 17). La consommation de H₂O₂ est mesurée pendant 2 min à 240 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Tecan Infinite M200 Pro).

La catalase assure l'hydrolyse du peroxyde par selon la réaction suivante :



L'activité de la catalase a été exprimée en **µmol de H₂O₂/min/mg de protéines**

$$\text{Activité de la catalase} = \frac{\Delta \text{DO} \cdot \text{dilution de l'échantillon au début} \cdot L}{\varepsilon (\text{H}_2\text{O}_2) \cdot 0.02 \cdot X}$$

Avec :

$\Delta \text{DO}_{240\text{nm}}$: La différence de la DO entre deux temps pour lesquels la chute de la DO est exponentielle

$$\varepsilon (\text{H}_2\text{O}_2) = 43,2 \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

L=longueur de la cuve =1 cm

X= concentration en protéine par mg /L

9.1.4. Mesure de groupement thiol

Les groupements thiol (SH) jouent un rôle puissant dans la protection contre les radicaux libres. Les taux du groupement SH sont mesurés comme décrit par Faure et Lafon (**Faure and Lafond, 1995**).

A la fin du traitement, une extraction des protéines est réalisée. Les lysats cellulaires sont mélangés avec du 5-5'Di Thiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) puis incubés pendant

15 min dans le noir à température ambiante. L'absorbance de mélange réactionnel est mesurée à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre Lambda 25 (Perkin Elmer).

Les concentrations de groupement thiols sont exprimées en nmol/mg de protéines.

9.2. Mesure de la production des espèces réactives oxygénées

9.2.1. Evaluation de la production d'anions superoxydes intracellulaires par cytométrie en flux

La surproduction de ROS, principalement d' $O_2^{\bullet-}$, est quantifiée par cytométrie en flux après coloration au dihydroéthidium (DHE; Thermo Fisher Scientific). Le DHE est une sonde non fluorescente capable de se diffuser à travers la membrane plasmique et qui est rapidement oxydée, par les anions $O_2^{\bullet-}$, en éthidium fluorescent. Ce dernier se fixe de façon covalante au niveau des bases de l'ADN et émet une fluorescence orange : rouge ($\lambda_{Ex} \max = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} \max = 575 \text{ nm}$) en réponse à une excitation bleue (488 nm) (Rothe and Valet, 1990) (Figure 12).

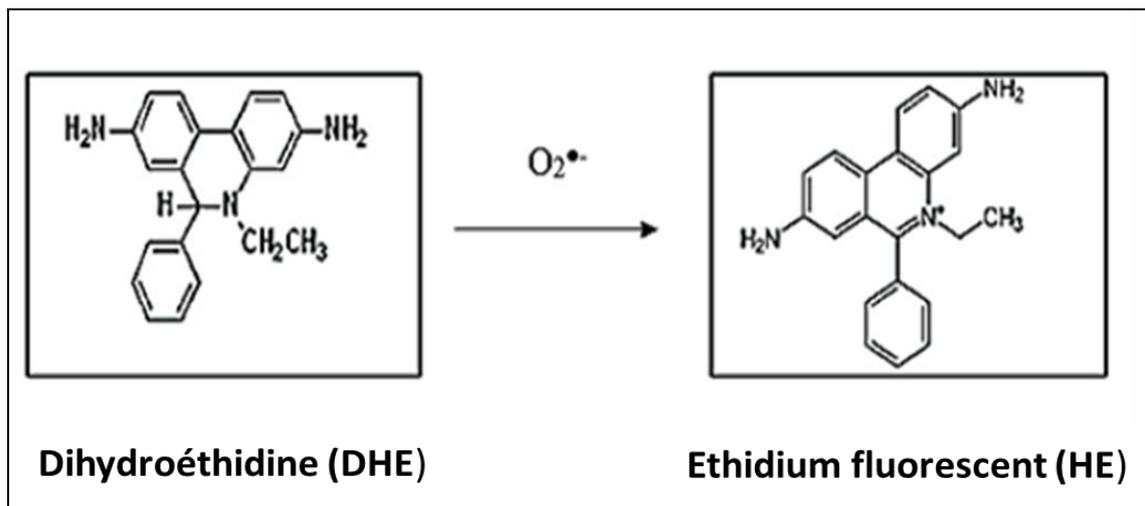


Figure 12 : Schéma d'oxydation de DHE en HE sous l'action d' $O_2^{\bullet-}$

(Rothe and Valet, 1990)

La solution mère de DHE est préparée dans du DMSO à une concentration de 1,6 mM et est utilisée sur les cellules à une concentration finale de 2 μ M.

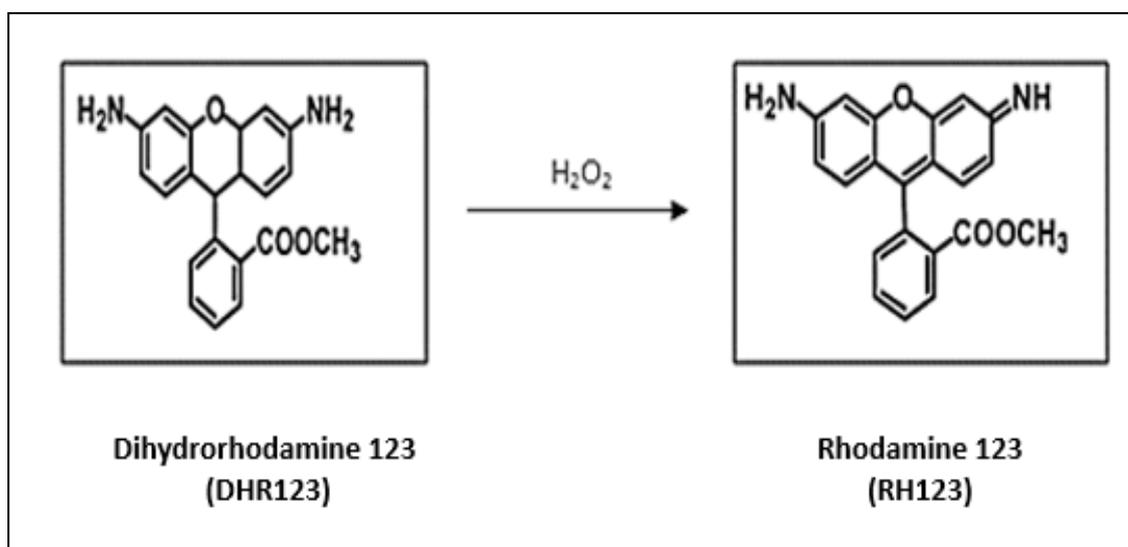
Après 24h de traitement, les cellules cultivées en absence ou en présence du 7 β -OHC (50 μ M) associées ou non au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 10 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M) sont collectées par trypsination, et mises en suspension avec 1mL de PBS contenant 2 μ M de DHE. Après 15 min d'incubation à 37°C, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (Galaxy, Partec) et la fluorescence orange (fluorescence

de l'éthidium) est quantifiée par un filtre bande-passe 590 ± 20 nm en prenant en compte 10 000 cellules par échantillon. Les données sont ensuite analysées avec un logiciel FlowJo (Tree Star Inc.).

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

La production intracellulaire de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est évaluée avec un fluorochrome lipophile; le dihydrorhodamine 123 (DHR123) qui en présence de H_2O_2 s'oxyde en Rhodamine 123 (RH123) qui est un composé cationique fortement fluorescent (λ_{Ex} max = 505 nm; λ_{Em} max = 529 nm) (Rothe and Valet, 1990) (Figure 13).

A la fin du traitement, les cellules sont récupérées et mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution mère de DHR123 (Sigma-Aldrich) est préparée dans le DMSO à 2 mM et utilisée à 6 μ M sur les cellules. Après 15 min d'incubation à 37°C, les cellules sont analysées par cytométrie en flux Galaxy (Partec). Le signal fluorescent vert est collecté par un filtre passe-bande à 520 ± 20 nm, en prenant en compte 10 000 cellules par échantillon. Les données sont ensuite analysées avec le logiciel FlowJo.



**Figure 13: Schéma d'oxydation de DHR123 en RH123 en présence de H_2O_2
(Richardson et al., 1998)**

9.3. Dosage des marqueurs de la peroxydation lipidique

9.3.1. Dosage des diènes conjugués

Les diènes conjugués sont considérés comme des produits primaires de peroxydation lipidique. Ce sont des hydrocarbures qui possèdent deux doubles liaisons séparées par une simple liaison, qui se forment lors du réarrangement des doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) suite à l'abstraction radicalaire d'un hydrogène malonique, caractérisées par une absorption dans l'ultraviolet à 234 nm. Le dosage des diènes conjugués est déterminé selon la méthode Esterbauer et al (**Esterbauer et al., 1989**).

À la fin du traitement, les cellules sont lysées par sonication et centrifugées (20 000 g, 30 min à 4 ° C). Les diènes conjugués sont extraits avec un mélange chloroforme/ méthanol (2v :1v) en présence de NaCl 0,9%. Après centrifugation à 1000 g pendant 10 min, la phase chloroformique inférieure est récupérée dans un tube à hémolyse en verre et évaporisée sous flux d'azote. Les extraits secs sont ensuite dissous dans 1 mL d'hexane et les DO ont été lus à 243 nm. Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mol/L}$ et calculées selon la formule ci-dessous :

$$\text{DC } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\text{DO} * 10^3}{2.8}$$

9.3.2. Dosage des malondialdhydes

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit terminal de la peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des ERO. C'est un agent alkylant capable de réagir avec les macromolécules biologiques (**Pellerin-Massicotte, 1994**).

Le dosage de MDA est déterminé selon la méthode de Yoshioka et al (**Yoshioka et al., 1979**). Cette méthode repose sur la formation en milieu acide et chaud entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment rose absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

A la fin du traitement, une extraction des protéines est réalisée. Les lysats cellulaires ont été précipités en présence d'acide trichloroacétique (TCA, 20%). L'acide thiobarbiturique (TBA, 0,67%) est ensuite ajouté et le mélange est incubé pendant 30 min à 95 ° C. Par la suite, 4 ml de n-butanol sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 900 g pendant 10 min. L'absorbance (la densité optique (DO)) est lue par spectrophotométrie à 530 nm.

Les concentrations totales de MDA sont exprimées en nmol / mg de protéine en utilisant la loi de Beer Lambert: $DO = \epsilon * C * L$

$$[\text{Concentration de MDA}] = DO / \epsilon (\text{MDA}) * L$$

Avec :

L= longueur de la cuve =1 cm

$\epsilon (\text{MDA})=1.56.10^{-5} \text{mM}^{-1} . \text{cm}^{-1}$

9.4. Dosage des produits d'oxydation de protéines : protéines carbonylées

Les protéines carbonylées sont des produits d'oxydation des protéines, qui sont formées suite à l'attaque des résidus d'acides aminés, en particulier les histidines, les prolines, les arginines et les lysines, par des ERO (Castegna *et al.*, 2003).

Le dosage des protéines carbonylées est réalisé selon la méthode d'Oliver *et al.* (Oliver *et al.*, 1987). Cette méthode repose sur la formation des hydrazones suite à la réaction des protéines carbonylées avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH).

Les lysats cellulaires sont incubés avec de la DNPH (10 mM) dissous dans du HCl (2,5 N) à l'obscurité pendant 1 heure, sous agitation toutes les 15 minutes. 20% d'acide trichloroacétique (TCA) est ajouté. Ensuite, le mélange a été incubé pendant 10 min. dans la glace puis centrifugé pendant 5 min à 1800 g. A la fin de la centrifugation le surnageant est éliminé et le culot protéique est lavé deux fois avec du TCA (10%) et d'éthanol-acétate d'éthyle (1v/1v) puis incubé avec une solution de chlorhydrate de guanidine (6 M) pendant 10 min à 37 ° C. Les DO sont lus à 370 nm en utilisant un spectrophotomètre Lambda 25 (Perkin Elmer).

10. Evaluation et caractérisation de la mort cellulaire

10.1. Numération cellulaire avec de bleu trypan

Le bleu trypan est un réactif chromophore de couleur bleu, permet de distinguer les cellules vivantes et les cellules mortes. Ce colorant a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre mais il colore en bleu que le cytoplasme des cellules mortes. Les cellules vivantes expulsent la molécule de bleu de trypan (mécanisme nécessite de l'énergie dont les cellules vivantes peuvent y fournir) et restent réfringentes au microscope. A la fin du traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes sont récupérées par trypsination et centrifugées (300 g, 5 min). Le culot est resuspendu dans 1 mL de milieu de culture. Ensuite 25 μL de suspension cellulaire sont mis en présence de 25 μL de la solution de

bleu trypan. Le nombre de cellules viables et/ou des cellules mortes est déterminé par comptage au microscope à contraste de phase.

10.2. Identification de la viabilité cellulaire par coloration à la fluorescéine di-acétate

La viabilité cellulaire et/ou la perméabilité cellulaire est évalué avec un fluorochrome lipophile; la fluorescéine di-acétate (FDA); qui en présence des estérases intracellulaires, se transforme en métabolite fluorescent vert « fluorescéine » (Ex_{max} : 485 nm, Em_{max} : 528 nm) (**Figure 14**). La FDA n'est retenue que par les cellules vivantes (**Jones and Senft, 1985; Al-Rubeai et al., 1993**).

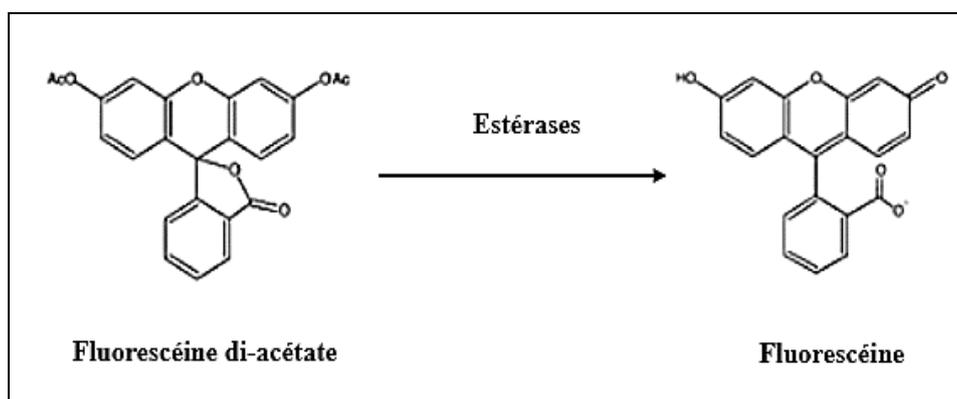


Figure 14 : Schéma d'hydrolyse de fluorescéine par des estérases

Après 24 H de traitement des cellules 158N en absence ou en présence du 7β -OHC (50 μ M) associées ou non au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 10 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M). Les cellules adhérentes ont été incubées avec 1 mL de la solution FDA (50 μ M) pendant 5 min à 37 °C. La solution FDA est ensuite éliminée et les cellules sont lysées en présence de 1mL de Tris-HCl (10 mM) contenant 1% de dodécyl sulfate de sodium (SDS). L'intensité de la fluorescence est mesurée avec un lecteur de microplaques à fluorescence, TECAN (TecanInfinite M200 Pro, Lyon, France). La viabilité cellulaire est exprimée par rapport à celle des cellules contrôles.

10.3. Evaluation de la perméabilité cellulaire et de la mort cellulaire par coloration à l'iodure de propidium

La perméabilité cellulaire peut être quantifiée par évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique par coloration à l'iodure de propidium (IP). Ce dernier est un agent fluorescent qui s'intercale les acides nucléiques (ADN et ARN) des cellules qui ont perdu leurs intégrités membranaires, considérées comme cellules mortes (**Yeh et al., 1981; Lizard et**

al., 1995). L'IP s'excite à 305 et 538 nm et il émet une fluorescence orange/rouge avec un maximum d'émission à 617 nm. Cette molécule hydrophile est utilisée pour quantifier la viabilité cellulaire et/ou d'évaluer la mort cellulaire.

La solution mère d'IP est préparée dans de l'eau milliQ à une concentration de 1 mg/mL et stockée à +4°C à l'abri de la lumière.

Après 24 H de traitement en absence ou en présence du 7β-OHC (50 μM) associé ou non au DMF (25 μM), au MMF (25 μM), à la biotine (10 et 10 nM) ou à l'α-tocophérol (400 μM), les cellules adhérentes et non adhérentes sont collectées par trypsination et reprises dans une solution d'IP à 1 μg/mL dans le PBS. Après 15 min d'incubation à 37 °C, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. La fluorescence de l'IP est quantifiée par un filtre passe-bande 590 ± 10 nm, en prenant en compte 10 000 cellules par condition. Les données sont ensuite analysées à l'aide d'un logiciel Flowjo (Tree Star Inc.).

10.4. Dosage de l'activité de lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique, qui catalyse la conversion réversible du pyruvate en lactate.

Le dosage de la LDH permet d'évaluer l'intégrité membranaire et/ou la mort cellulaire. En effet, les cellules dont la membrane est endommagée (perméabilisée ou lysée), libèrent rapidement leur contenu cytosolique, notamment la LDH, dans le milieu extracellulaire. De ce fait la quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle au nombre de cellules avec membrane plasmique altérée.

De plus, la mesure de l'activité de la LDH permet d'évaluer la mort cellulaire nécrotique, qui est caractérisée par une rupture précoce de la membrane plasmique, en particulier la nécrose secondaire (nécrose faisant suite à une apoptose), ce qui fait de cette enzyme un bon marqueur de mort cellulaire. L'activité de la LDH est quantifiée à l'aide d'un kit LDH (# ab102526, Abcam, Paris, France) selon le principe ci-dessous (**Figure 15**).

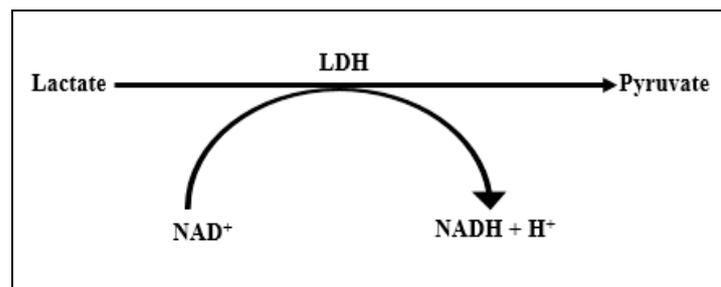


Figure 15: Principe de dosage de la LDH

La mesure de l'activité de la LDH est effectuée suite à un dosage enzymatique colorimétrique. La LDH catalyse la réduction de la NAD^+ en NADH et H^+ , lors de la réduction du lactate en pyruvate. La quantité de NADH produit est proportionnelle à la quantité de la LDH libérée dans le milieu de culture.

Les cellules 158N sont traitées en présence ou en absence du $7\beta\text{-OHC}$ ($50 \mu\text{M}$) associées ou non au DMF ($25\mu\text{M}$), au MMF ($25\mu\text{M}$), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol ($400 \mu\text{M}$). A la fin du traitement, le milieu de culture est récupéré dans des nouveaux tubes à eppendorf, puis centrifugé pour éliminer les débris cellulaires (300 g, 5min). $48\mu\text{L}$ de milieu de culture sont mis en présence de $2 \mu\text{L}$ du tampon LDH et $50 \mu\text{L}$ de mixte contenant le substrat de LDH (diluée 25x dans le tampon LDH).

L'absorbance est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques (TECAN Infinite M200 Pro) à 450 nm selon un mode cinétique toute les 3 min durant 60 min à 37°C et à l'abri de la lumière.

$$\text{L'activité de la LDH (U/ml)} = (\text{B}/\Delta\text{T} * \text{V}) * \text{D}$$

B= Quantité de NADH dans chaque puit (calculé à partir de la courbe standard)

ΔT = Temp de réaction ($\text{T}_2\text{-T}_1$) (min)

V = Volume de chaque échantillon

D = Facteur de dilution de l'échantillon

10.5. Quantification des cellules apoptotiques par coloration au Hoechst 33342 et avec du Giemsa

10.5.1. Morphologie des noyaux après coloration au Hoechst 33342

L'analyse de la morphologie des noyaux cellulaires permet de distinguer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques et normales. En effet, la coloration avec le Hoechst 33342 est utilisée pour distinguer entre la mort cellulaire par apoptose ou nécrose et pour identifier les cellules apoptotiques caractérisées par des noyaux condensés ou fragmentés (**Lizard et al., 1995**).

L'Hoechst 33342 est capable de franchir la membrane plasmique. Ce fluochrome permet la coloration de l'ADN ($\lambda_{\text{Ex max}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{E max}} = 461 \text{ nm}$) et est spécifique des paires de bases (A-T) (**Sandhu et al., 1985**). Après 24 h du traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes sont collectées par trypsination, centrifugées ($300\text{g} \times 5\text{min}$) et fixées avec du

paraformaldéhyde (PFA 2 %) pendant 20 min à +4 °C. Après lavage, les cellules sont incubées avec 2 µL d'une solution Hoechst 33342 (1 µg/mL) pendant 5 min à température ambiante. 100 µL de suspension cellulaire (environ 40 000 cellules) sont déposés sur une lame de microscope par cyto centrifugation (5 min, 1 500 tr / min) avec une cytospin 2 (Shandon, Sheshire, Royaume-Uni). Le montage entre lame et lamelle est effectué avec du « mounting fluorescent medium » (DAKO). Les lames peuvent être stockées + 4°C jusqu'à l'observation. La morphologie nucléaire est observée avec un microscope à fluorescence (Axioskop fluorescent, Zeiss). 300 cellules sont comptées par lame pour déterminer le pourcentage des cellules apoptotiques.

10.5.2. Morphologie des noyaux après coloration à la Giemsa

La coloration de Giemsa est aussi utilisée pour quantifier les noyaux apoptotiques. Elle colore les noyaux cellulaires en bleu et les cytoplasmes en rose.

Comme l'Hoechst 33342, environ 40 000 cellules sont déposées sur lames par cyto centrifugation (5 min, 1 500 tr / min), puis fixées avec du méthanol pendant 5 min. Les lames sont ensuite incubées avec la coloration de Giemsa pendant 6 min à température ambiante. Les préparations sont lavées, séchées puis montées entre lames et lamelle avec le liquide de montage Dako (Dako, Copenhague, Danemark) ensuite stockées à + 4°C jusqu'à l'observation. Le pourcentage des cellules avec noyaux apoptotiques est déterminé par comptage de 300 cellules par lame.

10.6. Caractérisation de 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. 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 étude, la MET est utilisée pour visualiser les modifications ultrastructurales (mitochondriales et peroxysomales) sur des cellules 158N traitées en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM), associées ou non au DMF (25 µM) ou au MMF (25µM). Pour cela, les échantillons sont fixés pendant 1 h à 4°C avec le glutaraldéhyde 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. Après lavage avec le tampon

cacodylate, les préparations sont déshydratées par des bains en gradients d'éthanol croissants, puis inclus dans l'Epon. Des coupes ultrafines sont réalisées avec un ultramicrotome, ensuite colorées avec une solution aqueuse alcoolisée d'acétate d'uranyle, puis avec du citrate de plomb aqueux. Les préparations sont ensuite examinées au microscope électronique H7500 (Hitachi).

10.7. Evaluation de l'intégrité lysosomale par coloration à l'acridine orange

L'acridine orange (AO) est un fluorochrome lipophile et cationique capable de traverser la membrane des lysosomes. C'est un composé métachromatique qui produit une fluorescence verte en milieu basique et une fluorescence orange en milieu acide sous excitation bleu à 488 nm.

L'AO est une sonde lysosomotropique, utilisée pour évaluer la fonctionnalité des pompes à protons ainsi que l'intégrité lysosomales (**Yuan et al., 2000**).

En présence d'AO, les lysosomes sont colorés en orange. Cependant, lorsque les lysosomes perdent leurs intégrités membranaires (perméabilité de la membrane lysosomale) et que la pompe à proton se déstabilise, le pH augmente et la fluorescence orange diminue et décale vers le vert. La quantité de fluorescence orange sera donc inversement proportionnelle au pourcentage des cellules avec lysosomes déstabilisés (lysosomes ayant perdus leur intégrité membranaire).

A la fin du traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes sont récupérées et incubées avec de l'AO (5 µg/mL) ($\lambda_{\text{Ex max}} = 502 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em max}} = 525 \text{ nm}$) pendant 15 min à 37°C, puis analysées par cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence orange de l'OA est recueillie grâce à un filtre passe-bande à 590/20 nm. 10 000 cellules sont prises en compte sur une échelle logarithmique. Les données sont analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star Inc.).

11. Quantification de l'expression protéique par Western blot

11.1. Préparation des extraits cellulaires et dosage des protéines

Les extraits cellulaires ont été préparés après 24 h du traitement en présence ou en absence du 7 β -OHC (50 µM), associés ou non au DMF (25µM), au MMF (25µM), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 µM) dans des boîtes de Pétri (100 x 20 mm). A la fin du traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes sont collectées par trypsination, lavées avec du PBS 1X puis centrifugées à 300g x 5min. La lyse cellulaire et l'extraction

des protéines sont réalisées avec un tampon de lyse RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, sodium déoxycholate 0,5 %, NP40 1 %, EDTA 2 mM, NaF 50 mM, pH 8) en présence du cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics). Après 30 min d'incubation dans la glace, une centrifugation est réalisée à 20 000 g pendant 20 min à +4°C pour éliminer les débris cellulaires non lysés. Les surnageants contenant les protéines sont récupérés dans des nouveaux tubes et peuvent ensuite être stockés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

La concentration des protéines totales est dosée grâce à un kit BCA (kit BCA, Interchim) constitué d'acide bicinchoninique (BCA) et d'ions cuivriques en milieu alcalin. Les ions cuivreux (générés par réduction des liaisons peptidiques) forment avec le BCA un complexe stable coloré en bleu. Le dosage est réalisé en microplaques comme suit : un volume de 1.25 µL de lysat cellulaire (extrait protéique) est mis en présence de 200 µL du mélange BCA et d'ion cuivreux (50 :1) et 23,75 µL eau. Après 30 min d'incubation à 37 °C, l'intensité de la coloration est mesurée à 570 nm. Les concentrations protéiques des échantillons sont calculées à partir d'une gamme d'étalonnage d'albumine sérique bovine (BSA).

11.2. Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés avec du tampon de charge 4x (20 mL de tampon 4x contient 8 mL de glycérol, 4 mL de β-mercaptoéthanol, 2 g de SDS, 5 mL de Tris 1 M pH 6,8, quelques cristaux de bleu de bromophénol, qsp 20 mL), un volume de lysat cellulaire contenant les protéines, sachant qu'il faut déposer la même quantité de protéine dans chaque puit et un volume d'eau ultra pure pour ajuster tous les tubes au même volume final. Les échantillons peuvent être congelés à -20 °C à cette étape.

11.3. Séparation des protéines par SDS-PAGE : Préparation des gels SDS-PAGE

La séparation des protéines par SDS-PAGE est réalisée avec le système « Protein Electrophoresis Classroom Lab Set 2 » (Biorad). Ce type d'électrophorèse permet de séparer les protéines chargées négativement par le SDS et soumises à un champ électrique, selon leurs masses moléculaires.

Un premier gel de séparation est coulé entre deux plaques de verre. Le pourcentage en acrylamide est choisi en fonction de la taille de la protéine à détecter. Ce gel permet de séparer les protéines sous un champ électrique en fonction de leur masse moléculaire. 100 µL d'isopropanol est ajouté pour éliminer les bulles d'air et pour que la surface soit

régulière. Une fois que le gel est polymérisé, l'isopropanol est éliminé et la surface du gel est rincée avec l'eau distillée.

Un second gel, appelé gel de concentration, coulé par-dessus le premier permet aux protéines de migrer en même temps jusqu'au gel de séparation. Ainsi, on peut obtenir des bandes fines au moment de la révélation. Un peigne est disposé dans le gel de concentration avant qu'il se polymérise afin de former les puits (où les échantillons seront déposés).

Tableau 1: Composition des différents types de gel d'acrylamide

Solutions mères	Pour 2 gels de séparation 8% (Vf= 15mL)	Pour 2 gels de séparation 10% (Vf= 15mL)	Pour 2 gels de séparation 12% (Vf= 15mL)	Pour 2 gels de séparation 14% (Vf= 15mL)	Pour 2 gels de concentration 4% (Vf= 15mL)
Eau ultrapure	8,15 mL	7,5 mL	6,75 mL	6 mL	7,7 mL
Tris Base 1,5M, SDS 0,4%, pH 8,8	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	-
Tris Base 0,5M, SDS 0,4%, pH 6,8	-	-	-	-	3 mL
Acrylamide/Bisacrylamide 40%	3 mL	3,75 mL	4,5 mL	5,25 mL	1,2 mL
Persulfate d'amonium 10%	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL	100 µL
TEMED	18 µL	18 µL	18 µL	18 µL	20 µL

11.4. Migration des protéines

Une fois que le gel de séparation est polymérisé, le peigne est retiré et le gel est placé dans une cuve en présence du tampon de migration (Tris base 25 mM, SDS 0,1 %, glycine 190 mM, pH entre 8,3 et 8,8). Un marqueur de poids moléculaire est déposé dans le premier puit (Precision Plus Protein. Standards, Biorad), ensuite les échantillons de protéines. La migration dans le gel de concentration est réalisée grâce au système Mini Trans-Blot Cell (Biorad) à 50 V, le voltage sera ensuite augmenté à 120 V pour le gel de séparation. La migration sera arrêtée dès que la coloration bleue arrive au fond du gel.

11.5. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Nitrocell mbrane-0,45 μ M, Fisher scientific). Le transfert de protéines est réalisé avec le système Mini Trans-Blot Cell (Biorad).

Le montage est composé d'un sandwich comprenant : un scotch britt du côté de la borne négative, deux feuilles de papier Whatman (imprégnés dans du tampon du transfert), le gel d'acrylamide (contenant les protéines), une membrane de nitrocellulose, deux feuilles de papier Whatman (imprégnés dans du tampon du transfert) et un scotch britt. Il est important d'exercer une légère pression par un rouleau sur les différents compartiments du sandwich (papiers de Whatman, gel d'acrylamide et membrane de nitrocellulose) afin de chasser les bulles d'air dans le montage et pour bien positionner le gel et la membrane.

Le montage est ensuite placé dans la cuve de transfert remplie de tampon de transfert (Tris base 50 mM, acide borique 50 mM). Le transfert s'effectue à 50V pendant 35 min à 1h min (selon la taille de la protéine d'intérêt) sous agitation à froid.

11.6. Détection et révélation des protéines

A la fin du transfert, la membrane est récupérée du montage et disposée dans une boîte en présence d'une solution de saturation qui est constituée du PBST (PBS-0,1 % tween 20) et de 5 % de lait écrimé puis incubée pendant une heure à température ambiante sous agitation, afin de saturer les sites non spécifiques de la membrane pour éviter toute adhésion non spécifique des anticorps au niveau des sites de liaisons non occupés par les protéines transférées. La membrane est ensuite lavée avec la solution de PBST 3 fois pendant 5 min.

Pour l'analyse de l'apoptose et de l'autophagie, les anticorps utilisés sont dirigés contre la caspase-3 (Ozyme / Cell Signaling (#9662) (pour la détection du niveau endogène de caspase-3 de longueur totale (35 kDa) et de son grand produit de clivage (17 kDa)) et LC3-I / II (#L8918, Sigma Aldrich) (déTECTANT LC3-I (18 kDa) et LC3-II (16 kDa)), respectivement. Ce sont des anticorps polyclonaux de lapin; ils sont utilisés à une dilution finale de 1/1000.

Pour l'analyse des protéines de myéline (protéine protéolipidique (PLP); protéine basique de la myéline (MBP)), l'expression de la PLP est déterminée à l'aide d'un anticorps

polyclonal de lapin (PLP; Novus, NB10074503) et l'expression de la MBP est déterminé avec un anticorps monoclonal de souris (MBP; Millipore, MAB381). Un anticorps dirigé contre la β -actine (anticorps monoclonal de souris (# A2228, Sigma Aldrich)) est utilisé à une concentration finale de 1/10 000.

Une incubation avec les anticorps primaires (préparés dans une solution de PBST+ 5% lait) est réalisée pendant une nuit à 4°C. A la fin d'incubation 3 lavages successifs de 5 min sont effectués en présence de PBST. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 heure à la température ambiante avec un anti-lapin de chèvre conjugué à la peroxydase de raifort (pour la caspase-3, LC3-I / -II, et PLP) dilués au 1/5 000 dans du PBST+1% lait, ou un anticorps anti-souris dérivé contre la MBP ou la β -actine, diluées au 1/5 000 dans du PBST+1 % lait. Après trois série de lavages de 5 min avec du PBST, les membranes sont ensuite révélées en utilisant le kit Supersignal West Femto Maximum Sensitivity substrate (Fisher Scientific) et Chemidoc XRS+ (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) et l'analyse de la densitométrie des bandes obtenues est effectuée par le logiciel Image Lab (BioRad).

Une incubation avec les anticorps primaires (préparés dans une solution de PBST+ 5% lait) est réalisée pendant une nuit à 4°C. A la fin d'incubation, 3 lavages successifs de 5 min sont effectués en présence de PBST, puis les membranes sont incubées pendant une heure en présence de l'anticorps secondaire couplé à la Horse Raddish Peroxidase (HRP) (dilué dans du PBST+1% lait). Après lavage, la membrane est révélée en utilisant le kit de chimioluminescence (Super signal West Femto Maximum Sensitivity substrate (Fisher Scientific)) et le signal est enregistré avec l'appareil Chemidoc XRS+ (Bio-Rad). L'analyse de la densitométrie des bandes obtenues est effectuée par le logiciel Image Lab (BioRad).

12. Analyse par RTq PCR

12.1. Extraction des ARN

L'extraction des ARN est réalisée avec un kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Après 24 h de traitement, les cellules 158N sont récupérées par trypsination, centrifugées et lavées avec du PBS. Environ 600 μ L de tampon de lyse (buffer RLT) à 1% du β -mercaptoéthanol sont ajoutés sur le culot cellulaire (adapté en fonction de la taille du culot cellulaire), permettant la lyse des cellules et l'inactivation des RNases. Les lysats cellulaires sont transférés sur une colonne dans un tube de 2 mL, puis centrifugé pendant 30 s à 8 000 g. Un volume d'éthanol 100% est ajouté et les lysats cellulaires sont transférés sur une colonne RNeasy spin. Après une centrifugation de 15 s à 8 000 g, deux lavages sont effectués avec le

tampon RW1 (RNA Wash Buffer 1) et le tampon RPE (RNA Buffer Ethanol) respectivement. Les colonnes sont ensuite centrifugées à une vitesse maximale pendant 1 min, afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Les ARN totaux sont enfin élués par centrifugation à 8000 g pendant 1 min dans 30 µL d'eau ultra pure (DNase et RNase free)

12.2. Dosage des ARN

Le dosage des ARN est effectué grâce à un spectrophotomètre (UV-1800, Shimadzu).

3 µL de chaque échantillon sont placés sur le dispositif TrayCell (Hellma). Les concentrations sont lues à 260 et 280 nm. Le rapport DO 260 nm / DO 280 nm doit être entre 1,8 et 2,2. Ce rapport nous permet de déterminer la pureté des ARN (si les échantillons sont contaminés par des protéines). Les ARN totaux sont ensuite stockés à -80°C.

12.3. RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction

Afin de pouvoir quantifier les ARN, ces derniers doivent être rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc), par l'action d'une polymérase appelée Reverse Transcriptase.

La Reverse Transcription (RT-PCR) a été effectuée à l'aide d'un Kit « i Script CDNA Synthesis » (Biorad), dans un thermocycleur « Perkin Elmer ».

Tout d'abord, les ARN totaux sont ajustés à une concentration de 1 µg/µL. Ces derniers sont dilués dans 30 µL d'eau ultra-pure afin d'avoir une concentration d'ARN équivalente pour chaque échantillon égale à 0,2 µg/µL. Ensuite, 1 µL d'enzyme 'Reverse Transcriptase', 4 µL de tampon RT, et 10 µL d'eau ultra-pure sont ajoutés dans chaque tube. Après 5 min d'incubation à température ambiante, les échantillons sont placés dans le thermocycleur. Une étape d'élongation du brin d'ADNc est effectuée à 42°C pendant 40 min, suivie d'une étape de dénaturation des brins néosynthétisés pendant 5 min à 85°C. Les échantillons sont ensuite maintenus à + 4°C afin de stopper la réaction et de conserver les ADNc. Ces derniers sont stockés à -20°C.

12.4. Quantitative Polymerase Chain Reaction : qPCR

La PCR quantitative (qPCR) appelée aussi PCR en temps réel est une réaction PCR classique qui a pour but de quantifier le niveau d'expression d'un gène donné en amplifiant les ADNc (issus d'une reverse transcriptase).

Les échantillons obtenus de la RT (ADNc) (20 µL) sont tous dilués en ajoutant 80 µL d'eau. Un volume de 25 µL de chaque échantillon est alors ajouté dans un même tube, qui sert à réaliser une gamme standard. Ensuite, 225 µL d'eau sont ajoutés au 75 µL restants de chaque échantillon afin d'obtenir un volume de 300 µL.

La qPCR est effectuée à l'aide d'un kit « IQ SYBR green Supermix » (Biorad) dans un thermocycleur iCycler IQ (Biorad). Le fluorophore utilisé est celui de SYBR green. C'est un agent intercalant les acides nucléiques doubles brins qui est capable d'émettre une fluorescence verte lorsqu'il est excité par les UV. En effet, la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité du fluorophore (SYBR green fixé), et donc à la quantité d'ADN dans l'échantillon.

La technique de la qPCR a été réalisée en plaques 96 puits dans laquelle 10 µL de mix de qPCR et 5 µL d'ADNc dilué sont introduits, la dilution pouvant aller de 1/10^{ème} à 1/100^{ème} 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 MgCl₂, auxquels on a ajouté des amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt à une concentration de 300 nM au final pour chaque gène à étudié, et de l'eau ultra-pure.

Dans notre étude, le gène de 36B4, qui est une protéine ribosomale, est choisi comme gène de référence. L'expression de ce gène n'est pas modifiée par les différents traitements appliqués sur les cellules 158N.

Les séquences des différentes amorces utilisées pour la qPCR sont résumées dans le **Tableau2**. Les amorces permettent d'obtenir des amplicons d'une taille entre 100 et 200 paires de bases.

La plaque de 96 puits est ensuite centrifugée pendant 1 min à 1 000 rpm puis mis dans l'iCycler « StepOne Plus de (Life Science Technologies) ». Le programme utilisé comprend trois étapes : une première étape de 30 s à 25°C, une seconde étape d'activation de l'enzyme qui se fait pendant 2 min à 95°C, et une troisième étape comprenant 3 phases répétées sur 40 cycles: une phase de dénaturation des acides nucléiques (30 s à 94°C), une phase d'hybridation avec les amorces (30 s à 60°C) et une phase d'élongation (30 s à 72°C).

La fluorescence est mesurée à chaque fin de phase d'élongation. La courbe de fluorescence comprenant donc trois phases : **une phase d'initiation** correspond au bruit de fond ou la

quantité de produit de PCR est trop faible pour être mesurée, **une phase exponentielle** durant laquelle le nombre de produit de PCR, est doublé à chaque cycle, et **une phase de plateau** où la fluorescence obtenue 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. Ceci permet d'établir une courbe de fusion. En effet, chaque produit de PCR est caractérisé par une température de fusion ou TM (Melting Temperature) correspondant à la température à laquelle la moitié du produit est hybridé sous forme de double-brin. Plus la température augmente, plus l'hybridation est spécifique et donc le nombre de molécules sous forme double-brin diminue. Cependant, lorsque la température est trop élevée, toutes les molécules sont dénaturées et il n'ya plus de double brin : la fluorescence est donc minimum.

Tableau 2 : Séquences des différentes amorces utilisées pour les qPCR

Gène	Amorces sens	Amorces anti -sens
36B4	5'-CGACCTGGAAGTCCAACACTAC-3'	5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG-3'
Acox-1	5'-GCCCAACTGTGACTTCCATT-3'	5'-GGCATGTAACCCGTAGCACT-3'
Abcd1	5'-GCCAAGTTGTGGATGAG-3'	5'-TTCCGCAGAGTCGGGATAGA-3'
Abcd3	5'-GTTCAAAGAGAAGGATGGGATG-3'	5'-TGCTCACGGCACTGGTACATTC-3'
MFP2	5'-AGGGGACTTCAAGGGAATTGG-3'	5'-GCCTGCTTCAACTGAATCGTAA-3'
ADHAPS	5'-AATGGATGGGGCTACAATGATTC-3'	5'-TCCAGACTTACTCCAAGGGTG-3'
DHAPAT	5'-ATGGACGTTCTAGCTCCTCC-3'	5'-GCGGGGTGTAGCACTTCATT-3'

12.5. Analyse des résultats qPCR

Les courbes de fluorescence obtenues sont analysées avec le logiciel « iCycler IQ » (Biorad). Le Ct (Cycle threshold) correspond au nombre de cycles de qPCR nécessaires

pour atteindre une certaine valeur de fluorescence, appelée seuil. Chaque échantillon à un Ct. Le ΔCt correspond à la différence entre le Ct du traité et le Ct du témoin : plus la différence est importante, plus le traitement a un impact sur la transcription. Trois expériences indépendantes en double sont réalisées.

13. Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel SPSS version 21.

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm écart-type, et comparés par un test non paramétrique U de Mann-Whitney. Les tests cellulaires réalisés le plus souvent en triplicate sont répétés au minimum trois fois. Le seuil de significativité est fixé à $p \leq 0,05$ pour tous les tests.

RESULTATS

I. Etude clinique préliminaire

Notre étude clinique préliminaire a été basée sur 20 patients répartis en deux groupes, 10 patients atteints d'une sclérose en plaques récurrente rémittente (SEP RR) et 10 patients ayant des troubles neurologiques autres que la SEP (polyradiculo-neuropathies, polyneuropathies, myéloradiculopathies).

Cette étude consiste à identifier des biomarqueurs de stress oxydant et/ou lipidiques, ou valider des biomarqueurs déjà existants, dans le plasma et le liquide céphalorachidien (LCR) de patients atteints de SEP RR. Ainsi, une évaluation du profil des acides gras au niveau plasmatique et cérébral est effectuée chez les patients atteints de SEP et les témoins. De plus, l'impact du stress oxydant sur les constituants lipidiques majeurs, à savoir les acides gras et le cholestérol, est évalué *via* une quantification des produits issus de la peroxydation lipidique dans le LCR et le plasma. En effet, les hydroxy-acides octodecadiénoïques (HODEs), produits de l'oxydation de l'acide linoléique, en particulier le 9-HODE et le 13-HODE sont mesurés. De même, le 7-cétocholestérol (7KC) et le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC), issus de l'auto-oxydation du cholestérol, ainsi que le 27-hydroxycholestérol, le 7 α -hydroxycholestérol et le 24(S) hydroxycholestérol (24S-OHC), produits de l'oxydation enzymatique du cholestérol, sont également quantifiés. Ces lipides sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectroscopie de masse.

1. Evaluation du taux d'hydroxy-acides octodecadiénoïques au niveau plasmatique et cérébral

Étant donné que les hydroxy-acides octodecadiénoïques (HODE) sont des produits de dégradation des acides gras, Il est important d'évaluer leurs taux plasmatiques et cérébraux chez des patients SEP RR et des patients non SEP (témoins). Dans cette étude, nous avons pu quantifier le taux du 9-HODE et du 13-HODE, des produits de l'oxydation de l'acide linoléique lui-même précurseur de l'acide arachidonique. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

Les résultats ont montré une augmentation significative du taux de HODE totale (la somme du 9-HODE et du 13-HODE) au niveau plasmatique et cérébral chez les patients SEP RR comparativement aux témoins. Toutefois, une augmentation significative du taux de 13 HODE à la fois au niveau plasmatique que cérébral a été observée chez les patients SEP RR par rapport aux témoins (**Tableau 3**). Nos résultats montrent également une augmentation

significative du taux de 9 HODE cérébral chez les patients SEP RR comparativement aux témoins.

Tableau 3 : Taux des hydroxy-acides octadecadenoïques (9 HODE ; 13 HODE ; total HODE) au niveau plasmatique et cérébral chez les patients atteints de sclérose en plaques récurrente rémittente et les témoins

	9 HODE	13 HODE	Total HODE
Plasma Témoin (µM)	2,10 ± 1,25	1,08 ± 0,51	3,18 ± 1,75
Plasma SEP RR (µM)	2,18 ± 0,39	5,11 ± 0,48*	7,29 ± 0,87*
LCR Témoin (nM)	8,11 ± 1,43	3,81 ± 0,3	11,3 ± 1,74
LCR SEP RR (nM)	17,73 ± 3,74*	6,65 ± 1,28*	24,38 ± 5,02*

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± écart type. Une différence significative entre les malades SEP et les témoins est indiquée par * $P \leq 0,05$ (Test de Mann Whitney).

2. Evaluation du taux des oxystérols au niveau plasmatique et cérébral

Le dosage du taux des oxystérols a montré une augmentation significative du taux plasmatique du 24S OHC, du 7β-OHC et du 7 KC chez les patients SEP RR, comparativement aux patients non SEP. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée pour le 27 OHC et le 7α-OHC entre le groupe des malades SEP RR et celui des témoins (Tableau 4).

Tableau 4 : Taux des oxystérols au niveau plasmatique et cérébral chez les patients atteints de sclérose en plaques récurrente rémittente et les témoins

(pg/ml)	24S OHC	27 OHC	7α-OHC	7β-OHC	7KC
Plasma Témoin	130,8 ± 64,00	107,5 ± 43,31	357,83 ± 145,66	134,5 ± 41,96	263,83 ± 68,46
Plasma SEP RR	147,33 ± 59,42*	103,83 ± 24,72	360,5 ± 153,57	150,33 ± 79,67*	367,33 ± 142,15*
LCR Témoin	5,88 ± 1,03	4,01 ± 1,18	9,45 ± 1,95	11,19 ± 1,80	22,32 ± 10,25

LCR SEP RR	6,01 ± 1,19	4,32 ± 1,03	9,61 ± 3,2	11,28 ± 2,22	22,00 ± 12,05
-----------------------	-------------	-------------	------------	--------------	---------------

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± écart type. Une différence significative entre les malades SEP et les témoins est indiquée par * $P \leq 0,05$ (Test de Mann Whitney).

3. Evaluation du profil des acides gras au niveau plasmatique et cérébral

Les acides gras sont l'unité structurale des lipides. Ce sont des constituants majeurs de la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Ils servent également de substrat énergétique et jouent un rôle essentiel dans la régulation de certaines réactions métaboliques chez l'homme. Pour cela, une comparaison entre le profil des acides gras notamment les acides gras d'intérêt (C20:4 ; C22:6 ; C22:0 ; C24:0 ; C26:0) au niveau du plasma et du LCR chez les patients SEP-RR et les témoins (patients non SEP) a été effectuée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Profil des acides gras au niveau plasmatique et cérébral chez les patients atteint de la sclérose en plaques récurrente rémittente et les témoins

	C20:4	C22:6	C22:0	C24:6	C24:0	C26:0
Plasma						
Témoin (µM)	363,32 ± 90,87	59,89 ± 28,49	0,12 ± 0,05	0,143 ± 0,07	0,17 ± 0,04	0,04 ± 0,01
Plasma						
SEP RR (µM)	320,95 ± 99,11*	49,04 ± 18,48 *	0,22 ± 0,18 *	0,147 ± 0,12	0,19 ± 0,11	0,04 ± 0,02
LCR						
Témoin (nM)	164,58 ± 102,85	38,11 ± 27,77	5,95 ± 2,28	44,78 ± 8,74	11,95 ± 3,09	3,10 ± 1,72
LCR						
SEP RR (nM)	132,07 ± 61,03 *	28,06 ± 21,49 *	9,04 ± 3,309 *	43,19 ± 8,94	12,05 ± 2,78	3,12 ± 2,51

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± écart type. Une différence significative entre les malades SEP et les témoins est indiquée par * $P \leq 0,05$ (Test de Mann Whitney).

Une diminution significative du taux d'acide arachidonique (AA) (C20:4) et d'acide docosahexaénoïque (DHA) (C22:6) a été observée au niveau plasmatique et cérébral chez les patients SEP-RR comparativement des patients non SEP (Témoins). Cependant, une augmentation significative du taux d'acide docosanoïque (C22:0) a été révélée au niveau plasmatique et cérébral chez les patients SEP RR par rapport aux témoins. Par ailleurs, aucune différence significative des taux d'acide gras tétracosahexaénoïque (C24:6), d'acide

lignocérique (C24:0) et d'acide cérotique (C26:0) n'a été observée entre le groupe des patients SEP-RR et le groupe des témoins au niveau cérébral ainsi que plasmatique.

Sur la base de cette étude clinique préliminaire, qui suggère l'installation d'un stress oxydant chez les patients SEP RR ainsi qu'un désordre du métabolisme lipidique qui pourrait être entre autre la conséquence d'une altération du métabolisme mitochondrial et/ou peroxysomal. Une nouvelle étude clinique plus approfondie est en cours « Biomarbiot ». C'est une étude monocentrique, menée sur 28 patients traités par la biotine. C'est le médicament qui sera étudié dans la suite de ces travaux de thèse afin d'évaluer ses effets cytoprotecteurs sur des oligodendrocytes murins 158N traitées par le 7 β -OHC.

En effet, cette étude clinique en cours aura pour but de mettre en évidence des biomarqueurs sanguins lipidiques, ainsi que des biomarqueurs d'activité mitochondriale, peroxysomale et de fonctionnement neuronal prédictifs de bonne ou mauvaise réponse clinique à la biotine chez des patients porteurs de SEP progressive, ainsi de déterminer la capacité de cette molécule de prévenir ou de corriger les altérations mitochondriales ou peroxysomales.

En fonction de ces résultats cliniques préliminaires, notre étude *in vitro* s'est focalisée à préciser dans un premier temps, les activités cytotoxiques du 7 β -hydroxycholestérol, présent en forte concentration au niveau du plasma des patients SEP RR, sur des cellules oligodendrocytaires murines 158N, et ceci en abordant les paramètres associés à la pathogenèse de la SEP, en particulier le statut RedOx, le statut mitochondrial et peroxysomal, le métabolisme lipidique et la mort cellulaire ainsi que l'expression de protéines de myéline. Dans un deuxième temps, à évaluer la capacité du diméthyle fumarate (DMF), du monométhyle fumarate (MMF) et de la biotine à s'opposer aux effets toxiques induits par le 7 β -hydroxycholestérol sur les cellules 158N.

II. Etude *in vitro*

1. Evaluation des effets du 7 β -hydroxycholestérol, du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine sur la croissance cellulaire et / ou l'activité mitochondriale des cellules oligodendrocytaire murines

Le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC) est un oxystérol qui peut être formé soit par auto-oxydation du cholestérol sur le cycle B du cholestérol en C7, soit par synthèse enzymatique à partir du 7-oxochlestérol (également nommé 7-cétocholestérol) (**Mutemberezi et al., 2016**). Le 7 β -OHC est fortement suspecté d'être responsable de différentes maladies liées à l'âge très largement répandues notamment les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Vejux**

and Lizard, 2009; Nury et al., 2017) . Par conséquent, cet oxystérol pourrait constituer un second messenger dans le processus de neurodégénéresence et conduire à divers dysfonctionnements cellulaires.

Comme il existe de nombreuses preuves soutenant l'implication du 7 β -OHC dans l'initiation et le développement des maladies neurodégénératives en particulier les maladies démyélinisantes tels que la SEP, il est donc important de caractériser son activité biologique.

Dans ce contexte, l'activité cytotoxique du 7 β -OHC a été déterminée *in vitro* sur des cellules oligodendrocytaires murines 158N, cellules productrices de la myéline, traitées pendant 24 h avec différentes concentrations du 7 β -OHC 1; 6,25 ; 12,5; 25; 50; 100 et 200 μ M. Un test MTT est réalisé pour évaluer les effets du 7 β -OHC sur la croissance cellulaire et / ou l'activité mitochondriale, afin de justifier la concentration du 7 β -OHC qui sera choisie dans ce travail de thèse en absence ou en présence des différents traitements utilisés dans la SEP (DMF, MMF et Biotine). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 16**.

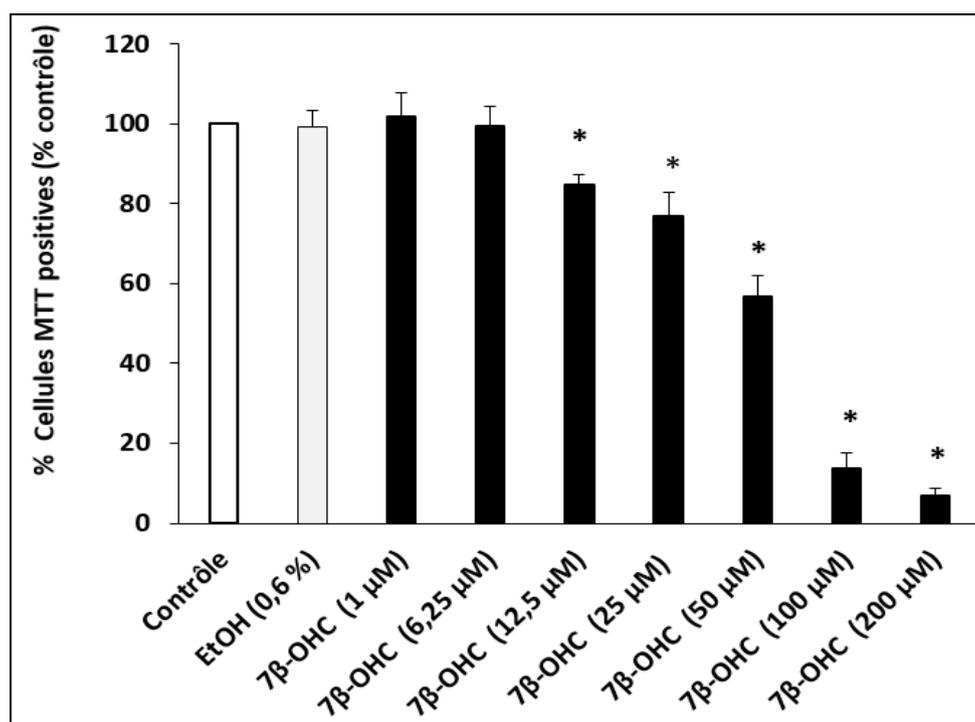


Figure 16 : Evaluation des effets de différentes concentrations du 7 β -hydroxycholestérol sur la croissance cellulaire et / ou l'activité mitochondriale des cellules oligodendrocytaires murines

Les cellules 158N pré-cultivées pendant 24 h dans des plaques de 6 puits, sont ensuite traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7 β -OHC : (1, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 μ M). Dans ces conditions, la cytotoxicité est déterminée avec le test MTT. Véhicule : EtOH 0,6%. L'analyse statistique des données est réalisée par le test

de Mann Whitney. Les données présentées correspondent à la moyenne \pm écart type (deux expériences réalisées en triplicate). Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β -OHC à différentes concentrations et les cellules traitées avec le véhicule (Ethanol (EtOH) 0,6%) sont indiquées par « * ». Aucune différence n'a été observée entre les cellules non traitées et les cellules traitées avec le le véhicule (EtOH 0,6%).

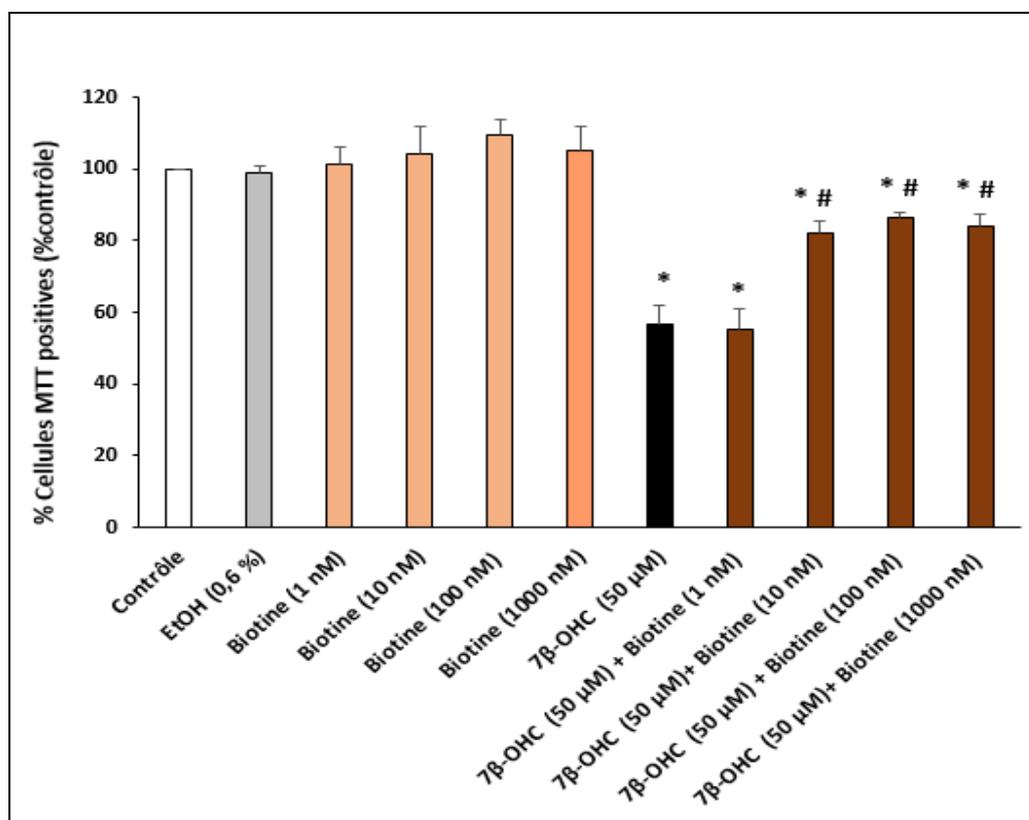


Figure 17 : Evaluation des effets de différentes concentrations de la biotine sur l'inhibition de la croissance cellulaire induite par le 7β -hydroxycholestérol.

Les cellules 158N ont été cultivées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β -OHC (50 μ M) associées ou non à la biotine (1, 10, 100 et 1 000 nM). Dans ces conditions, un test MTT a été effectué. Sur la base de ces données, les concentrations de biotine de 10 et 100 nM ont été choisies. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les données présentées correspondent à la moyenne \pm écart type de trois expériences réalisées en triplicate. Aucune différence significative n'est observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)). Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par : *. Des différences significatives entre les cellules traitées avec du 7β -OHC et les cellules traitées avec (7β -OHC + biotine) sont indiquées par : #.

Des pourcentages de cellules MTT positives semblables sont obtenus pour les cellules contrôles et les cellules traitées avec le véhicule (Ethanol (EtOH (0,6%))). La concentration du 7 β -OHC, qui induit une diminution d'environ 50 % des cellules MTT positives est celle de 50 μ M, est retenue pour le reste du travail. Afin de préciser les effets du 7 β -OHC, du DMF, du MMF et de la biotine sur les cellules 158N, différentes méthodes d'analyses biochimiques, d'imagerie et de cytométrie en flux ont été utilisées. Plusieurs paramètres morphologiques, biologiques et fonctionnels ont été évalués au niveau des cellules 158N mises en culture en présence du 7 β -OHC, du DMF, du MMF et de la biotine.

Initialement, nous avons déterminé la capacité de la biotine à prévenir la cytotoxicité induite par le 7 β -OHC (50 μ M) par un test MTT, afin de déterminer la concentration capable d'inhiber les effets néfastes du 7 β -OHC. Les cellules 158N sont incubées avec du 7 β -OHC (50 μ M) pendant 24 h associées ou non à la biotine à différentes concentrations (1, 10, 100 et 1 000 nM). Avec 10, 100 et 1 000 nM de biotine, une protection de la cytotoxicité induite par le 7 β -OHC est observée avec un effet similaire pour les trois concentrations. Par conséquent, les plus faibles concentrations capables de prévenir la cytotoxicité induite par le 7 β -OHC ont été choisis pour le reste du travail à savoir 10 et 100 nM. Toutefois, des données cliniques ont confirmé que le taux cérébral de la biotine est estimé à environ 300 à 400 nM pendant les quelques minutes qui suivent une administration par voie orale d'une dose unique de 300 mg / jour. Cependant, cette concentration diminue rapidement. Sur la base de ces données cliniques et *in vitro*, les concentrations de la biotine choisies pour ce travail sont 10 et 100 nM (**Figure 17**).

De même, la concentration du DMF et MMF a été déterminée par le test MTT après un prétraitement des cellules 158N avec du DMF et MMF à différentes concentrations (1, 12,5, 25, 50, 100 μ M) associées ou non au 7 β -OHC (50 μ M). Dans ces conditions la concentration de DMF et de MMF ayant la capacité d'atténuer la cytotoxicité induite par le 7 β -OHC (50 μ M) était celle du 25 μ M (**Figure 18**).

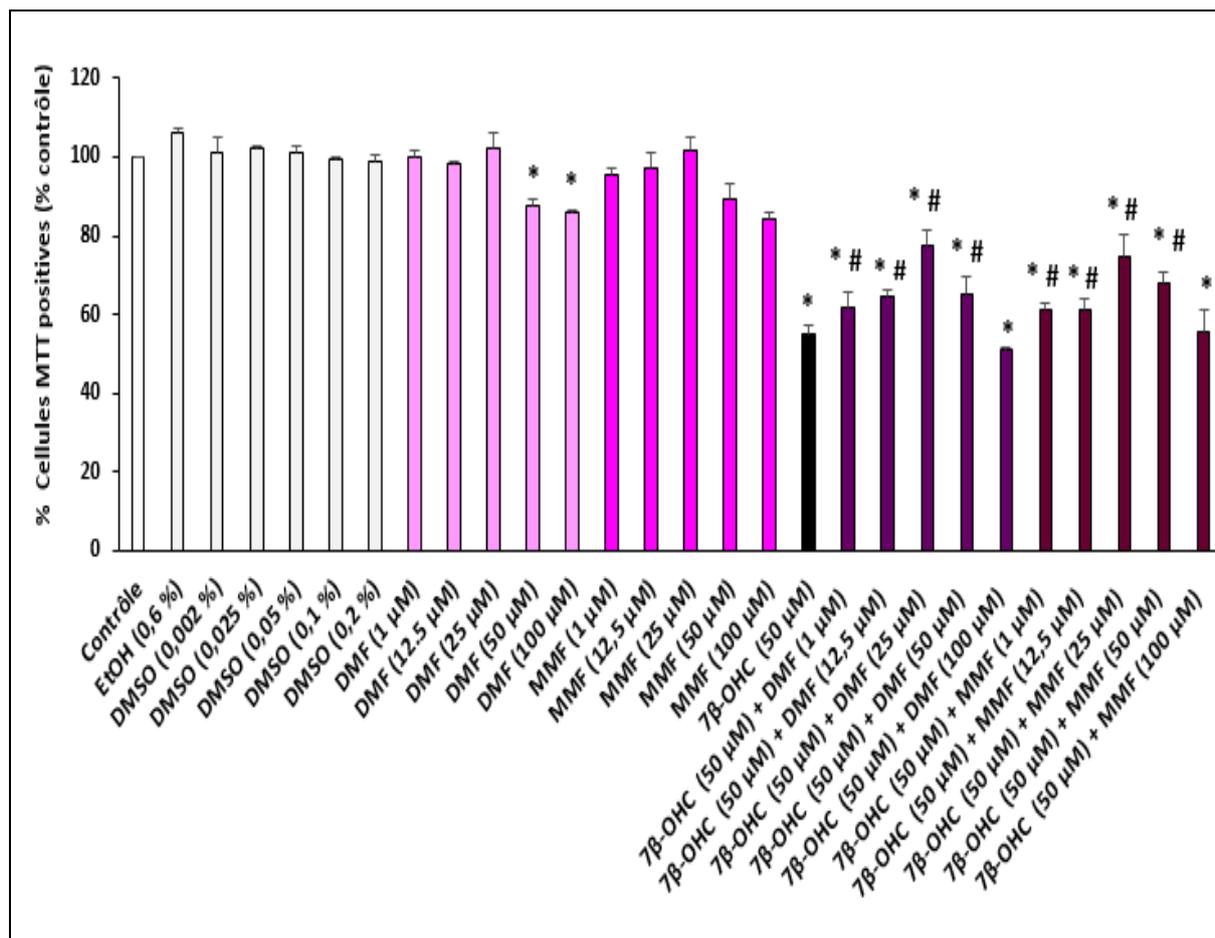


Figure 18 : Evaluation des effets de différentes concentrations du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate sur l’inhibition de la croissance cellulaire induite par le 7β-hydroxycholestérol.

Les cellules 158N préalablement cultivées pendant 24 heures ont été incubées pendant 24 heures en absence ou en présence du 7β-OHC (50 µM) associées ou non au DMF ou au MMF à différentes concentration (1, 12,5, 25, 50 et 100 µM). Dans ces conditions, un test MTT est réalisé. L’analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les données présentées correspondent à la moyenne ± écart type (trois expériences indépendantes). Aucune différence significative n’est observée entre les cellules non traitées (contrôles) et les cellules traitées avec les véhicules (éthanol (EtOH, 0,6%) ou DMSO (0,002, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2%)). Des différences significatives entre les cellules traitées par le véhicule (EtOH: 0,6%) et les cellules traitées sont indiqué par « * ». Des différences significatives entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF) ou (7β-OHC + MMF) sont indiquées par # $P \leq 0.05$.

2. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la morphologie et l'adhésion cellulaire

2.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la morphologie cellulaire

Les cellules 158N ont été cultivées dans des plaques de 6 puits pendant 24 h, prétraitées ou non par DMF (25 μ M), MMF (25 μ M), biotine (10 et 100 nM) ou α -tocophérol (400 μ M), utilisée comme contrôle positif, pendant 2h avant l'ajout du 7 β -OHC (50 μ M). Après 24 h de traitement, les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à contraste de phase et des images sont prises pour chaque condition de traitement (**Figure 19**).

La morphologie des cellules contrôles et des cellules traitées avec de l'éthanol (0.6%) ne présentent pas des changements marqués. En présence de DMF, de MMF ou de la biotine, des effets marqués sur l'adhésion cellulaire et la croissance cellulaire sont mises en évidence (**Figure 19**).

Comparativement au contrôle et au véhicule; les cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M), montre une augmentation du nombre des cellules rondes flottantes, considérées comme des cellules mourantes, et une diminution du nombre des cellules adhérentes, indiquant une perte d'adhérence cellulaire. Cependant, lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) ou à la biotine (10 et 100 nM), on remarque une restauration de la morphologie et de l'adhérence des cellules 158N ainsi qu'une forte diminution du nombre des cellules flottantes (cellules non adhérentes) (**Figure 19**).

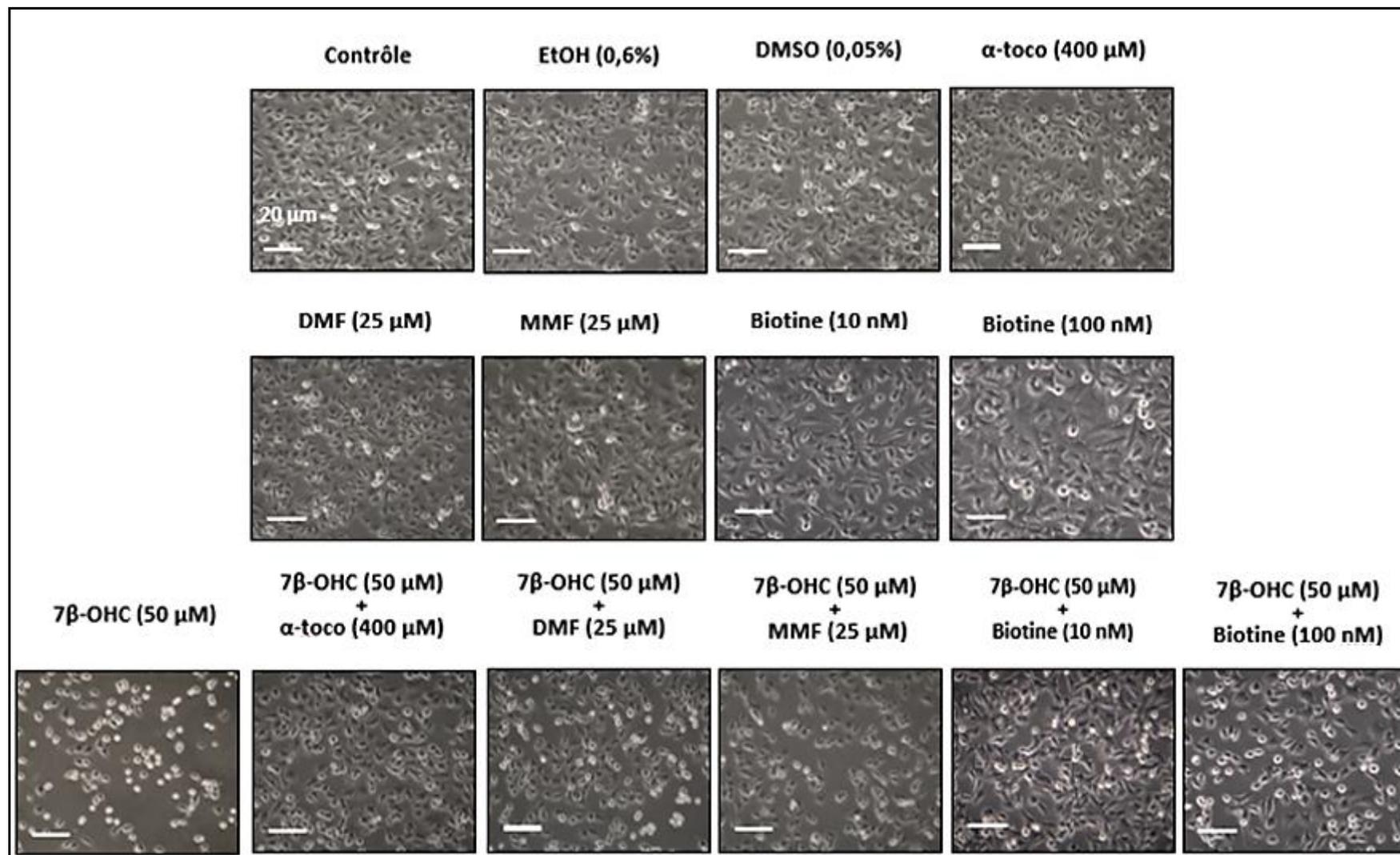


Figure 19: Observation des cellules par microscopie en contraste de phase

Les cellules 158N cultivées en plaques de 6 puits, ont été traitées avec du 7β-OHC (50 μM) associées ou non au DMF (25 μM), au MMF (25 μM), à la Biotine (10 et 100 nM) et ou à l'α-tocophérol (400 μM), pendant 24 h et observées en microscope en contraste de phase.

2.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur l'adhésion cellulaire

L'impact du DMF, du MMF et de la biotine sur l'adhésion cellulaire a été mis en évidence par coloration au crystal violet. Ainsi, après 24 h de traitement, une coloration au crystal-violet a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 20**.

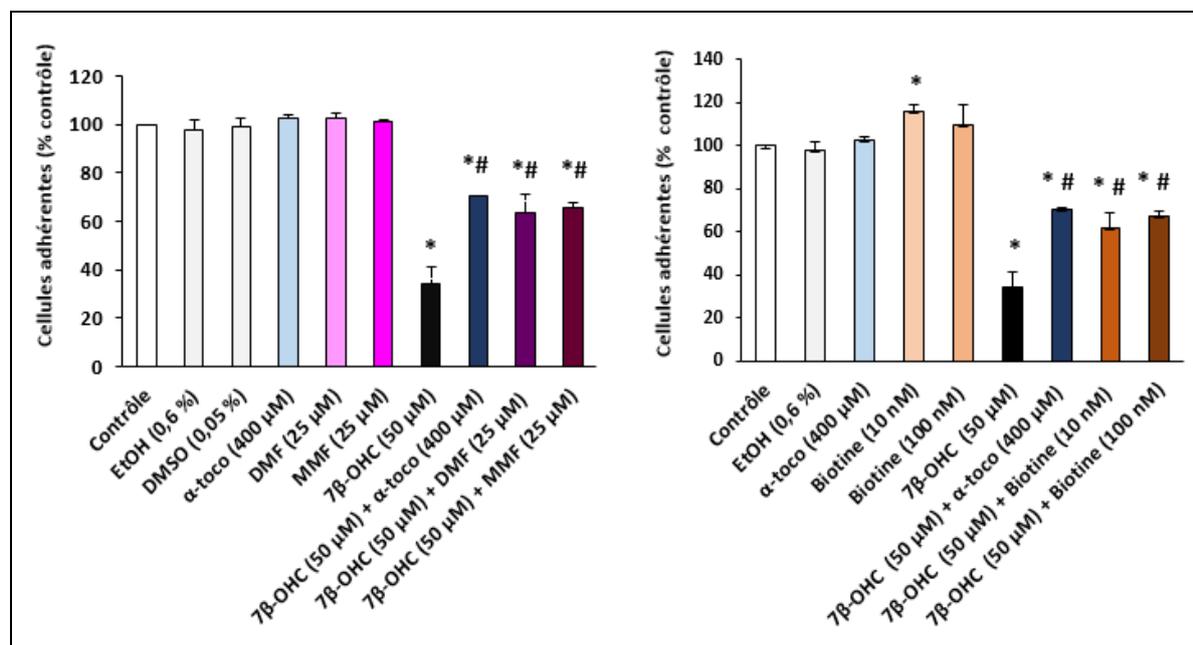


Figure 20 : Evaluation des effets du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur l'adhésion cellulaire.

Les effets de différents traitements sur l'adhésion cellulaire ont été évalués par coloration au crystal violet. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25 μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre contrôle et EtOH.

L'adhésion cellulaire diminue significativement suite au traitement avec du 7β-OHC pendant 24 h, par rapport au véhicule (EtOH (0,6 %)) et aux cellules non traitées (Contrôle) (**Figure 20**). Lorsque le 7β-OHC est associé au DMF (25 μM), au MMF (25 μM) ou à la biotine (10 et 100 nM), une augmentation significative du nombre des cellules adhérentes est observée comparativement aux cellules traitées avec du 7β-OHC seul ; ces effets sont comparables à

ceux observés avec l' α -tocophérol (**Figure 20**). Ainsi, le DMF, le MMF et la biotine s'opposent à l'inhibition de l'adhérence cellulaire induite par le 7 β -OHC.

3. Evaluation des effets cytoprotecteurs du diméthyle-fumarate, du monométhyle-fumarate et de la biotine

3.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la croissance cellulaire

Les cellules 158N ont été traitées en présence ou en absence du 7 β -OHC (50 μ M) associées ou non au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M) (utilisée comme témoin positif) pendant 24 h. Une évaluation de la capacité du DMF, MMF ou de la biotine à s'opposer aux effets toxiques du 7 β -OHC, et à rétablir la croissance et la prolifération cellulaire a été évaluée par un test MTT.

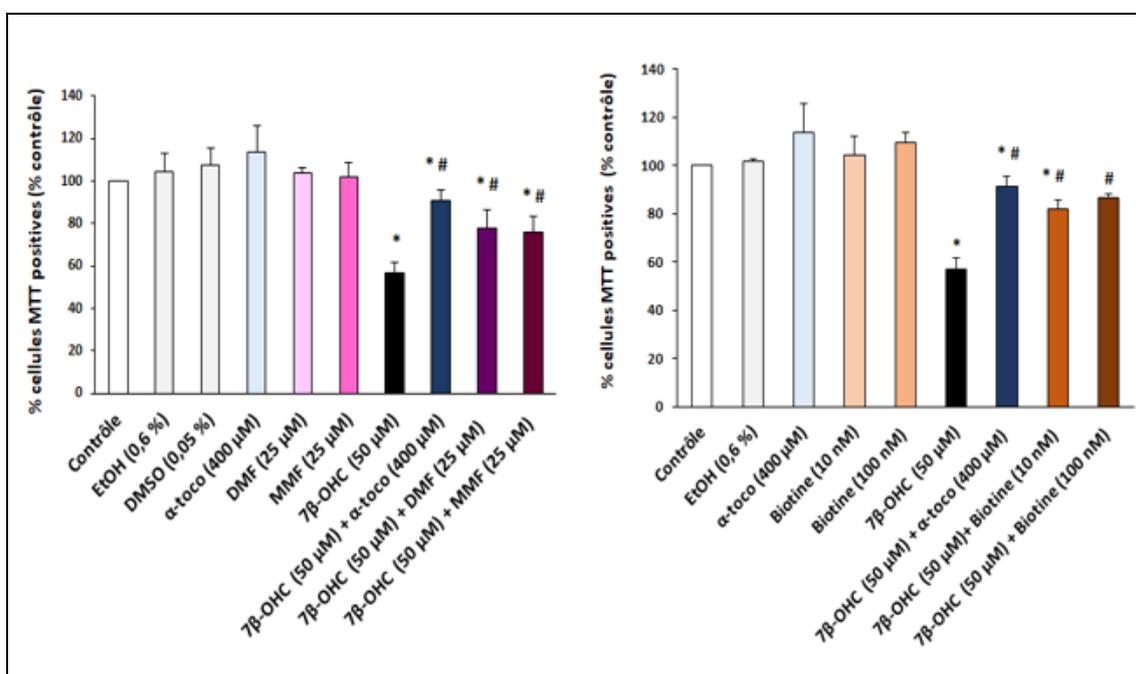


Figure 21 : Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la croissance cellulaire.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #.

Les résultats ont montré une nette diminution du pourcentage des cellules MTT positives reflétant une inhibition de la croissance cellulaire en présence du 7 β -OHC (50 μ M). Cette diminution a été contrecarrée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) ou à la biotine (10 et 100 nM). Ce même effet est observé lorsque le 7 β -OHC est associé à l' α -tocophérol (400 μ M) (**Figure 21**). Aucune différence n'a été observée entre les cellules contrôle et celles traitées avec l'éthanol (EtOH 0,6%).

Ces résultats montrent que les différents traitements (DMF, MMF et Biotine) pourraient moduler la croissance cellulaire et inhiber l'effet cytotoxique du 7 β -OHC sur les cellules 158N.

3.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité estérase par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA)

Afin d'évaluer les effets du DMF, du MMF et de la biotine associés ou non au 7 β -OHC sur l'activité estérase des membranes plasmiques des cellules et sur la viabilité cellulaire, une coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) a été réalisée sur les cellules 158N traitées avec ou sans 7 β -OHC (50 μ M), en présence ou en absence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M). Seules les cellules vivantes sont capables de transformer le FDA en fluorescéine par l'intermédiaire de l'activité estérase.

Les résultats ci-dessus ont montré une nette diminution des cellules FDA+, (considérées comme cellules vivantes), reflétant une inhibition de l'activité estérase et donc une diminution de la viabilité cellulaire, suite à un traitement avec du 7 β -OHC (50 μ M). Cependant, lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF, au MMF ou à la biotine, une augmentation significative de la viabilité cellulaire et/ou de l'activité estérase est observée. Aucune différence n'a été observée entre le contrôle et le véhicule (**Figure 22**).

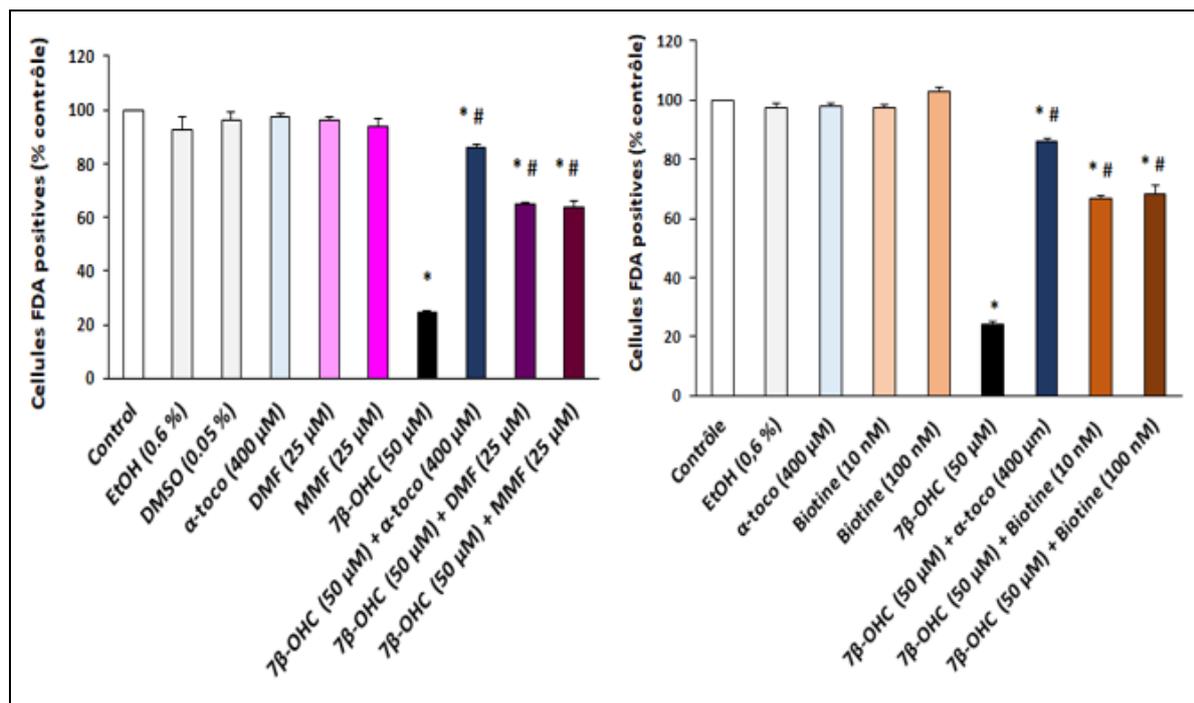


Figure 22 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur l'activité estérase des membranes plasmiques des cellules.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

3.3. Numération cellulaire en présence de bleu de trypan

Le nombre total de cellules 158N viables est déterminé par coloration au bleu de trypan. Ce colorant pénètre dans les cellules mortes et les colore en bleu alors qu'il est rejeté par les cellules vivantes. Après 24 h du traitement, des cellules 158N avec du 7β-OHC (50 μM), prétraitées ou non avec du DMF (25 μM), du MMF (25 μM), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l'α-tocophérol (400 μM), les cellules adhérentes et non adhérentes sont collectées, colorées avec du bleu de trypan et un comptage des cellules vivantes et mortes a été effectué. Une représentation du nombre des cellules viables est présentée dans la **Figure 23**. Dans les conditions de traitement des cellules 158N avec du DMF (25 μM), du MMF (25 μM) ou de la

biotine (10 et 100 nM), le nombre des cellules vivantes sont similaires à celui trouvé dans les cellules contrôle.

En présence du 7 β -OHC (50 μ M), une diminution significative du pourcentage des cellules vivantes a été observée comparativement au véhicule (EtOH 0,6%) (**Figure 23**). Cette diminution a été contrecarrée suite à un pré-traitement du 7 β -OHC avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) et de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M). Aucune différence n'a été observée entre les cellules non traitées et le véhicule (Ethanol 0,6%) (**Figure 23**).

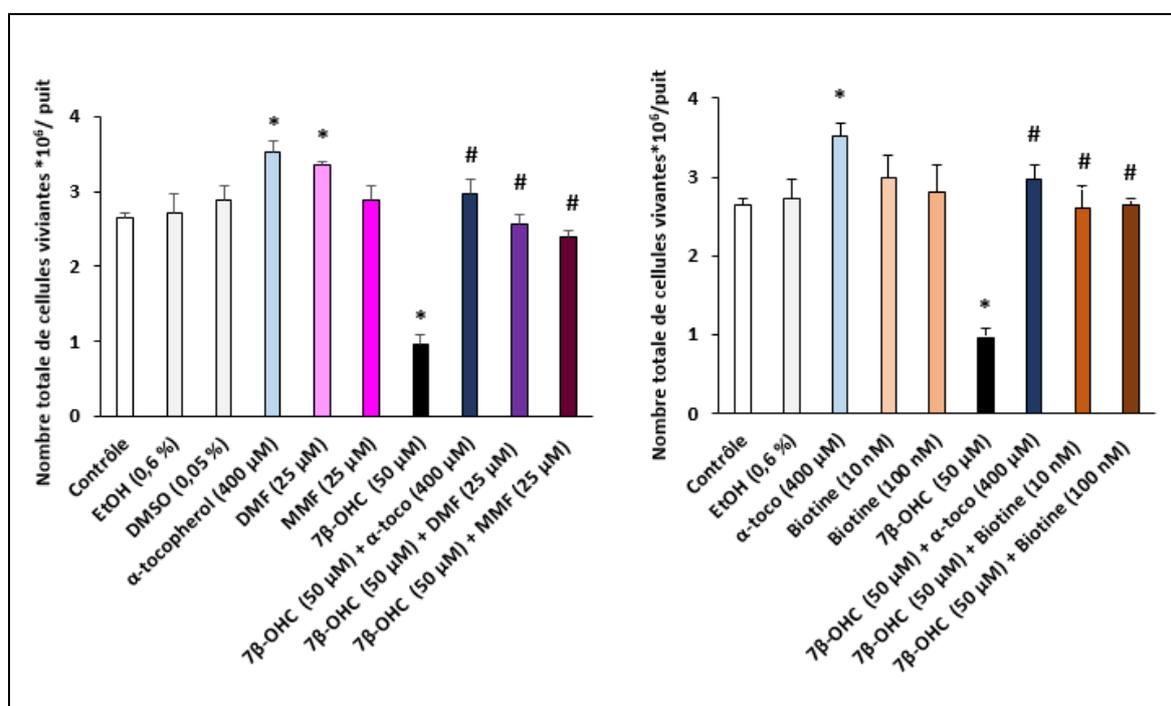


Figure 23 : Numération des cellules 158N vivantes en présence de diméthyle fumarate, de monométhyle fumarate ou de biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées avec (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou avec (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

3.4. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur l'intégrité de la membrane plasmique

La quantification de la perméabilité et/ou l'intégrité de la membrane plasmique est effectuée par coloration à l'iodure de propidium (IP). Ce colorant ne pénètre que dans les cellules ayant une membrane plasmique altérée. Ainsi, la perméabilisation de la membrane plasmique est identifiée par une augmentation de la fluorescence émise par les cellules qui ont accumulé l'IP.

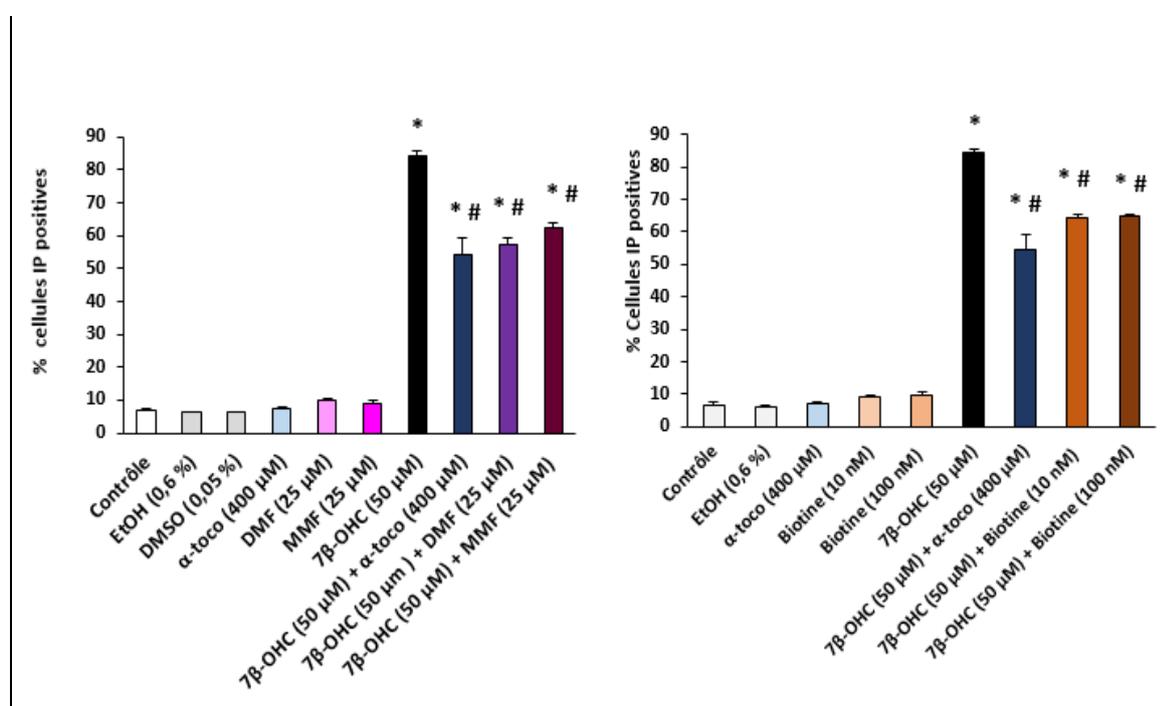


Figure 24 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur l'intégrité de la membrane plasmique.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #.

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) associées ou non au 7 β -OHC (50 μ M), une coloration à l'IP est réalisée sur les cellules (adhérentes et non-adhérentes) mises en suspension ensuite les cellules sont analysées par le cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 24**. Les résultats d'analyse de perméabilité à l'IP, des cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M), ont montré une augmentation significative du pourcentage des cellules IP positives, cellules ayant une membrane plasmique altérée, considérées comme cellules mortes. Cette augmentation est fortement atténuée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M) (contrôle positif): une réduction du pourcentage des cellules IP positives est observée, reflétant une diminution significative des cellules ayant une membrane plasmique perméable (altérée). Aucune différence n'a été révélée entre les cellules contrôle et le véhicule (**Figure 24**).

4. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le stress oxydant

4.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production d'espèces réactives de l'oxygène

4.1.1. Effet sur la production d'anions superoxydes intracellulaires

La production d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) intracellulaire par les cellules 158N a été mesurée par cytométrie en flux après coloration à la DHE. Les cellules 158N sont traitées avec DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) et biotine (10 et 100 nM) associées ou non au 7 β -OHC (50 μ M) pendant 24h.

Les résultats de l'analyse des cellules par cytométrie en flux (**Figure 25**) montrent une augmentation significative du pourcentage des cellules DHE positives, reflétant une surproduction d'anions superoxydes en présence du 7 β -OHC (50 μ M). Cependant, un prétraitement du 7 β -OHC avec du DMF (25 μ M), ou MMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM) montre une diminution de pourcentage des cellules DHE positives comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC, indiquant une atténuation de la surproduction d'anions superoxydes. Aucune différence n'a été observée entre les cellules non traitées et le véhicule.

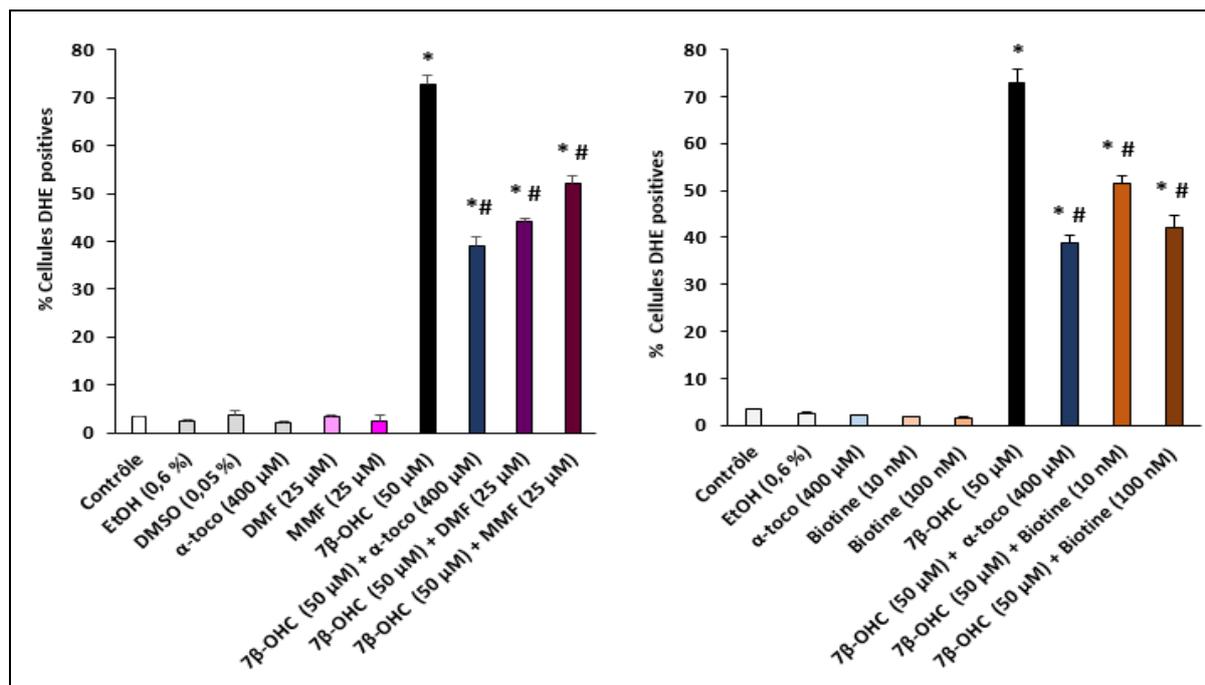


Figure 25 : Mesure de la production d’anions superoxydes intracellulaires dans les cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate ou la biotine, associées ou non au 7β-hydroxycholestérol.

L’analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n’a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

4.1.2. Effet sur la production du peroxyde d’hydrogène (H₂O₂)

La quantification de la production du peroxyde d’hydrogène (H₂O₂) a été évaluée par cytométrie en flux après coloration à la Dihydrorhodamine 123 (DHR123). Cette sonde pénètre facilement dans la cellule où elle est oxydée par H₂O₂ pour former un composé fortement fluorescent : la rhodamine 123.

Les cellules 158N ont été traitées en présence ou en absence du DMF (25 μM), du MMF (25 μM), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l’α-tocophérol (contrôle positif), associées ou non au 7β-OHC (50 μM). Après 24 h du traitement, une coloration à la DHR123 est réalisée sur les

cellules mises en suspension, ces dernières sont analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 26**.

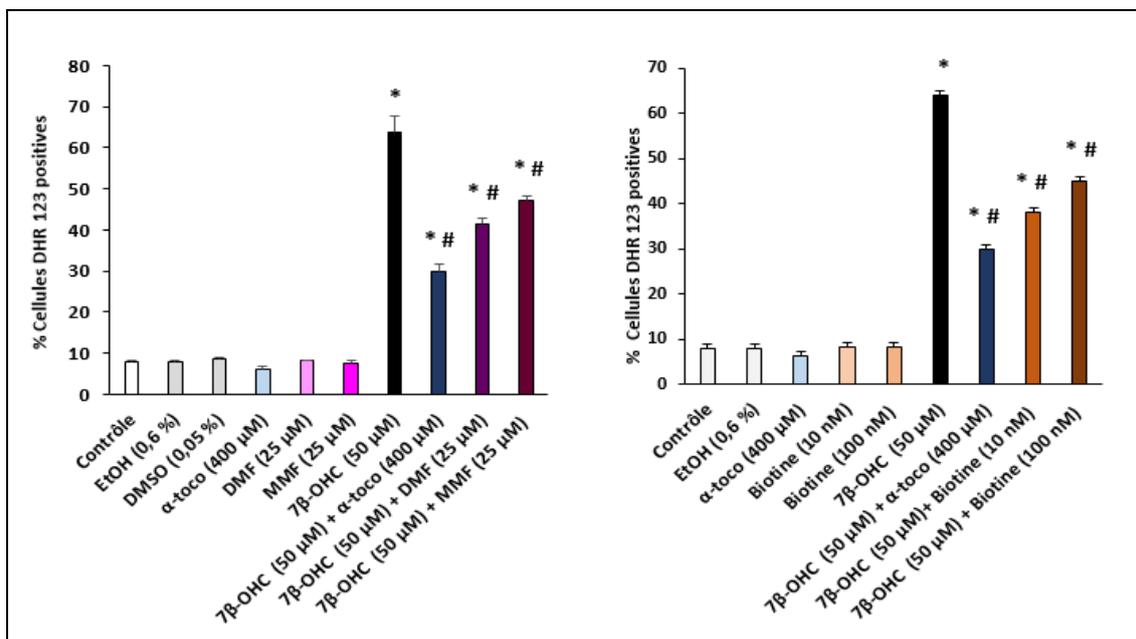


Figure 26 : Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène dans des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate et la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol

Après 24 h du traitement, les cellules ont été colorées au DHR123% et analysées au cytomètre en flux. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

Les résultats montrent une augmentation significative du pourcentage des cellules DHR 123 positives après traitement avec 7β-OHC (50 μM), reflétant une surproduction de H₂O₂ (**Figure 26**). Cette augmentation est significativement atténuée lorsque le 7β-OHC est associé au DMF (25 μM), au MMF (25 μM) ou à la biotine (10 et 100 nM). Ce même effet est observé lorsque le 7β-OHC est associé à l'α-tocophérol. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules contrôles et les véhicules ((EtOH 0,6%) et (DMSO 0,05%)).

4.2. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur le système de défense anti-oxydant

4.2.1. Mesure de l'activité glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme anti-oxydante, jouant un rôle central dans la détoxification cellulaire par l'élimination du H₂O₂. L'activité GPx a été évaluée au niveau des cellules 158N traitées ou non avec du DMF (25 μM), MMF (25 μM) et biotine (10 et 100 nM) associées ou non au 7β-OHC (50 μM).

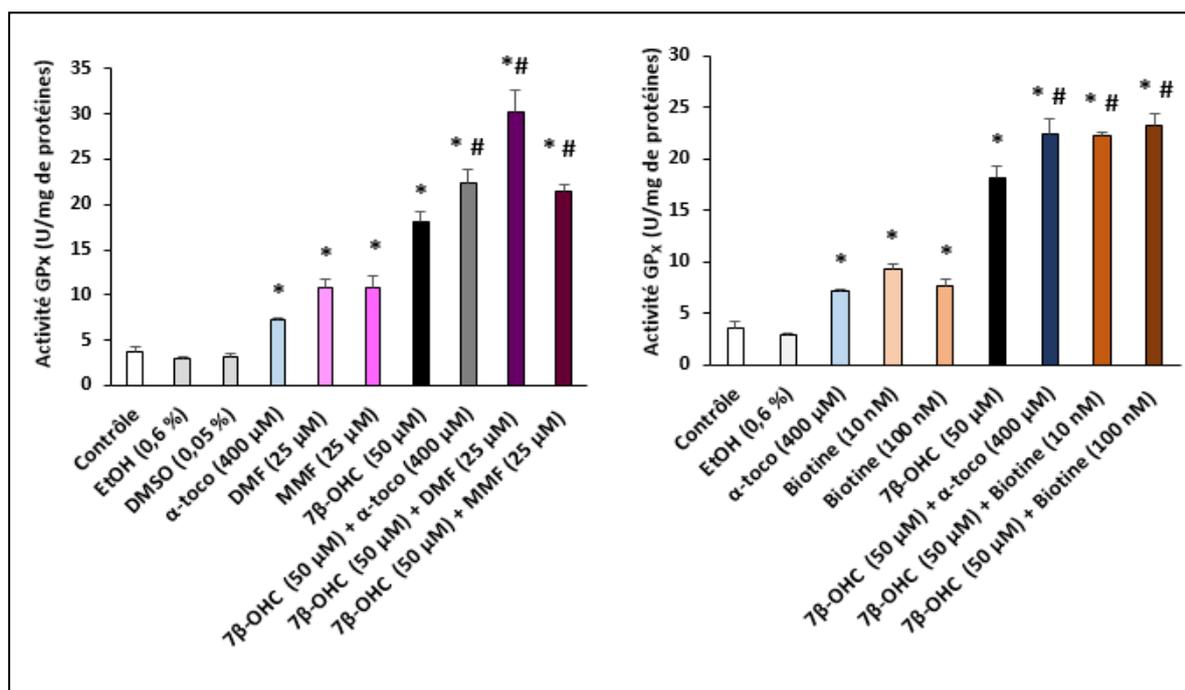


Figure 27 : Mesure de l'activité glutathion peroxydase dans des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate et la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF) (7β-OHC + MMF), (7β-OHC + biotine (10-100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #.

Les résultats ont montré une augmentation significative de l'activité GPx suite au traitement avec du 7β-OHC (50 μM) comparativement au véhicule (Ethanol 0,6%). De même, lorsque le

7 β -OHC est associé au DMF, au MMF ou à la biotine, une augmentation significative de l'activité GPx a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC seul (Figure 27).

4.2.2. Mesure de l'activité superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme capable de convertir l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et en oxygène moléculaire.

Pour évaluer l'effet de différents traitements sur l'activité de superoxyde dismutase, les cellules 158N ont été traitées au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M) ou à la biotine en présence ou en absence du 7 β -OHC (50 μ M) puis un dosage colorimétrique a été réalisé.

Les résultats sont présentés dans la Figure 28.

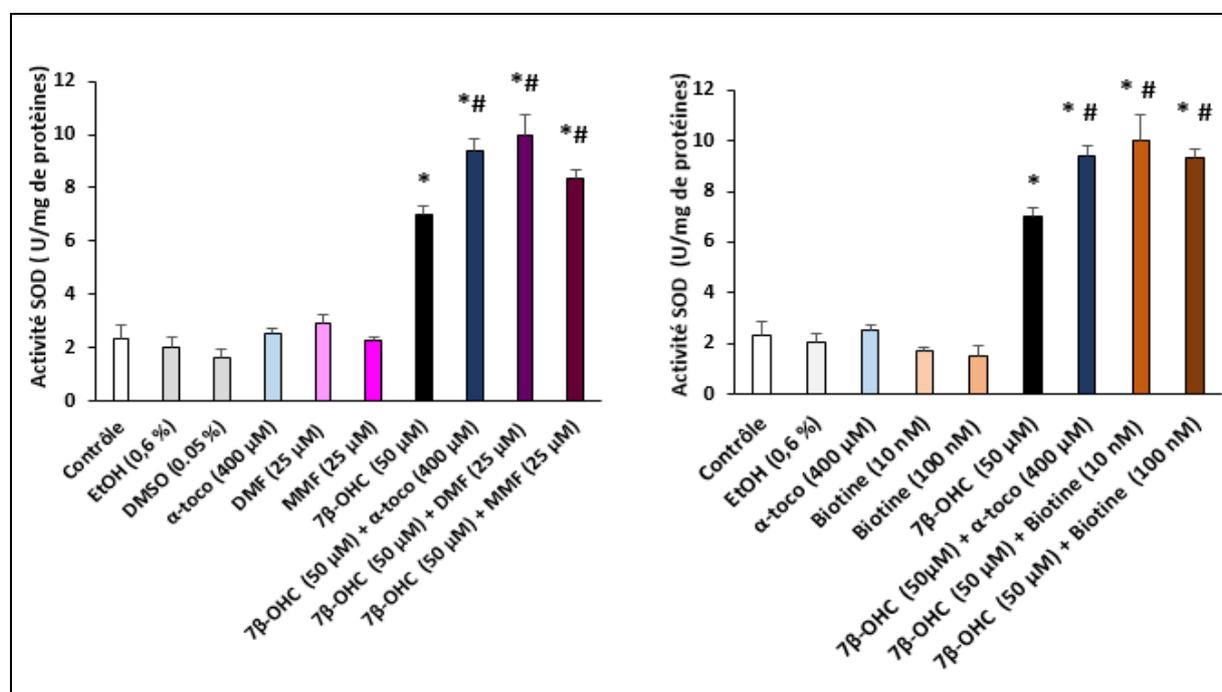


Figure 28 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité superoxyde dismutase

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #.

Aucune différence n'a été observée entre le contrôle et le véhicule. En revanche, le traitement avec du 7β-OHC a induit une augmentation significative de l'activité SOD, comparativement au véhicule. L'activité SOD est amplifiée lorsque le 7β-OHC est associé au DMF (25 μM), au MMF (25 μM) ou à la biotine (10 et 100 nM) (Figure 28).

4.2.3. Mesure de l'activité catalase

La catalase est une enzyme spécifique du peroxyosome assurant le rôle de détoxification au niveau de cet organite. Elle est responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire. L'activité enzymatique de la catalase a été évaluée au niveau des cellules 158N traitées en présence ou en absence du DMF (25 μM), du MMF (25 μM), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l'α-tocophérol (400 μM) associées ou non au 7β-OHC (50 μM).

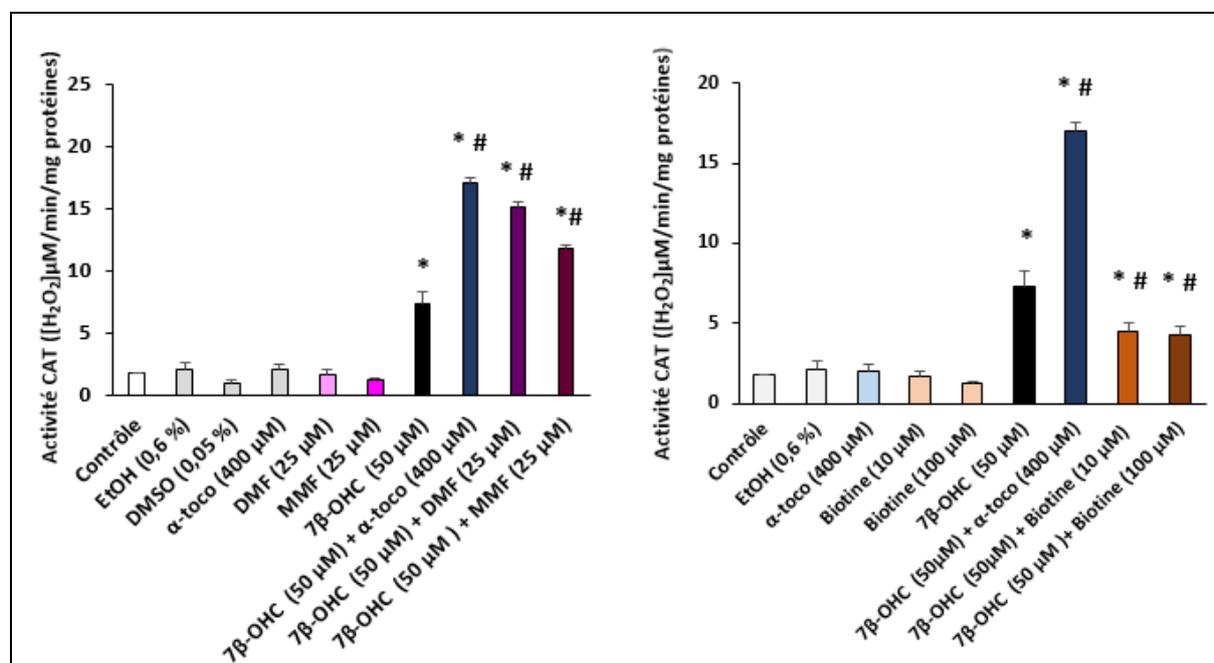


Figure 29 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur l'activité de la catalase.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25 μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #.

Les résultats montrent une augmentation significative de l'activité catalase en présence du 7 β -OHC par rapport aux cellules non traitées et les cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)). Cependant, lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF, au MMF ou à l' α -tocophérol une augmentation de l'activité catalase a été observée (**Figure 29**). Par ailleurs, lorsque les cellules sont traitées avec du 7 β -OHC en présence de la biotine (10, 100 nM), une diminution significative de l'activité catalase a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) (**Figure 29**).

4.3. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production de marqueurs de la peroxydation lipidique

L'étude des mécanismes de la peroxydation lipidique connaît depuis quelques années un terrain d'intérêt dû à ses implications dans différentes maladies, en particulier les maladies neurodégénératives.

Un déséquilibre du statut Redox dû à un déficit de la réponse antioxydante ou à un excès de pro-oxydants peut induire des dommages affectant toutes les composantes cellulaires dont les lipides.

Les lipides en particulier les acides gras polyinsaturés sont susceptibles aux attaques des radicaux libres en particulier les radicaux hydroxyles (OH \bullet), qui ont pour fonction d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (ROO \bullet). Ce dernier se transforme en peroxyde (R-O-O-R'), qui en contact avec un autre acide gras, produit un nouveau radical diène conjugué (DC) (**Esterbauer et al., 1992**). A la fin de cette réaction en chaîne, le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique, peut libérer différents aldéhydes toxiques, notamment le malonaldialdéhyde (MDA), considérés comme des produits de terminaison de la peroxydation lipidique (**Favier, 2003**).

De ce fait, un dosage des produits de peroxydation lipidique (MDA et diènes conjuguées) a été réalisé au niveau des cellules 158N traitées ou non avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM) en présence ou en absence du 7 β -OHC (50 μ M) pendant 24 h.

4.3.1. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur la production des diènes conjugués

Les cellules 158N ont été traitées en présence ou en absence du 7β-OHC (50 μM) associées ou non au DMF (25 μM), au MMF (25 μM), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l'α-tocophérol (400 μM). Après 24 h du traitement, un dosage colorimétrique a été effectué afin d'évaluer l'impacte de ces différents traitements sur la production des diènes conjugués (DC).

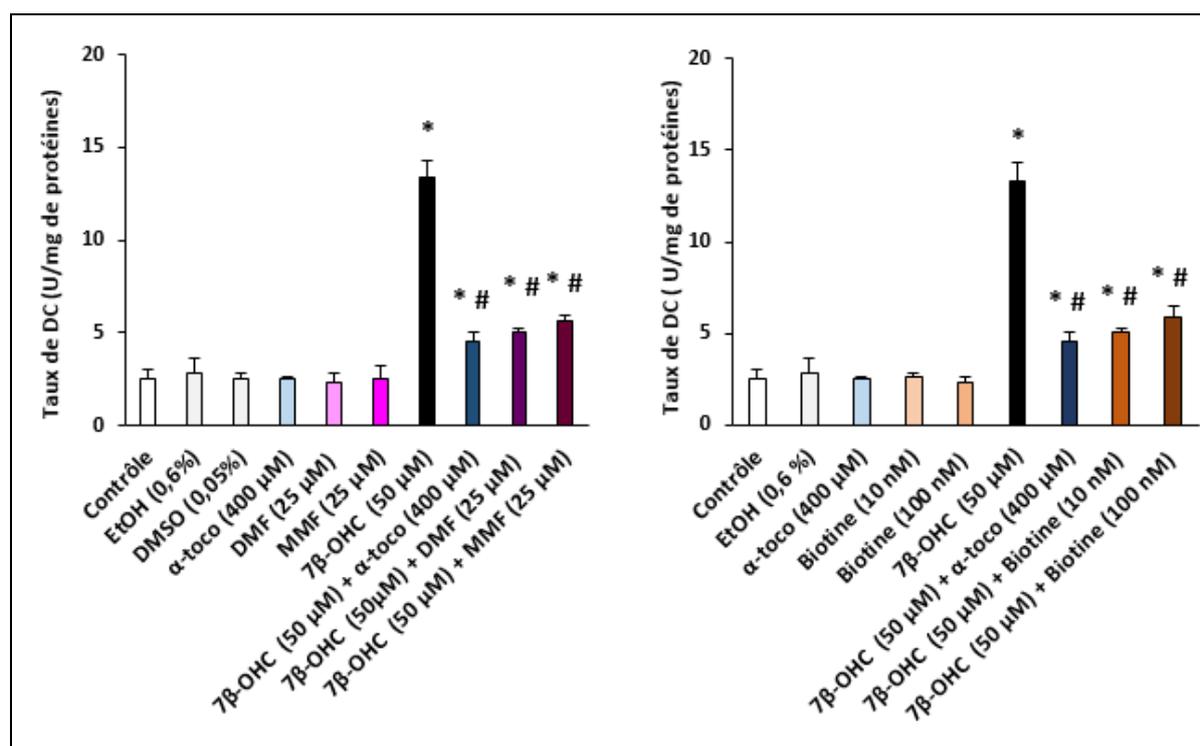


Figure 30 : Mesure du taux de diènes conjugués au niveau des cellules traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate et la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #.

différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

Les résultats d'analyse montrent une augmentation significative du taux de diènes conjugués (DC) dans les cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) comparativement au véhicule (EtOH 0,6%). Ceci est expliqué par une peroxydation lipidique induite par le 7 β -OHC associée à une surproduction et à une accumulation intracellulaire des DC. Cette accumulation de DC est significativement réduite lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M) (**Figure 30**).

4.3.2. Évaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production du malondialdéhyde

Les malondialdéhydes sont des produits terminaux de la peroxydation des AGPI.

Le traitement des cellules 158N avec du 7 β -OHC (50 μ M) a révélé une augmentation significative du taux du MDA. Cette augmentation est fortement atténuée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M), considéré comme un contrôle positif. Aucune variation significative n'a été observée entre le contrôle et les véhicules ((EtOH 0,6%) et (DMSO 0,05%)) (**Figure 31**).

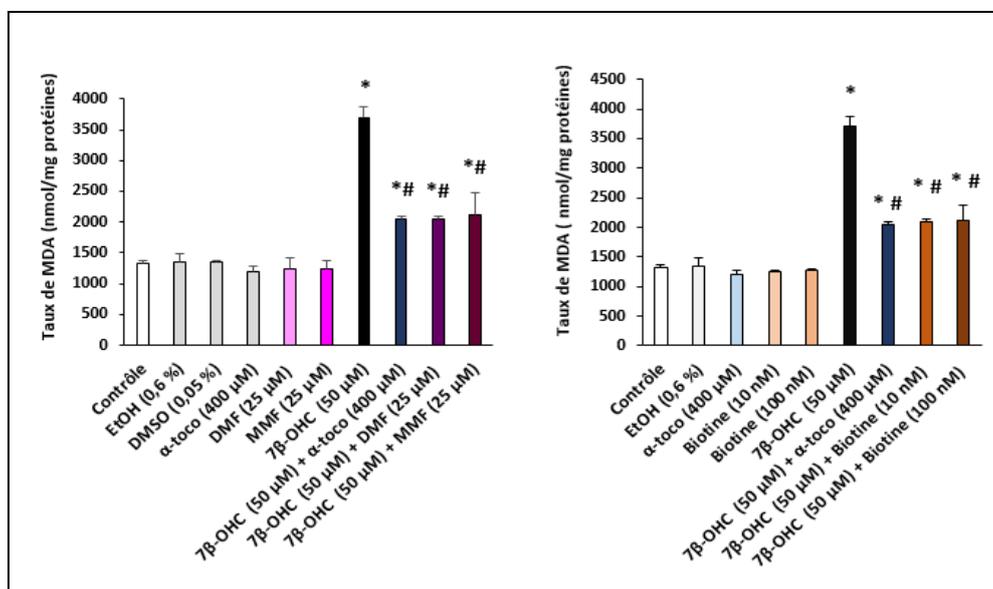


Figure 31 : Mesure du taux du malondialdéhyde des cellules traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate et la biotine associées ou non au 7 β -hydroxycholestérol

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en

triplicate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #.

4.3.3. Évaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production des protéines carbonylées

Les protéines sont aussi affectées par le stress oxydant, au cours duquel les protéines cellulaires subissent deux catégories de réactions d'oxydation : une qui rompt les liaisons peptidiques et l'autre qui modifie les protéines suite à leur réaction avec des produits issus de la peroxydation lipidique (aldéhydes). Ainsi, une modification et une perte fonctionnelle et/ou structurale des protéines qui pourrait même mener à une mort cellulaire (Levine, 2002).

Pour évaluer l'incidence du DMF, du MMF ou de la biotine associés ou non au 7 β -OHC sur la production des protéines carbonylées, un dosage colorimétrique a été effectuée. Les résultats sont présentés dans la **Figure 32**.

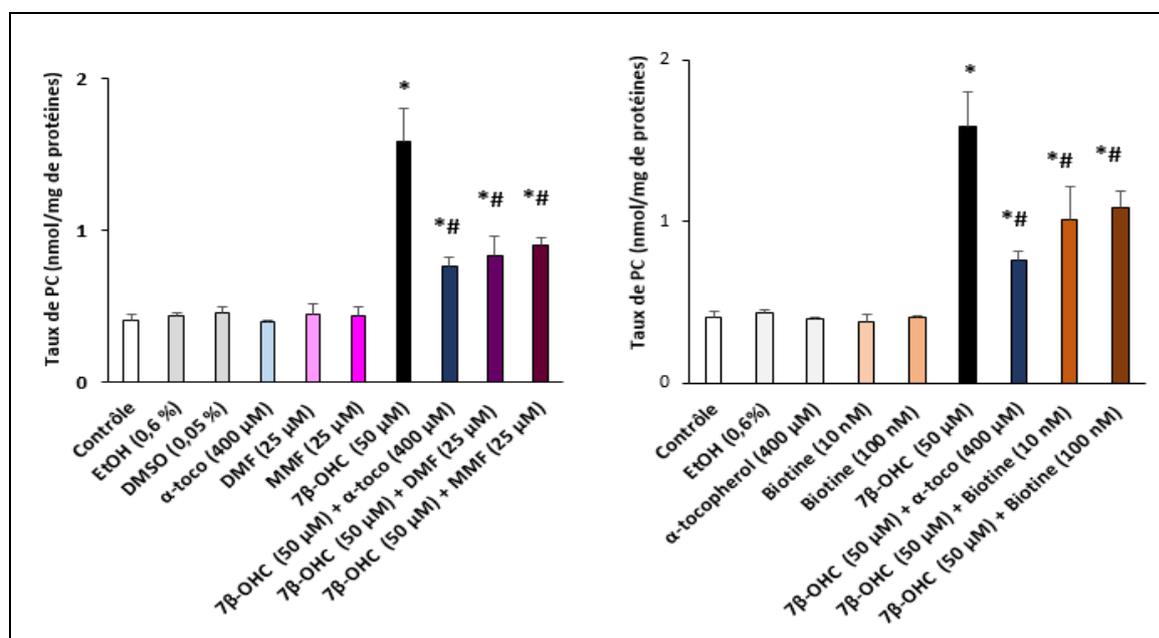


Figure 32 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la production des protéines carbonylées.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes. Des

différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

Les résultats montrent une élévation du taux des protéines carbonylées dans les cellules traitées par le 7 β -OHC (50 μ M), comparativement au véhicule. Cette augmentation est significativement diminuée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M) ou à la biotine (10 et 100 nM) (**Figure 32**).

5. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le fonctionnement mitochondrial

5.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

Une différence de potentiel réside de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Cette différence crée un gradient électrochimique entre l'espace inter-membranaire et la matrice appelé potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$).

La mesure de $\Delta\Psi_m$ est largement utilisée pour caractériser un désordre de l'activité métabolique mitochondriale et/ ou une mort cellulaire à un stade précoce. Le $\Delta\Psi_m$ est mesuré par cytométrie en flux après coloration au DiOC₆(3). L'accumulation de ce fluorochrome cationique dans la mitochondrie dépend du $\Delta\Psi$. L'intensité de la fluorescence est donc fonction de $\Delta\Psi_m$. La perte de la capacité des mitochondries à accumuler cette sonde témoigne d'une chute du potentiel membranaire mitochondriale.

Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec DMF (25 μ M), MMF (25 μ M), biotine (10 et 100 nM) ou α -tocophérol (400 μ M). A la fin du traitement et après coloration au DiOC₆(3), une analyse par cytométrie en flux est réalisée. Les résultats sont présentés dans la **Figure 33**. Aucune différence du pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées n'a été observée entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec du DMF, du MMF ou de la biotine.

En présence du 7 β -OHC (50 μ M), une augmentation significative du pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées est observée comparativement à son véhicule (7 β -OHC :

33,0 ± 2,3%, EtOH : 5,0 ± 1,2%), ce qui reflète une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Ces effets sont fortement atténués suite à un prétraitement du 7 β -OHC avec DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) ou biotine (10 et 100 nM), suggérant une diminution de la chute du $\Delta\Psi_m$. Un effet similaire est observé quand le 7 β -OHC est associé à l' α -tocophérol (contrôle positif) (**Figure 33**).

Aucune différence significative du pourcentage de cellules avec mitochondries dépolarisées n'a été observée entre le contrôle et les véhicules ((EtOH 0,6%) et (DMSO 0,05%)) (**Figure 33**).

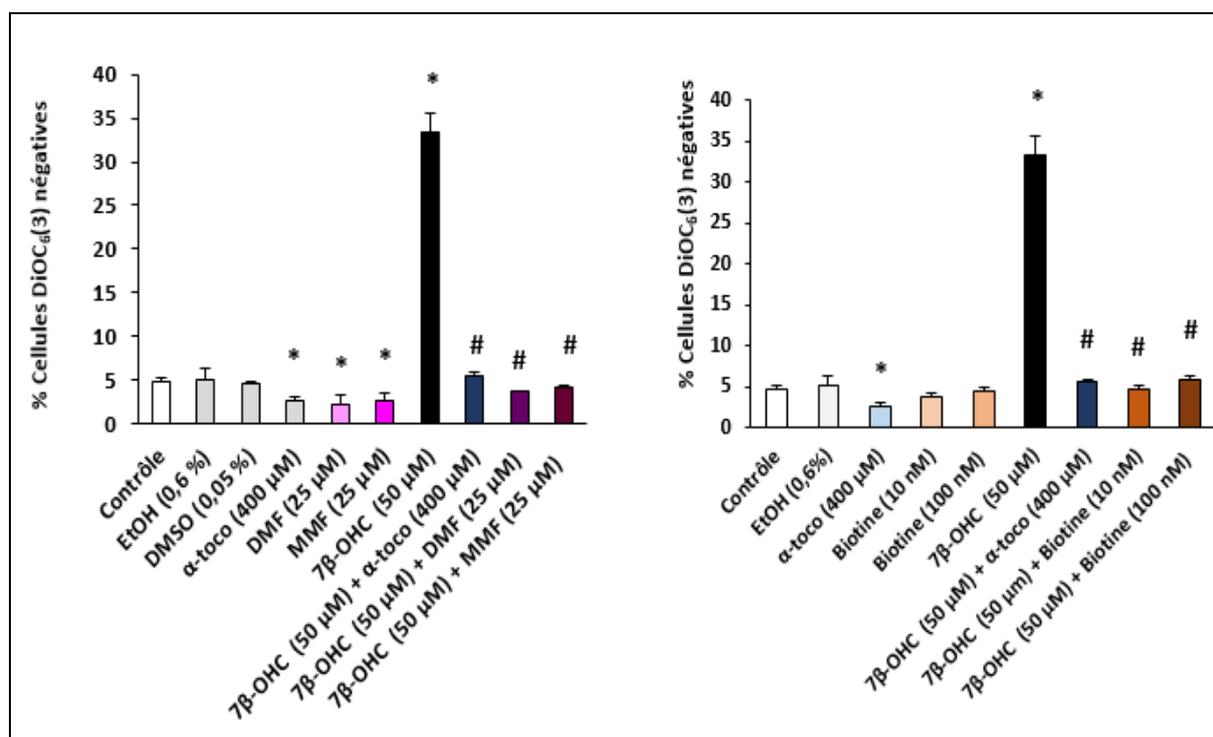


Figure 33 : Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #. Aucune

différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

5.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur le taux des cardiolipines

Les cardiolipines sont des phospholipides clés dans le fonctionnement de la mitochondrie. Elles sont situées dans la membrane mitochondriale interne où elles sont biosynthétisées. Elles jouent un rôle important dans le contrôle de la fonction mitochondriale nécessaire au transport des électrons, la phosphorylation oxydative et la production d'énergie (Paradies et al., 2014).

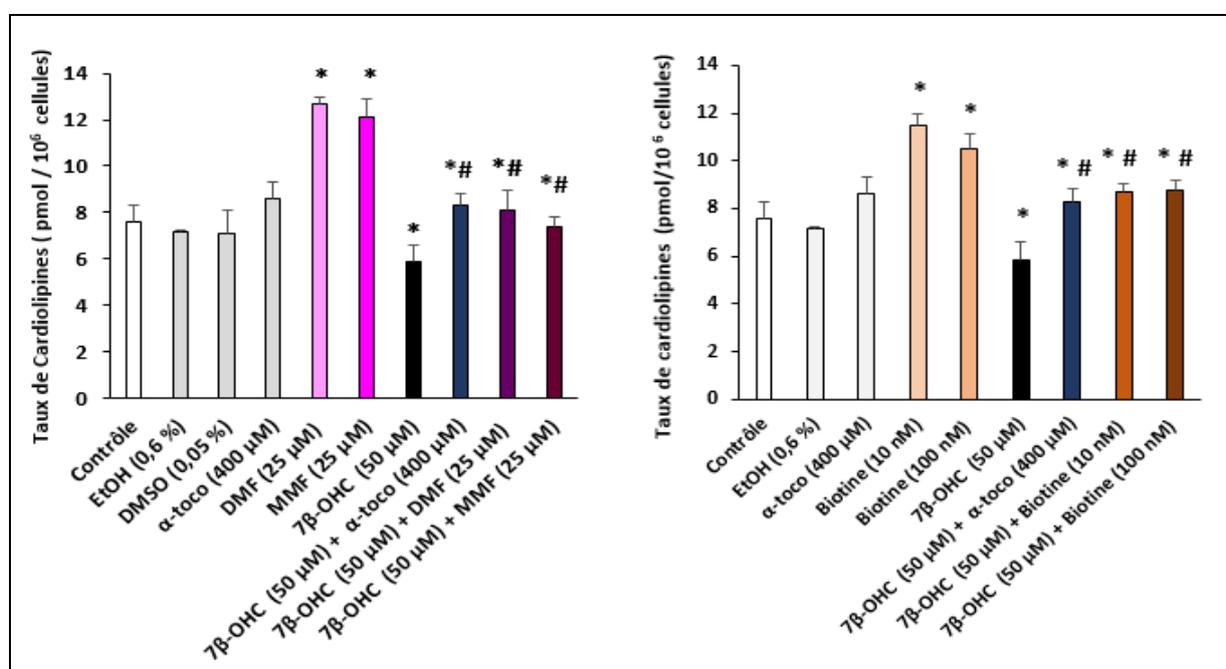


Figure 34 : Mesure du taux des cardiolipines sur les cellules traitées avec du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine, associées ou non au 7β-hydroxycholestérol

Les cellules 158N ont été traitées par le DMF (25 μM), le MMF (25 μM) et la biotine (10 et 100 nM), associées ou non au 7β-OHC (50 μM) pendant 24h. Les taux en cardiolipines sont évalués par spectrométrie de masse en tandem par chromatographie en phase liquide (LC-MS / MS). L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$)

entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

Il convient donc de déterminer les effets du DMF, du MMF et de la biotine, associés ou non au 7 β -OHC sur le taux des cardiolipines. Les résultats sont présentés dans la **Figure 34**.

Les taux les plus élevés de cardiolipines sont observés au niveau des cellules traitées avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM).

Suite au traitement des cellules 158N avec le 7 β -OHC (50 μ M), le taux des cardiolipines est significativement diminué par rapport au véhicule. Cependant, lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (400 μ M) une augmentation significative du taux des cardiolipines est observée comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC seul (**Figure 34**).

5.3. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la masse mitochondriale

Le MitoTracker Red est une sonde spécifique des mitochondries, qui se lie de manière covalente et permanente aux protéines mitochondriales des cellules métaboliquement actives. Cette sonde est utilisée pour évaluer la masse mitochondriale (**Zahm et al., 2003**). Pour cela les cellules 158N ont été traitées en présence ou en absence de DMF, de MMF, de la biotine ou de l' α -tocophérol associées ou non au 7 β -OHC. Une coloration au MitoTracker Red est réalisée sur les cellules mises en suspension. Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont présentés dans la **Figure 35**.

En présence de Mitotracker Red, l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) la plus importante est observée au niveau des cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M), ce qui suggère un gonflement mitochondrial (qui peut être la conséquence d'une mort cellulaire) et / ou d'une augmentation de la masse mitochondriale (moyen de lutte contre les dysfonctionnements mitochondriaux) (**Figure 35**). Cette augmentation est inhibée de manière significative en présence du DMF (25 μ M), MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) (**Figure 35**).

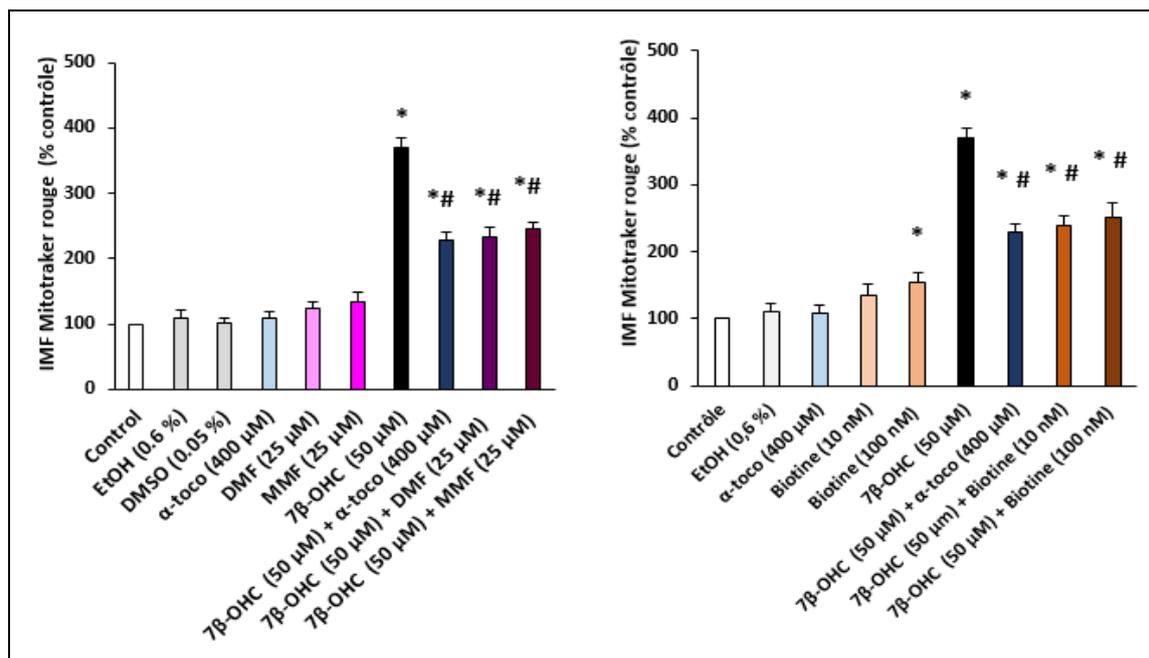


Figure 35 : Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur la masse mitochondriale

Après 24h du traitement, les variations de l'intensité moyenne de fluorescence sont évaluées par cytométrie en flux. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

5.4. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur la production d'anions superoxydes au niveau de la mitochondrie

La production d'anions superoxydes mitochondriaux est évaluée par cytométrie en flux après une coloration au MitoSOX. Une fois dans la mitochondrie, cette sonde est oxydée par $O_2^{\bullet-}$ et produit une fluorescence orange / rouge.

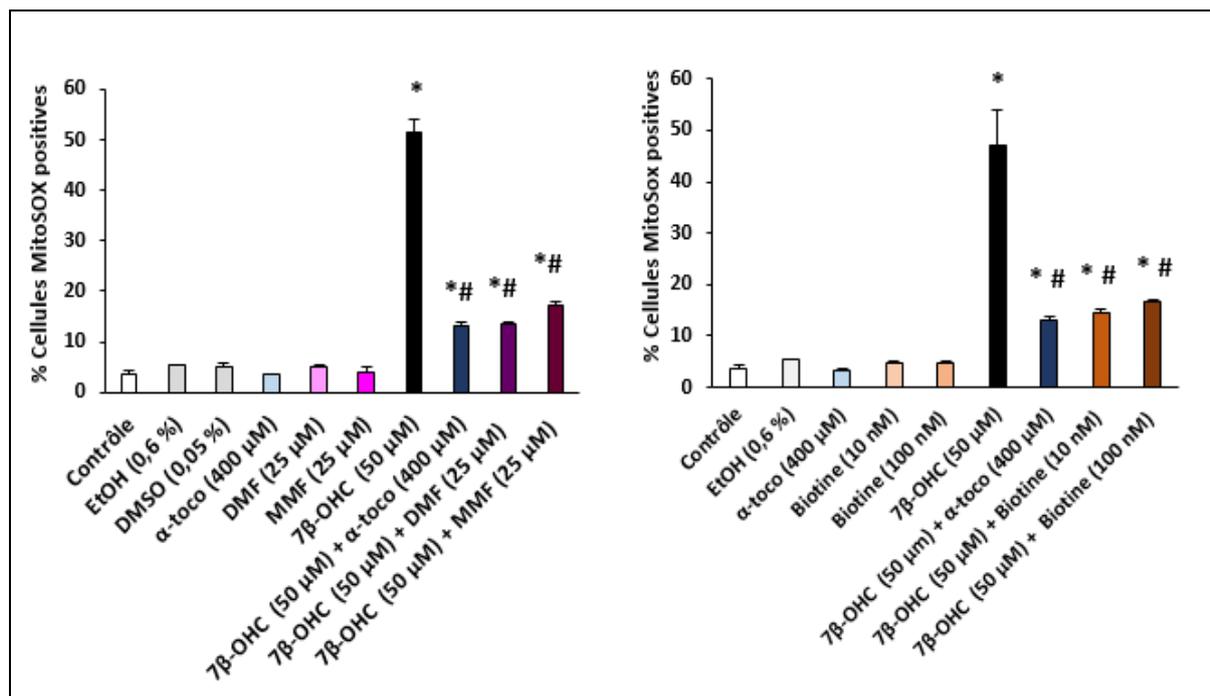


Figure 36 : Mesure de la production des anions superoxydes au niveau de la mitochondrie

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25 μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

Les cellules 158N sont traitées en présence ou en absence du DMF (25 μM), du MMF (25 μM), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l'α-tocophérol (400 μM) associés ou non au 7β-OHC (50 μM) pendant 24 h. Une coloration MitoSOX est réalisée sur les cellules mises en suspension. Les résultats obtenus après une analyse par cytométrie en flux sont présentés dans la **Figure 36**.

Les résultats d'analyse par cytométrie en flux ne montrent aucun effet sur les cellules traitées avec du DMF (25 μM), du MMF (25 μM), de la biotine (10 et 100 nM) et de l'α-tocophérol (400 μM) comparativement aux cellules non traitées (contrôles) et aux cellules traitées par les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)). En revanche, le traitement des cellules 158N avec

du 7 β -OHC (50 μ M) induit une augmentation significative du pourcentage des cellules MitoSOX positives, ce qui reflète une surproduction des anions O₂^{•-} mitochondriaux. Cette augmentation est fortement inhibée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF, au MMF, à la biotine ou l' α -tocophérol. Ceci montre une diminution de la production d'anions superoxydes mitochondriaux. Aucune différence n'a été révélée entre cellules contrôle et les véhicules (EtOH (0,6%) et DMSO (0,5%)) (**Figure 36**).

5.5. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur la glycolyse et le cycle du TCA

Le cycle d'acide tricarboxylique (cycle du TCA), également appelé cycle de krebs ou cycle de l'acide citrique, constitue une voie métabolique majeure permettant la production de l'énergie au niveau de la mitochondrie. En effet, cette voie métabolique utilise l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), issus de la glycolyse, pour produire de l'énergie. Le cycle de TCA est un carrefour métabolique qui se trouve au centre des différentes voies métaboliques cellulaires à savoir la gluconéogenèse, la transamination et la désamination des acides aminés et la lipogenèse (**Akram, 2014**). Il est donc important d'étudier l'effet de différentes molécules (DMF, MMF et biotine) associées ou non au 7 β -OHC sur les taux de différents acides organiques impliqués dans la glycolyse (acide lactique, acide pyruvique) et dans le cycle du TCA (acide succinique, acide fumarique, acide malique, acide citrique).

Ainsi, les cellules 158N sont traitées en présence ou en absence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM) associés ou non au 7 β -OHC (50 μ M) pendant 24 h. Une analyse des acides organiques par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectrométrie de masse a été réalisée. Les résultats sont présentés dans la **Tableau 6**.

Tableau 6 : Profil des acides organiques des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate, le monométhyle fumarate ou la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol

	Acides organiques					
	Glycolyse		Cycle du TCA			
	Acide lactique	Acide pyruvique	Acide succinique	Acide fumarique	Acide malique	Acide citrique
Contrôle	126.98 ± 7.99	15.27 ± 0.36	7.55 ± 0.11	1.33 ± 0.04	3.69 ± 0.1	4.79 ± 0.2
EtOH (0,6 %)	122.64 ± 3.53	14.13 ± 0.5	6.82 ± 0.05	1.22 ± 0.06	2.54 ± 0.08	3.84 ± 0.11
DMSO (0,05%)	125.90 ± 12.62	13.43 ± 0.78	6.88 ± 0.11	1.30 ± 0.03	2.36 ± 0.03	4.60 ± 0.06
DMF (25 μM)	97.30 ± 1.51	16.43 ± 1.48	6.97 ± 0.73	1.30 ± 0.03	2.36 ± 0.03	4.60 ± 0.06
MMF (25 μM)	104.84 ± 3.45	15.46 ± 0.01	7.18 ± 0.11	2.72 ± 0.05	4.93 ± 0.17	6.34 ± 0.04
Biotine (10 nM)	104.40 ± 9.81	16.16 ± 0.01	9.01 ± 0.3	1.59 ± 0.05	4.62 ± 0.08	4.52 ± 0.45
Biotine (100 nM)	110.75 ± 6.59	14.96 ± 0.65	8.61 ± 0.4	1.66 ± 0.14	4.30 ± 0.15	4.35 ± 0.27
7β-OHC (50 μM)	220.59 ± 2.5 *	8.11 ± 0.06 *	5.46 ± 0.01 *	0.93 ± 0.02 *	1.75 ± 0.08 *	2.80 ± 0.25 *
7β-OHC + DMF (25 μM)	147.63 ± 6.46 #	15.64 ± 0.87 #	7.41 ± 0.58 #	1.35 ± 0.16 #	4.67 ± 0.11 #	3.60 ± 0.05 #
7β-OHC + MMF (25 μM)	120.84 ± 4.03 #	12.55 ± 1.35 #	11.48 ± 0.45 #	1.78 ± 0.00 #	3.59 ± 0.08 #	4.07 ± 0.08 #
7β-OHC + Biotine (10 nM)	127.85 ± 7.09 #	18.86 ± 0.43 #	11.57 ± 0.23 #	1.83 ± 0.17 #	4.48 ± 0.17 #	3.56 ± 0.35 #
7β-OHC + Biotine (100 nM)	104.98 ± 2.27 #	17.48 ± 0.5 #	14.92 ± 0.8 #	2.24 ± 0.06 #	5.63 ± 0.19 #	4.95 ± 0.00 #

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (SD) de 3 expériences indépendantes. L'analyse des données est réalisée par le test de Mann whitney. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

Le traitement des cellules 158N avec du 7β-OHC (50 μM) induit une augmentation significative de la quantité d'acide lactique (lactate) (220,59 ± 2,50 ng / million de cellules), comparativement au véhicule (122,64 ± 3,53 ng / million de cellules). Cependant, lorsque le DMF, le MMF ou la biotine ont été associés au 7β-OHC, une diminution significative du taux de lactate a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7β-OHC seul (Tableau 6). De plus, la quantité d'acide pyruvique (pyruvate) est significativement réduite

dans les cellules traitées avec du 7 β -OHC ($8,11 \pm 0,06$ ng / million de cellules) par rapport aux cellules traitées avec la véhicule ($14,13 \pm 0,50$ ng / million de cellules). Cette diminution est significativement atténuée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF, au MMF ou à la biotine (10 et 100 nM), par rapport à la 7 β -OHC seul (**Tableau 6**).

D'autre part, une diminution marquée des taux d'acide succinique (succinate), d'acide fumarique (fumarate), d'acide malique (malate) et d'acide citrique (citrate) est observée sous l'effet du traitement avec du 7 β -OHC (50 μ M) comparativement au véhicule (EtOH 0,6%). Ces effets ont été significativement inhibés lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF, au MMF ou à la biotine (**Tableau 6**). Ces résultats soulignent la capacité du DMF, du MMF et de la biotine de réguler le cycle du TCA.

6. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le fonctionnement peroxysomal

6.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'expression du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3

Le transporteur ABCD3 est un constituant majeur de la membrane peroxysomale. Il est impliqué dans le transport de l'acide pristanique, de l'acide dicarboxylique et des intermédiaires des acides biliaires (acide di- et trihydroxycholestanoïque (DHCA / THCA) (**Kemp et al., 2011**). Le transporteur ABCD3 est considéré comme un bon biomarqueur pour évaluer la masse peroxysomale et peut ainsi apporter des informations sur la biogenèse des peroxysomes (**Gray et al., 2014**).

La topographie et l'expression de ce transporteur peroxysomal sont respectivement évaluées par microscopie à fluorescence conventionnelle et par cytométrie en flux après un immunomarquage indirecte, en utilisant un anticorps primaire dirigé contre la protéine ABCD3 et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488.

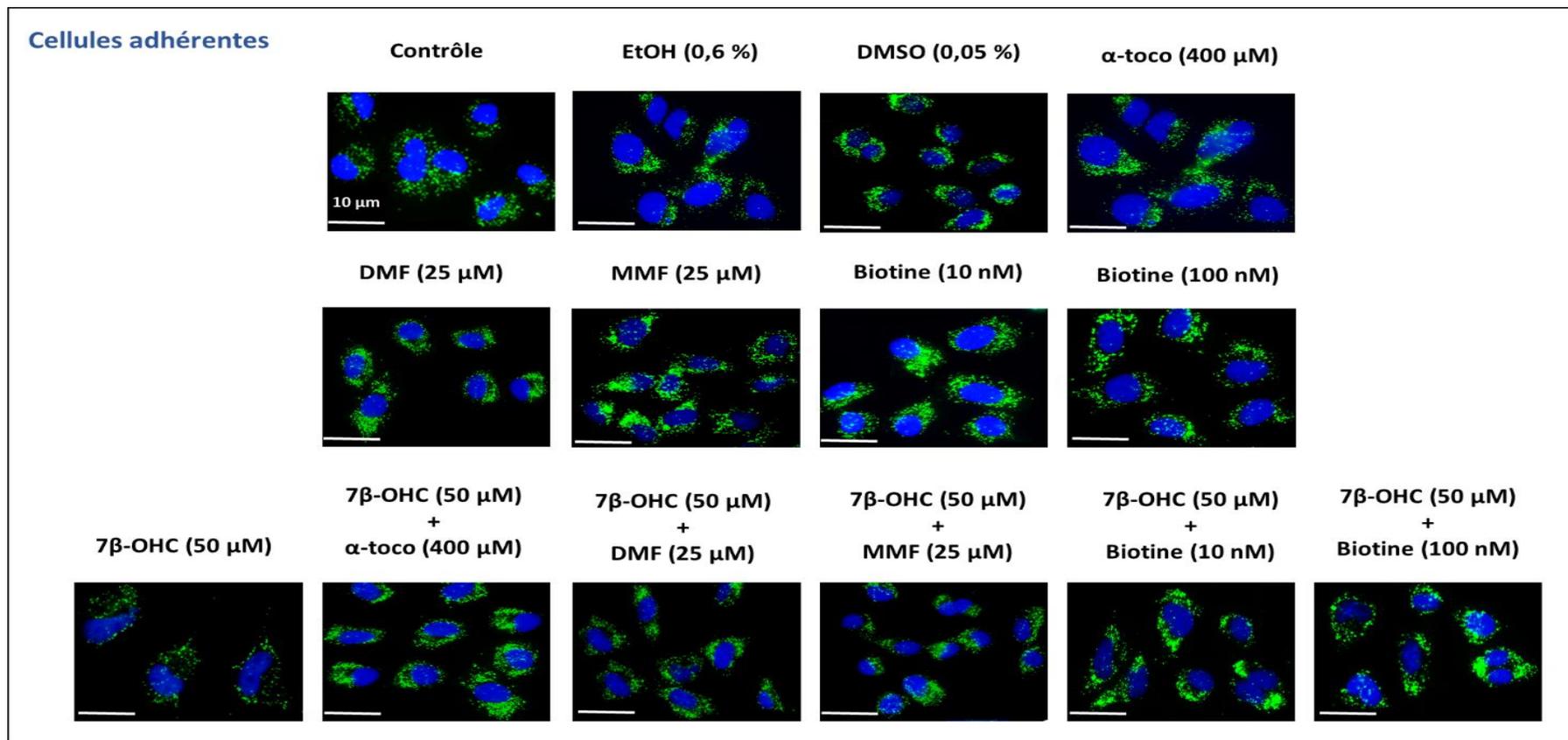


Figure 37 : Observation au microscope à fluorescence de l'expression et de la topographie de la protéine ABCD3 au niveau des cellules 158N.

Les cellules 158N ont été traitées en présence ou en absence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) pendant 24h en absence ou en présence du 7 β -OHC (50 μ M). Une observation des cellules au microscope à fluorescence est réalisée après immunomarquage en utilisant un anticorps polyclonal anti-ABCD3. Une contre coloration des noyaux au Hoechst 33342 (1 μ g/mL) a été réalisée.

Afin d'étudier l'incidence de différents traitements (DMF, MMF et biotine) sur la topographie du transporteur peroxysomal ABCD3 au niveau des cellules 158N, un immunomarquage est effectué sur des cellules cultivées sur des lamelles en verre et traitées par le DMF (25 μ M), le MMF (25 μ M), la biotine (10 et 100 nM) ou l' α -tocophérol (400 μ M) associés ou non au 7 β -OHC (50 μ M). Les résultats sont présentés dans la **Figure 37**.

L'observation des cellules 158N par microscopie à fluorescence a révélé une répartition homogène des peroxysomes dans les cellules contrôle et les véhicules (Ethanol (0,6%) et DMSO (0,05%).

Une densité plus élevée de peroxysomes est observée dans le cytoplasme des cellules traitées avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) associées ou non au 7 β -OHC (50 μ M). Cependant, une faible densité en peroxysomes est observée suite au traitement avec du 7 β -OHC (50 μ M) seul (**Figure 37**).

En outre, une analyse par cytométrie en flux a été réalisée afin de confirmer les résultats des observations microscopiques. Les résultats sont présentés dans la **Figure 38**.

L'analyse des taux d'ABCD3 sur les cellules 158N n'a révélé aucune différence entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées aux véhicules (Ethanol (0,6 %) et DMSO (0,05 %)).

Suite au traitement au 7 β -OHC (50 μ M), une diminution significative de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) des cellules exprimant ABCD3 a été observée. Cette diminution est significativement inhibée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou α -tocophérol (400 μ M) (**Figure 38**).

De plus, une augmentation du pourcentage des cellules avec un niveau réduit, c'est-à-dire diminué, d'ABCD3 a été observée sous traitement avec 7 β -OHC (50 μ M) (**Figure 38**). Cette augmentation est fortement diminuée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF, au MMF ou à la biotine avec des valeurs inférieures à celles du contrôle et du véhicule. Ce même effet est observé lorsque le 7 β -OHC est associé à l' α -tocophérol (400 μ M) (**Figure 38**).

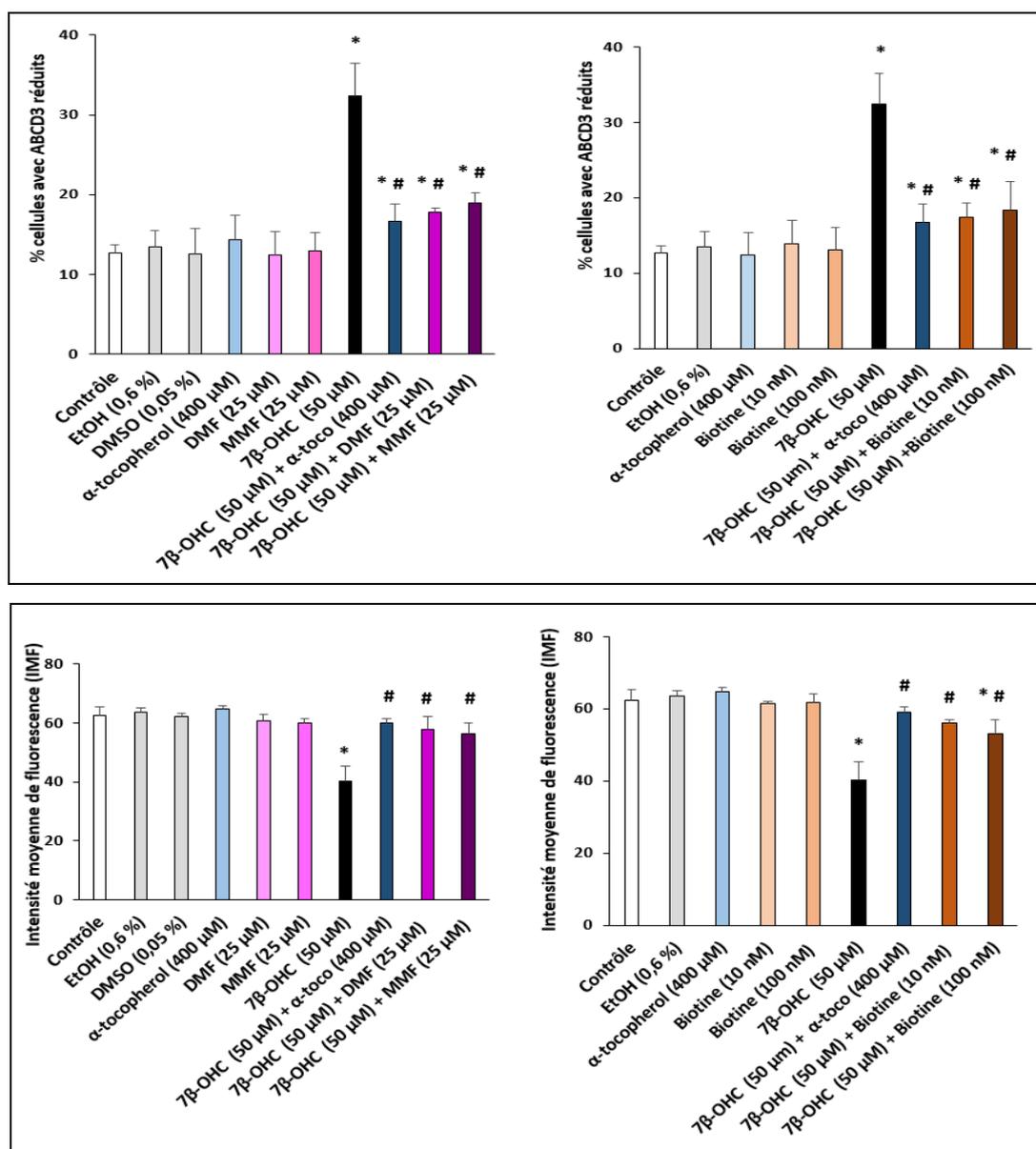


Figure 38 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycolestérol sur l’expression de la protéine peroxysomale ABCD3

L’analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (SD) de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n’a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)).

6.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur les niveaux d'expression des ARNm des transporteurs transmembranaires peroxysomaux (ABCD1 et ABCD3)

Les protéines ABCD1 et ABCD3 sont des transporteurs transmembranaires peroxysomaux jouant un rôle important dans la β -oxydation des acides gras à très longues chaînes (AGTLC).

En plus de son rôle dans le métabolisme lipidique, ABCD1 intervient dans le maintien de l'équilibre Redox (Kemp et al., 2011). Tandis que ABCD3 est impliqué dans le transport des acides gras branchés, des précurseurs des acides biliaires et des acides dicarboxyliques (Kemp et al., 2011). Il est donc important de déterminer les effets du DMF, du MMF, et de la biotine, associés ou non au 7 β -OHC sur les niveaux de l'expression des ARNm des transporteurs peroxysomaux.

6.2.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le niveau d'expression d'ARNm de la protéine ABCD1

Les cellules 158N ont été traitées en présence ou en absence du DMF, du MMF, de la biotine ou de l' α -tocophérol (contrôle positive), associés ou non au 7 β -OHC (50 μ M). Ensuite, une PCR quantitative a été réalisée pour amplifier spécifiquement l'ADN du gène ABCD1. Les résultats sont présentés dans la **Figure 39**.

Les résultats ont montré des niveaux similaires d'expression d'ARNm du transporteur peroxysomal (ABCD1) entre le contrôle, les cellules traitées avec du véhicule (EtOH (0,6 %)), du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM). Le traitement des cellules avec de l' α -tocophérol (400 μ M) a montré une augmentation significative du niveau d'expression d'ARNm du gène ABCD1 comparativement au véhicule (EtOH (0,6 %)).

Cependant, une nette diminution du niveau d'expression d'ARNm du ABCD1 dans les cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) a été remarquée, comparativement aux cellules traitées avec du véhicule ou les cellules non traitées (contrôle) (**Figure 39**). En présence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M), la diminution du taux d'expression d'ARNm du gène ABCD1 est fortement atténuée (**Figure 39**).

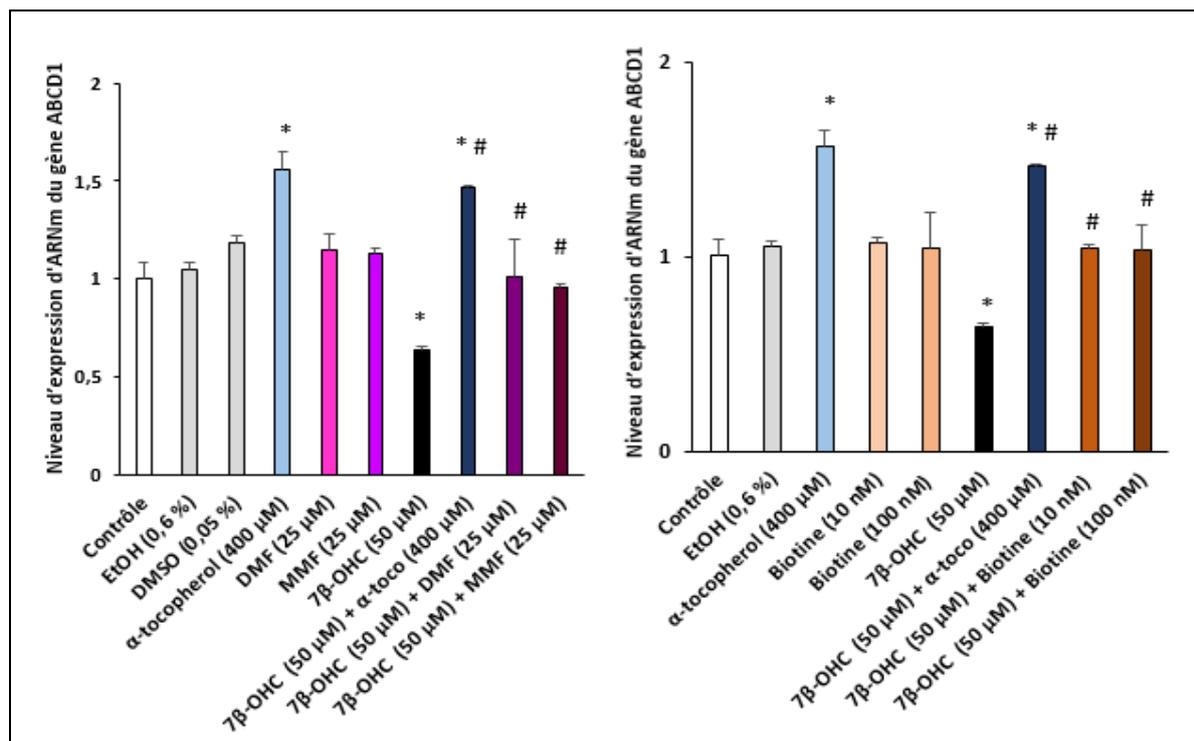


Figure 39 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur le taux d'expression d'ARNm du gène ABCD1

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (SD) de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'est observée entre contrôle et EtOH (0,6%).

6.2.2. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur l'ARNm de la protéine ABCD3

Les cellules 158N ont été cultivées dans des boîtes de Petri (100 x 20 mm), pendant 24 h, prétraitées ou non avec du DMF (25 μM), du MMF (25 μM), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l'α-tocophérol (400 μM) 2 h avant l'ajout du 7β-OHC (50 μM). Après 24 h de traitement, le taux d'expression d'ARNm de la protéine peroxysomale (ABCD3) est déterminé par RT-qPCR. Les résultats sont présentés dans la **Figure 40**.

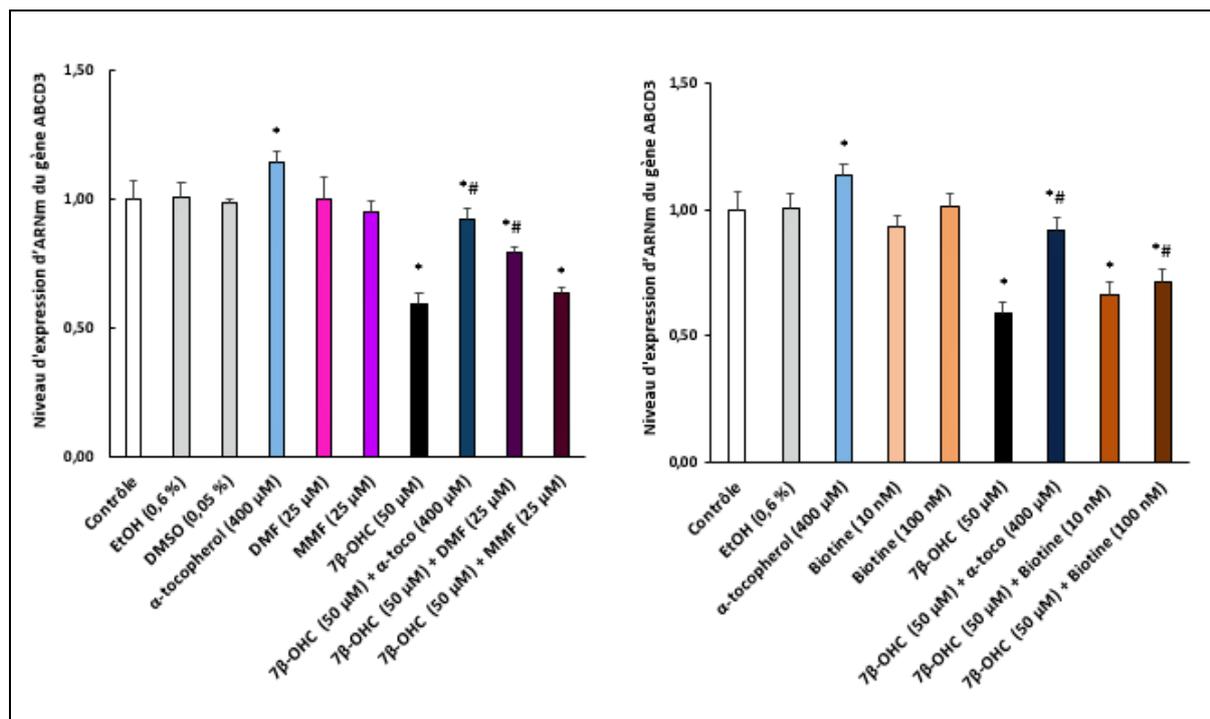


Figure 40 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycolestérol sur le taux d’expression d’ARNm du gène ABCD3

L’analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (SD) de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n’est observée entre contrôle et EtOH (0,6%).

Sous l’effet du DMF (25 μM), du MMF (25 μM) et de la biotine (10 et 100 nM), aucun changement du niveau d’expression de l’ARNm d’ABCD3 n’a été observé comparativement aux cellules non traitées (contrôle) et/ ou des cellules traitées avec du véhicule (EtOH (0,6%)). Cependant, une augmentation significative du niveau d’expression d’ARNm du gène ABCD3 a été observée au niveau des cellules traitées par l’α-tocophérol (400 μM) comparativement au contrôle et/ou aux cellules traitées avec du véhicule (EtOH (0,6%)) (Figure 40).

Sous l'effet du 7 β -OHC (50 μ M), les niveaux d'expression d'ARNm du gène ABCD3 ont été significativement diminués. L'association du 7 β -OHC (50 μ M) avec du DMF (25 μ M), de la biotine (100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) a montré une augmentation significative du niveau d'expression d'ARNm d'ABCD3, comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) (**Figure 40**).

6.3. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur les niveaux d'expression d'ARNm des enzymes impliquées dans la β -oxydation des acides gras à très long chaîne dans le peroxysome

Les transporteurs peroxysomaux ABCD1 et ABCD3 sont impliqués dans le transport des AGTLC du cytosol vers le peroxysome en vue de leur dégradation par la voie de la β -oxydation peroxysomale. Cette voie fait appel aux oxydases à savoir l'enzyme Acyl-CoA oxydase1 (ACOX1), et la protéine-2 multifonctionnelle (MFP2), également connu sous le nom de protéine D-bifonctionnelle. Ces enzymes, sont aussi impliqués dans le contrôle de l'équilibre RedOx dont la rupture pourrait contribuer à la démyélinisation aboutissant à une perte de l'intégrité axonale qui conduit à la neurodégénérescence. Il est donc important de déterminer l'effet du DMF, du MMF et de la biotine associé ou non au 7 β -OHC sur les taux d'expression des ARNm des protéines ACOX1 et MFP2.

6.3.1. Incidence sur le niveau d'expression du gène ACOX1

La protéine ACOX 1 est une enzyme clé dans la voie de la β -oxydation peroxysomale. Elle catalyse la première réaction de la voie de la β -oxydation des AGTLC. L'impact du DMF, du MMF et de la biotine, associés au 7 β -OHC (50 μ M) sur les niveaux d'expression de l'ARNm de la protéine ACOX1 a été évalué sur les cellules 158N. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 41**.

Les résultats ont montré que sous l'effet du 7 β -OHC, le niveau d'expression de l'ARNm du gène ACOX1 est significativement diminué comparativement aux cellules non traitées (contrôle) ou aux cellules traitées avec le véhicule (ETOH (0,6%)). En présence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM), aucune différence n'a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) seul. Cependant, cette diminution de l'expression d'ARNm du gène ACOX1 a été corrigée en présence de α -tocophérol (400 μ M) (utilisé comme contrôle positif). Les taux d'ARNm dans les cellules contrôles et véhicule sont similaires (**Figure 41**).

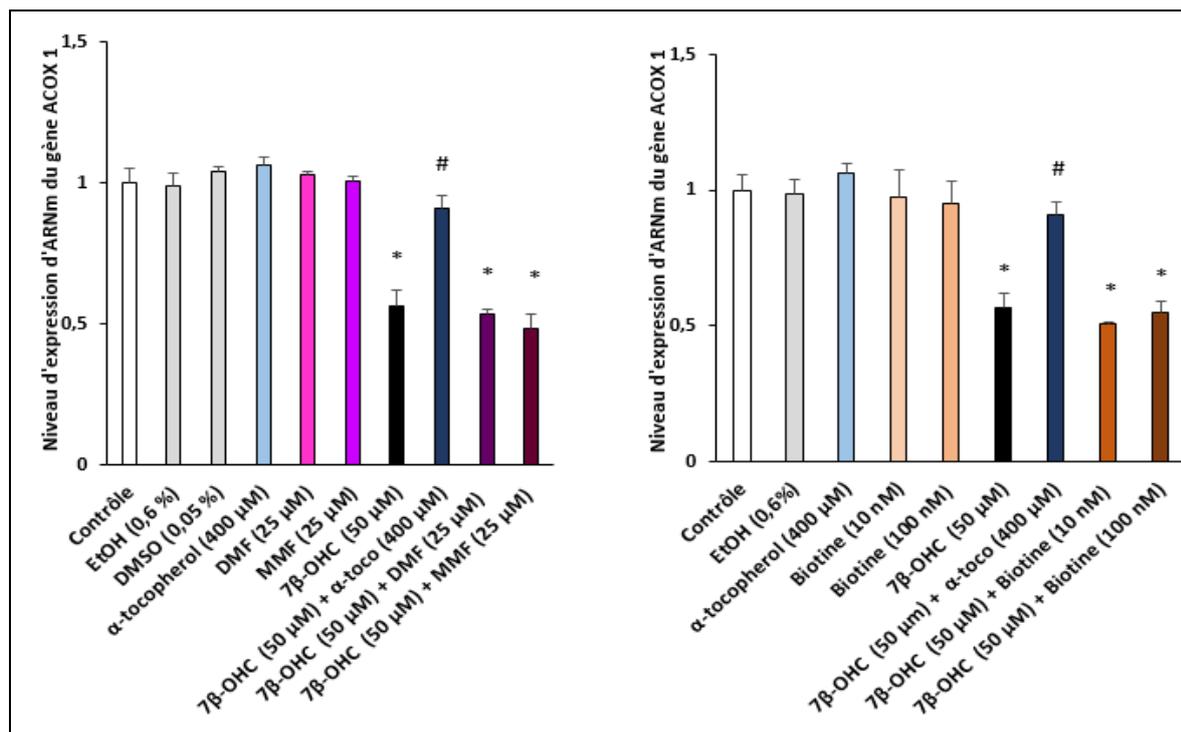


Figure 41: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycolestérol sur le niveau d'expression d'ARNm du gène ACOX 1

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type (SD) de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 µM), (7β-OHC + MMF (25µM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'est observée entre contrôle et EtOH (0, 6%).

6.3.2. Incidence sur le niveau d'expression du gène MFP2

La protéine-2 multifonctionnelle (MFP2) est une enzyme qui catalyse la deuxième réaction de la voie de la β-oxydation peroxysomale. L'évaluation du taux d'expression de l'ARNm du gène MFP2 a montré que le traitement des cellules avec du 7β-OHC (50 µM) induit une diminution significative par rapport aux cellules non traitées (contrôle) ou les cellules traitées avec le véhicule (EtOH) (**Figure 42**).

Il est intéressant de noter que la diminution des niveaux d'ARNm de MFP2 induite par le 7β-OHC (50 µM) est significativement atténuée en présence du DMF (25 µM), du MMF (25

μM) ou de la biotine (10 et 100 nM). En présence de l' α -tocophérol (400 μM), une augmentation significative du taux d'expression d'ARNm de MFP2 a été observée, comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μM) ainsi que les cellules non traitées et les cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6 %)). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules contrôle et le véhicule (Ethanol) (**Figure 42**).

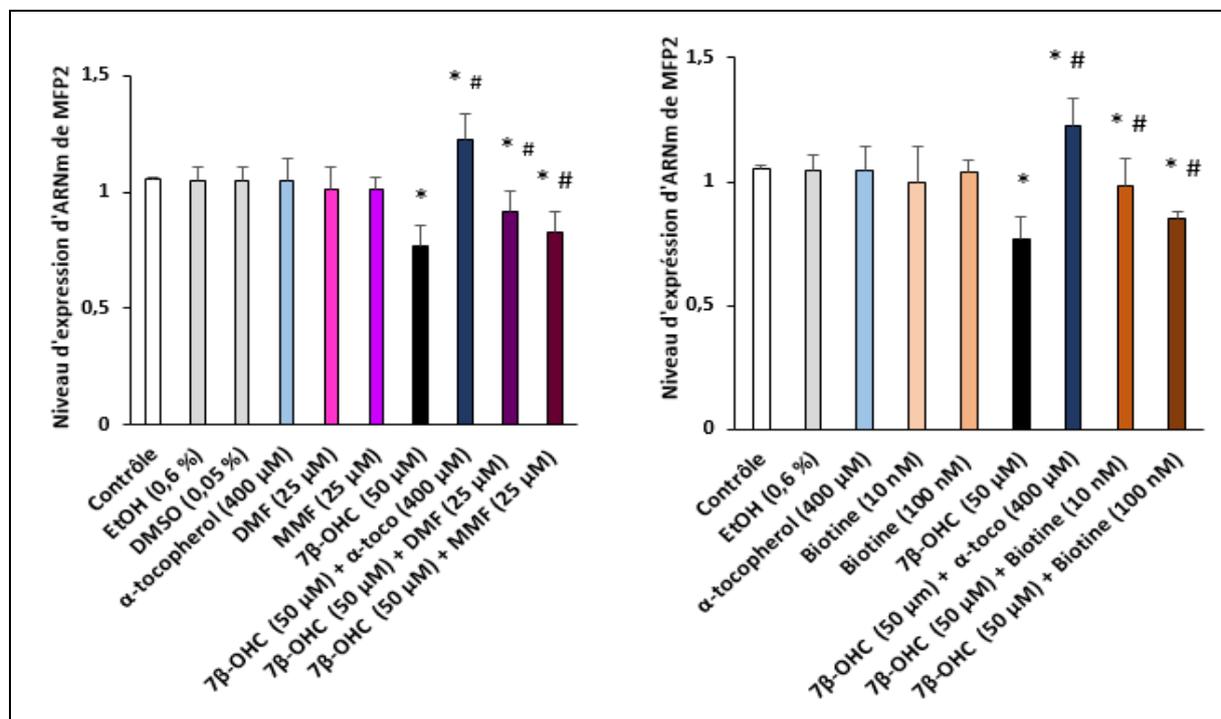


Figure 42 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le taux d'expression d'ARNm du gène MFP2

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h en absence ou en présence du 7 β -OHC (50 μM) associées ou non au DMF (25 μM), MMF (25 μM), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μM) (2 h de prétraitement). Les ARNm de la protéine MFP2 sont quantifiés par RT-qPCR. À cette fin, le gène 36B4 est utilisé comme gène de référence. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type (SD) de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μM), (7 β -OHC + MMF (25 μM), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol);

sont indiquées par #. Aucune différence significative n'est observée entre contrôle et EtOH (0,6%).

6.4. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur les niveaux d'expression d'ARNm des enzymes impliquées dans la synthèse des plasmalogènes

Le DHAPAT (dihydroxyacétone phosphate acyl-transférase) et l'ADHAPS (alkyl dihydroxyacétone phosphate synthase) sont deux enzymes peroxysomales situées du côté luminal de la membrane peroxysomale (Brites et al., 2004; Wanders et al., 2016).

L'impact du DMF, du MMF, de la biotine ou de l' α -tocophérol associés ou non au 7 β -OHC (50 μ M) sur les niveaux d'expression d'ARNm des protéines impliquées dans la synthèse des plasmalogènes, en particulier le DHAPAT et l'ADHPS, a été évalué au niveau des cellules 158N. Sous l'effet du 7 β -OHC, les niveaux d'expression des ARNm des gènes de DHAPAT et de ADHAPS sont significativement diminués par rapport aux cellules non traitées (contrôle) et au véhicule (EtOH (0,6%)) (Figure 43). Cette diminution est fortement atténuée en présence de l' α -tocophérol (400 μ M).

Une légère augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de DHAPAT a été observée en présence de la biotine (10 et 100 nM), comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M). Aucune différence n'a été observée entre les cellules contrôles et le véhicule (Ethanol) (Figure 43).

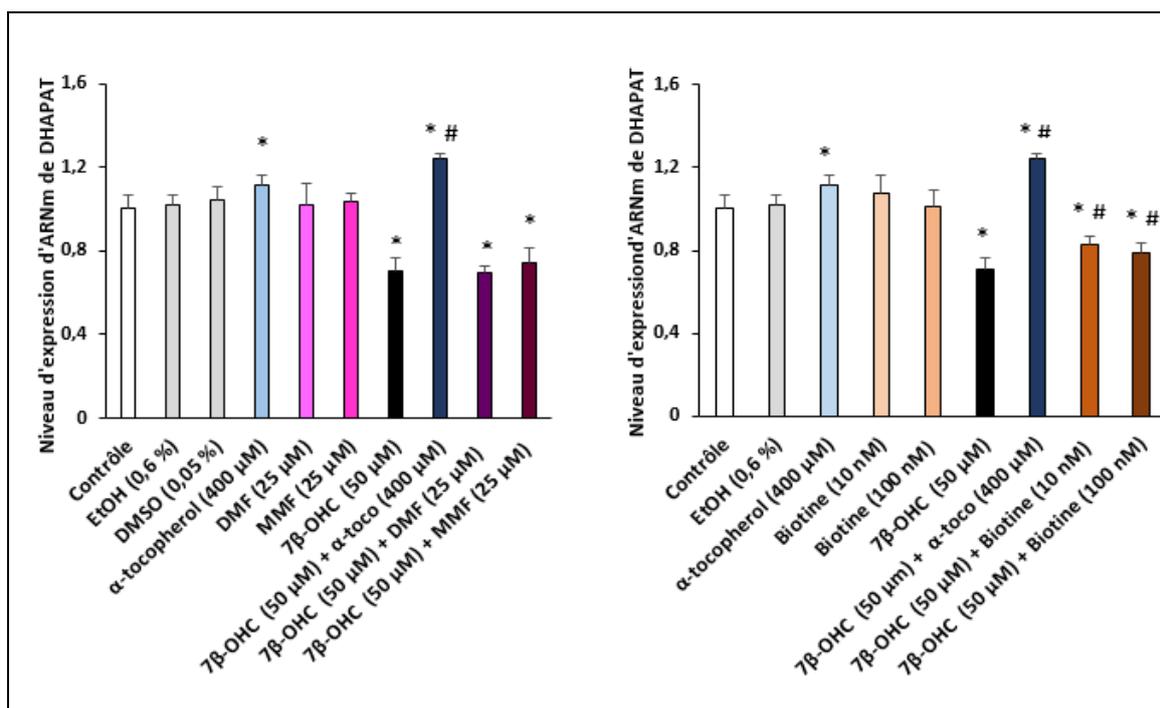
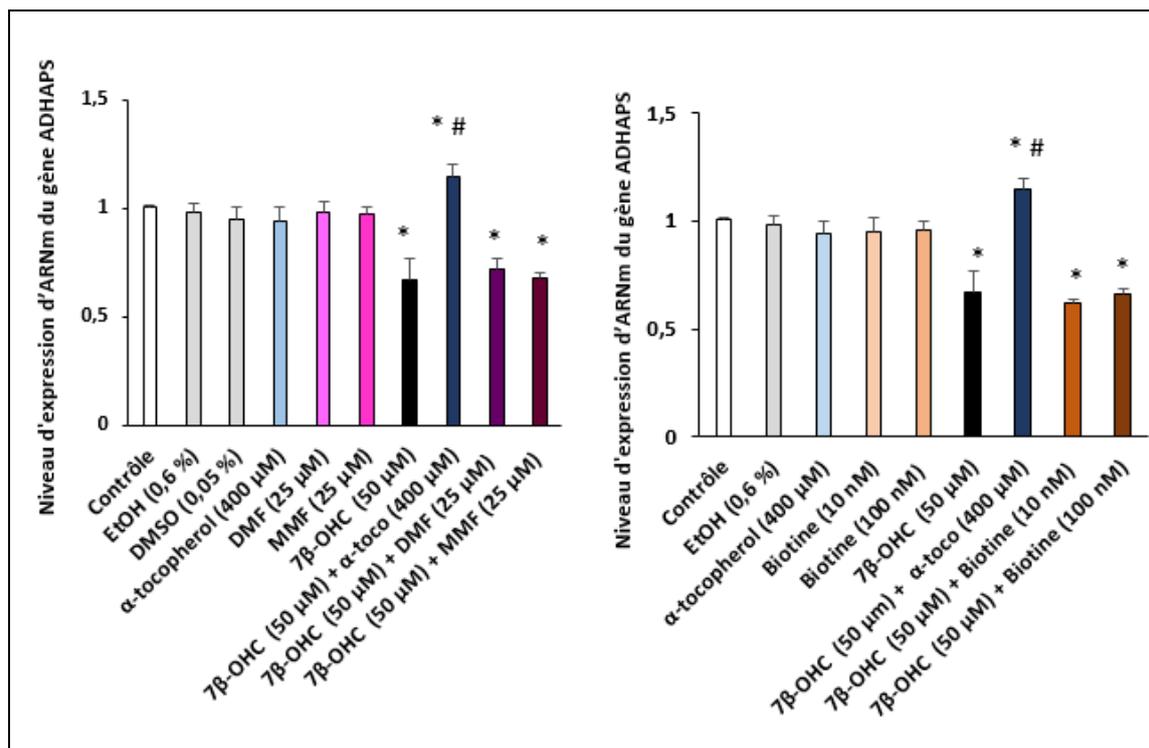


Figure 43 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur le taux d'expression d'ARNm des gènes impliqués dans la synthèse des plasmalogènes DHAPAT et ADHAPS.

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h en absence ou en présence de 7β-OHC (50 μM) associées ou non au DMF (25μM), MMF (25μM), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l'α-

tocophérol (400 μ M) (2 h de prétraitement). Les ARNm des enzymes de la synthèse de la plasmalogène peroxysomal DHAPT et ADHPS ont été quantifiés par RT-qPCR. À cette fin, 36B4 est utilisé comme gène de référence. L'analyse statistique des données a été faite par le test de Mann whitney. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type (SD) de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'est observée entre contrôle et EtOH (0, 6%).

7. Evaluation des modifications ultrastructurales par microscopie électronique à transmission

Etant donné que les mitochondries et les peroxysomes sont des organites étroitement liés, les effets du 7 β -OHC associés ou non au DMF, sur les modifications ultrastructurales des cellules 158N (effets sur les peroxysomes et les mitochondries) ont été évalués par microscopie électronique à transmission. Les résultats sont présentés dans la **Figure 44**.

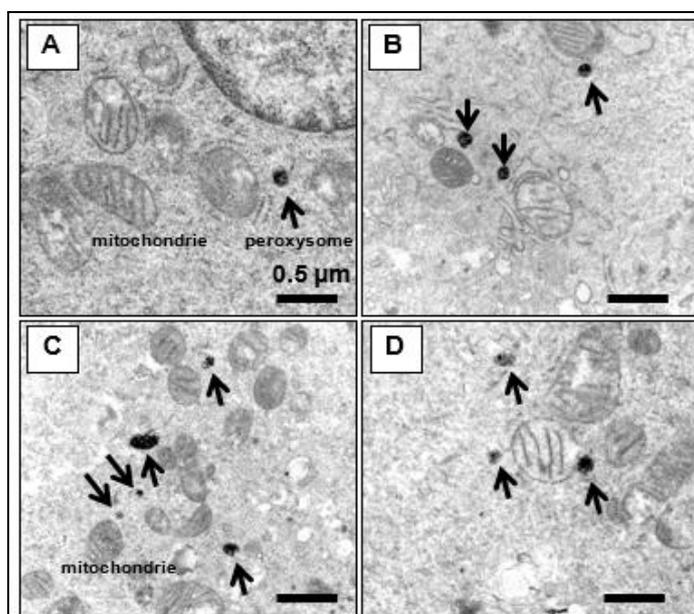


Figure 44 : Caractérisation ultrastructurale par microscopie électronique à transmission des mitochondries et des peroxysomes des cellules oligodendrocytaires murines 158N traitées en absence ou en présence du 7 β -hydroxycholestérol associées ou non au diméthyle fumarate

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC, 50 μ M) associées ou non au DMF (25 μ M). Les aspects

ultrastructuraux des mitochondries et des peroxysomes dans les cellules 158N non traitées, contrôle (A) et traitées par DMF (B), le 7 β -OHC (C) et le (7 β -OHC + DMF) (D).

L'observation microscopique des cellules 158N nous a permis de mettre en évidence des constituants cellulaires essentiels à savoir les mitochondries et les peroxysomes. Les cellules non traitées (contrôle) ou traitées avec du DMF (25 μ M) présentent des mitochondries plus au moins allongées et des peroxysomes de forme arrondi (**Figure 44**). Cependant, des changements majeurs au niveau de la taille et de la forme de ces constituants cellulaires ont été observés lorsque les cellules 158N ont été traitées avec du 7 β -OHC. Ainsi, plusieurs peroxysomes de formes irrégulières ont été visualisés, souvent plus gros ou plus petits que ceux trouvés dans les cellules contrôle et les cellules traitées par le DMF. De plus, plusieurs mitochondries de formes et de tailles différentes par rapport à celles trouvées dans le contrôle ont été visualisées (**Figure 44**). Il est à noter que ces modifications de la morphologie peroxysomale et mitochondriale ont été atténués lorsque le 7 β -OHC a été associé au DMF (**Figure 44**). En effet, on remarque que les peroxysomes ont repris leurs formes arrondies et que les mitochondries sont devenues plus grandes par rapport à celles trouvées dans les cellules traitées avec du 7 β -OHC. Globalement, nos données démontrent que la 7 β -OHC induit plusieurs types de dommages mitochondriaux et que le DMF a de puissants effets protecteurs au niveau mitochondrial et peroxysomal.

8. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur le profile lipidique

Les mitochondries et les peroxysomes jouent également un rôle important dans la synthèse des phospholipides et dans le métabolisme du cholestérol et des acides gras (**Faust and Kovacs, 2014**). Ceci nous a conduit à étudier les effets du DMF, MMF et de la biotine associés ou non au 7 β -OHC sur le métabolisme des stérols et des acides gras ainsi que sur les teneurs en sphingomyélines et en phosphatidycholine.

8.1. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol, sur le métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est une molécule essentielle au niveau cérébral. En effet, le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol dans le corps. Cependant en raison de sa structure, il est sensible à l'auto-oxydation produisant ainsi des dérivés du cholestérol oxydés nommés oxystérols (**Iuliano, 2011**).

Pour cela, la régulation de l'homéostasie du cholestérol est très importante pour un bon fonctionnement cérébral (**Björkhem and Meaney, 2004; Ragot et al., 2011**) et par conséquent, des altérations du métabolisme du cholestérol peuvent conduire à des niveaux cérébraux anormaux des oxystérols qui peuvent être formés par voie enzymatique ou par auto-oxydation (**Iuliano, 2011**).

La mesure du taux du cholestérol a été effectuée sur les cellules 158N traitées avec du DMF, du MMF et de la biotine, associées ou non au 7 β -OHC a été effectué par CPG/SM. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7**.

En présence du 7 β -OHC, une diminution significative du taux du cholestérol a été observée comparativement aux cellules non traitées ou aux cellules traitées avec l'éthanol (EtOH (0,6%)). Cette diminution a été significativement atténuée en présence de la biotine (10 et 100 nM), du DMF (25 μ M) mais pas avec du MMF (25 μ M), comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) (**Tableau 7**).

De même, une diminution significative du taux du lathostérol (précurseur du cholestérol) a été observée suite au traitement avec du 7 β -OHC (50 μ M) comparativement aux cellules non traitées ou aux cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)). la réduction du taux du lathostérol s'est accentuée lorsque le 7 β -OHC a été associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M) ou à la biotine (10 et 100 nM), comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) (**Tableau7**).

En plus, Suite au traitement des cellules 158N avec du 7 β -OHC (50 μ M), une diminution marquée du taux du desmostérol a été observée par rapport aux cellules non traitées (contrôle) ou aux cellules traitées avec le véhicule (EtOH). En présence du DMF (25 μ M) ou du MMF (25 μ M), le taux du desmostérol a été significativement réduit comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC. Cependant, la quantité de ce précurseur a significativement augmenté lorsque le 7 β -OHC a été associé à la biotine (10 et 100 nM) (**Tableau 7**). De plus, une diminution significative du lanostérol a été observée, suite au traitement des cellules 158N avec du 7 β -OHC (50 μ M) comparativement aux cellules non traitées ou aux cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6 %)). Cette diminution est significativement inhibée en présence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM) (**Tableau 7**).

De plus, les produits d'auto-oxydation du cholestérol connu sous le nom des oxystérols (triol, cétocholestérol (7KC) et 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC)) ont été mesurés dans les mêmes

conditions. En présence du 7 β -OHC, des taux élevés en oxystérols ont été observés, favorisaient ainsi leurs accumulations et / ou leurs interactions avec les cellules (**Tableau 7**).

En effet, après 24 h d'incubation avec du 7 β -OHC (50 μ M), le taux de cet oxystérol présent dans les cellules, ne représentent que 1% de la quantité du 7 β -OHC introduite dans le milieu de culture. De même et en accord avec la capacité de cet oxystérol à stimuler le stress oxydant, des taux plus élevés de triol et de 7KC ont également été observés par rapport aux cellules contrôles et aux cellules traitées avec le véhicule. Cette augmentation a été significativement atténuée lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M) ou à la biotine (10 et 100 nM) (**Tableau 7**). Bien que les niveaux du triol et du 7KC soient significativement réduits, lorsque la 7 β -OHC est associé au DMF, au MMF ou à la biotine, l'augmentation du taux du 7 β -OHC, observée en présence du 7 β -OHC seul, s'est accentuée après prétraitement avec le DMF ou la biotine (**Tableau 7**).

Tableau 7: Profil du cholestérol, ses précurseurs (lathostérol, desmostérol, lanostérol) et des oxystérols (triol, 7-cétocholestérol, 7β – hydroxycholestérol) dans des cellules 158N traitées par le diméthylfumarate, le monométhylfumarate et la biotine associées ou non au 7β-hydroxycholestérol

	Cholestérol	Précurseurs du cholestérol			Oxysterols		
		Lathostérol	Desmostérol	Lanostérol	Triol	7KC	7β-OHC
Contrôle	2.84 ± 0.01	14.80 ± 0.15	12.93 ± 0.37	0.63 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.62 ± 0.00
EtOH (0,6%)	2.86 ± 0.02	14.08 ± 0.02	12.08 ± 0.13	0.58 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.59 ± 0.00	0.66 ± 0.04
DMSO (0.05%)	2.64 ± 0.03	13.64 ± 0.36	10.01 ± 0.42	0.45 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.42 ± 0.06	0.56 ± 0.02
DMF (25 μM)	2.72 ± 0.11	14.93 ± 0.19	9.58 ± 0.26	0.65 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.51 ± 0.00	0.62 ± 0.07
MMF (25 μM)	2.83 ± 0.10	17.10 ± 0.94	10.07 ± 0.50	0.69 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.60 ± 0.09	2.94 ± 0.07
Biotine (10 nM)	2.84 ± 0.07	26.86 ± 0.53	9.84 ± 0.13	0.86 ± 0.01	0.08 ± 0.05	0.63 ± 0.38	1.47 ± 4.49
Biotine (100 nM)	2.34 ± 0.03	43.25 ± 1.46	11.08 ± 0.07	0.81 ± 0.03	0.02 ± 0.00	0.39 ± 0.02	1.48 ± 0.10
7β-OHC (50 μM)	2.17 ± 0.13 *	8.53 ± 0.17 *	6.46 ± 0.07 *	0.23 ± 0.01 *	1.89 ± 0.16 *	10.88 ± 0.34 *	246.70 ± 0.59 *
7β-OHC (50 μM) + DMF (25 μM)	2.56 ± 0.05 #	5.33 ± 0.14 #	6.20 ± 0.07 #	0.66 ± 0.03 #	0.86 ± 0.01 #	5.72 ± 0.39 #	470.12 ± 9.95 #
7β-OHC (50 μM) + MMF (25 μM)	2.16 ± 0.12	6.72 ± 0.34 #	5.08 ± 0.21 #	0.32 ± 0.00 #	0.88 ± 0.29 #	9.33 ± 0.47 #	446.67 ± 6.19
7β-OHC (50 μM) + Biotine (10 nM)	2.75 ± 0.06 #	7.55 ± 0.21 #	6.95 ± 0.18 #	0.34 ± 0.04 #	1.40 ± 0.10 #	7.09 ± 0.05 #	500.46 ± 1.12 #
7β-OHC (50 μM) + Biotine (100 nM)	2.78 ± 0.13 #	6.01 ± 0.12 #	8.05 ± 0.31 #	0.39 ± 0.04 #	0.92 ± 0.06 #	7.44 ± 0.41 #	569.84 ± 26.95 #

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD de trois expériences indépendantes. La différence significative entre le véhicule (EtOH 0,6%) et les cellules traitées au 7β-OHC est indiquée par * (test de Mann-Whitney; P <0,05); La différence significative entre les cellules traitées par 7β-OHC et les cellules traitées par (7β-OHC + DMF), (7β-OHC + MMF) ou (7β-OHC + biotine (10 et 100 nM)) est indiquée par # (test de Mann-Whitney; p <0,05). Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle, EtOH et le DMSO

8.2. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol, sur le profil des acides gras cellulaires

Afin d'identifier les effets du DMF, du MMF de la biotine, associés ou au non au 7 β -OHC sur le métabolisme des acides gras, un profil des acides gras a été déterminé par CPG/SM, après traitement des cellules 158N en présence ou en absence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) et de la biotine (10 et 100 nM) associés ou non au 7 β -OHC (50 μ M) pendant 24h. Les résultats sont présentés dans les **Tableaux 8, 9, 10, 11, 12 et 13**.

En présence du 7 β -OHC (50 μ M), une diminution significative de la somme des taux des acides gras saturés (Σ AGS (C <22)) a été observée, comparativement aux cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)). En effet, une diminution significative des taux d'acide myristique (C14:0), d'acide palmitique (C16:0), d'acide stéarique (C18:0) et d'acide arachidique (C20:0) a été observée dans les cellules 158N traitées par le 7 β -OHC comparativement aux cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)). Cependant, la somme des taux des acides gras saturés à très longue chaîne (Σ AGTLC (C \geq 22)) est 3 fois plus élevé au niveau des cellules traitées avec du 7 β -OHC par rapport aux cellules traitées avec le véhicule. Les taux de l'acide béhénique (C22:0), de l'acide tétracosanoïque (C24:0), et de l'acide cérotique (C26:0) ont significativement augmentés dans les cellules traitées avec du 7 β -OHC, comparativement au véhicule (Ethanol (EtOH (0,6%))) (**Tableau 8**).

Lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), une diminution significative la somme des taux des acides gras saturés (Σ AGS (C <22)) ainsi que la somme des taux des acides gras saturés à très longue chaîne (Σ AGTLC (C \geq 22)). Une diminution significative des taux de C20:0, C22:0, C24:0 et de C26:0 a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) (**Tableau 8**). Cependant, lorsque les cellules 158N ont été traitées simultanément avec du MMF (25 μ M) et du 7 β -OHC (50 μ M), une augmentation de la somme des taux des acides gras saturés (Σ AGS) et une diminution de la somme des taux d'acides gras saturés à très longue chaîne (Σ AGTLC (C \geq 22)) ont été observées comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) (**Tableau 8**). En effet, une augmentation significative des taux de C16:0, C18:0, C20:0 et une diminution significative des taux de C22:0, C24:0 et de C26:0 ont été observées comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Profil des acides gras saturés au niveau des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate et le monométhyle fumarate associées ou non au 7β-hydroxycholestérol

	Contrôle	EtOH (0,6%)	DMSO (0,05%)	DMF (25 µM)	MMF (25 µM)	7β-OHC (50 µM)	7β-OHC (50 µM) + DMF (25 µM)	7β-OHC (50 µM) + MMF (25 µM)
C14:0	109.48 ± 0.30	101.56 ± 0.86	79.45 ± 0.46	98.99 ± 3.83 *	99.55 ± 5.57 *	81.82 ± 0.36 *	49.48 ± 4.56 #	85.74 ± 5.30 *
C16:0	2360.32 ± 5.67	2300.14 ± 40.89	2247.38 ± 8.37	1934.86 ± 0.36 *	2320.20 ± 45.94 *	1727.54 ± 29.59 *	1650.60 ± 14.00 *#	2553.74 ± 23.91*#
C18:0	1240.25 ± 21.80	1169.50 ± 22.09	941.92 ± 10.14	875.63 ± 22.65 *	1338.75 ± 7.60 *	722.54 ± 16.83 *	805.03 ± 6.67 *#	829.81 ± 2.14 *#
C20:0	29.40 ± 2.49	24.36 ± 1.17	25.19 ± 1.26	20.04 ± 0.64 *	19.90 ± 0.05 *	10.83 ± 1.14 *	8.61 ± 1.03 *#	13.59 ± 0.25 *#
C22:0	4.61 ± 0.54	4.49 ± 0.18	4.69 ± 0.01	4.38 ± 0.12 *	4.79 ± 0.53	8.19 ± 0.26 *	5.97 ± 0.06 #	6.68 ± 0.49 *#
C24:0	8.32 ± 0.31	8.27 ± 0.18	7.68 ± 0.03	8.61 ± 0.36 *	11.10 ± 3.24 *	24.58 ± 0.84 *	7.52 ± 0.70 #	10.22 ± 0.58 *#
C26:0	1.47 ± 0.13	1.51 ± 0.28	1.56 ± 0.04	3.78 ± 0.24 *	2.54 ± 0.07 *	11.85 ± 0.91 *	5.79 ± 0.45*#	7.96 ± 0.34 *#
ΣAG (C<22)	3739.44 ± 44.69	3595.56 ± 16.77	3293.94 ± 0.05	2929.52 ± 2.18 *	3778.41 ± 59.16 *	2542.72 ± 14.26 *	2513.71 ± 26.26*	3482.88 ± 31.60 #
ΣAGSTLC (C≥22)	14.40 ± 0.98	14.27 ± 0.08	13.93 ± 0.07	16.78 ± 0.71 *	18.42 ± 3.85*	44.62 ± 2.01 *	19.28 ± 1.09 *#	24.87 ± 1.42 *#
Σ AGS Total	3753.84 ± 43.70	3609.83 ± 16.69	3307.87 ± 0.02	2946.30 ± 1.47 *	3796.83 ± 63.00 *	2587.34 ± 12.25 *	2533.00 ± 27.35 *#	3507.75 ± 30.18 *#

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart type de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par*, Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 µM) et (7β-OHC + MMF (25µM) sont indiquées par #. Σ AGS: Somme des acides gras saturés; Σ AGSTLC: Somme des acides gras saturés à très longue chaîne; Σ Totale AGS : Somme totale des acides gras saturés.

Par ailleurs, lorsque les cellules 158N ont été traitées avec du 7β -OHC et de la biotine (10 et 100 nM), une augmentation significative de la somme des taux des acides gras saturés (\sum AGS) a été observée associée à une diminution significative de la somme des taux des acides gras saturés à très longues chaînes (\sum AGSTLC) et une augmentation de la somme des taux des des acides gras saturés (C<22) (\sum AGS (C<22)) par rapport aux cellules traitées avec du 7β -OHC (50 μ M) (**Tableau 9**).

En présence de biotine (10 et 100 nM), une augmentation des taux de C14:0, C16:0, C18:0 et C20:0 a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7β -OHC (50 μ M) (**Tableau 9**). Par ailleurs, une diminution significative du taux d'acide béhénique (C22:0), a été observée en présence de la biotine (10 nM), tandis qu'une augmentation significative a été observée avec la biotine (100 nM) comparativement aux cellules traitées avec le 7β -OHC seul (**Tableau 9**). De plus, une diminution significative du taux d'acide tétracosanoïque (C24:0) et d'acide cérotique (C26: 0) a été observée en présence de la biotine (10-100 nM) comparativement aux cellules traitées avec du 7β -OHC seul (**Tableau 9**).

Tableau 9: Profil des acides gras saturés au niveau des cellules 158N traitées par la biotine associée ou non au 7β-hydroxycholestérol

	Contrôle	Véhicule (EtOH: 0,6%)	Biotine (10 nM)	Biotine (100 nM)	7β-OHC (50 μM)	7β-OHC + Biotine (10 nM)	7β-OHC + Biotine (100 nM)
C14:0	109.48 ± 0.30	101.56 ± 0.86	123.25 ± 5.55 *	101.94 ± 10.44	81.82 ± 0.36 *	138.08 ± 1.69* #	123.57 ± 6.17 *#
C16:0	2360.32 ± 25.67	2300.14 ± 40.89	2806.87 ± 17.60 *	2626.80 ± 62.15 *	1727.54 ± 29.59 *	2828.48 ± 25.40 *#	2786.07 ± 5.10 *#
C18:0	1240.25 ± 21.80	1169.50 ± 22.09	1238.28 ± 13.84	1217.26 ± 2.43	722.54 ± 16.83 *	1539.69 ± 35.82 *#	1334.08 ± 29.33 *#
C20:0	29.40 ± 2.49	24.36 ± 1.17	19.03 ± 1.72 *	13.36 ± 0.48 *	10.83 ± 1.14 *	17.00 ± 1.03 *#	19.37 ± 0.38 *#
C22:0	4.61 ± 0.54	4.49 ± 0.18	6.46 ± 0.01 *	4.89 ± 0.45	8.19 ± 0.26 *	7.53 ± 0.15 *#	10.00 ± 0.47 *#
C24:0	8.32 ± 0.31	8.27 ± 0.18	12.48 ± 0.01 *	8.36 ± 0.02	24.58 ± 0.84 *	20.62 ± 0.37* #	15.38 ± 1.09 *#
C26:0	1.47 ± 0.13	1.51 ± 0.28	2.67 ± 0.14 *	1.79 ± 0.38	11.85 ± 0.91 *	9.84 ± 0.45 *#	7.51 ± 0.15 *#
∑ AGS (C<22)	3739.44 ± 44.69	3595.56 ± 16.77	4187.43 ± 0.07 *	3959.36 ± 53.67 *	2542.72 ± 14.26 *	4523.25 ± 63.94 *#	4263.09 ± 30.02 *#
∑ AGSTLC (C≥22)	14.40 ± 0.98	14.27 ± 0.08	21.61 ± 0.12 *	15.04 ± 0.05	44.62 ± 2.01 *	37.99 ± 0.96 *#	32.89 ± 1.71 *#
∑ Totale AGS	3753.84 ± 43.70	3609.83 ± 16.69	4209.03 ± 0.05*	3974.40 ± 53.62 *	2587.34 ± 12.25 *	4561.24 ± 62.98 *#	4295.98 ± 31.73 *#

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart type de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par * (test de Mann-Whitney ; $P < 0,05$). Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + Biotine (10 nM)) ou (7β-OHC + biotine (100 nM)) sont indiquées par #. ∑ AGS : Somme des acides gras saturés ; ∑ AGSTLC: Somme des acides gras saturés à très longue chaîne; ∑ Totale AGS : Somme du totale des acides gras saturés.

Par ailleurs, l'analyse des acides gras mono-insaturés (AGMI) a révélé une diminution significative de la somme des taux d'acide gras mono-insaturé (Σ AGMI) suite au traitement des cellules 158N avec du 7β -OHC (50 μ M) comparativement aux cellules traitées avec du véhicule (EtOH (0,6%)). Ainsi, les taux de l'acide myristoléique (C14:1 n-5), l'acide sapiénique (C16:1 n-10), l'acide palmitoléique (C16:1 n-7), l'acide cis-vaccénique (C18:1 n-7), l'acide éicinéonéique (C20:1 n-9), l'acide éicisénoïque (C20:1 n-7) et l'acide érucique (C22:1 n-9) ont été significativement réduits en présence du 7β -OHC (50 μ M) par rapport aux cellules traitées avec le véhicule. Cependant, dans les mêmes conditions, les taux acides gras monoinsaturés à très longue chaîne tels que l'acide nervonique (C24:1 n-9) et l'acide hexacosaoïque (C26:1 n-9) ont été augmentés comparativement aux cellules non traitées ou les cellules traitées avec le véhicule (**Tableau 10**).

Des effets presque similaires sur le profil des AGMI ont été observés, lorsque les cellules 158N ont été traitées avec du DMF ou MMF, 2 h avant l'ajout du 7β -OHC. En fait, tous les niveaux des AGMI se sont rapprochés de ceux des cellules non traitées ou des cellules traitées avec le véhicule, à l'exception de C16:1 n-10 ou n-9 et C16:1 n-7, dont les taux étaient plus élevés que ceux des cellules non traitées ou des cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)). Lorsque les cellules 158N ont été traitées simultanément avec du 7β -OHC (50 μ M) et DMF (25 μ M) ou MMF (25 μ M) une augmentation significative des taux de C14:1 n-5, de C16:1 n-10, de C16:1 n-7, de C18:1 n-7, de C20:1 n-9, de C20:1 n-7 et C22:1 n-9 et une diminution significative de C24:1 n-9 et de C26:1 n-9 ont été observées, comparativement aux cellules traitées avec du 7β -OHC (50 μ M) (**tableau 10**).

Il est intéressant de noter qu'une fois ajoutées seules, ces molécules (DMF et MMF) et en particulier le MMF, ont pu augmenter de manière significative les niveaux de plusieurs AGMI, par rapport au véhicule correspondant (DMSO (0,05%)) (**Tableau 10**).

Tableau 10: Profil des acides gras mono-insaturés au niveau des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate et le monométhyle fumarate associées ou non au 7β-hydroxycholestérol

	Contrôle	EtOH (0,6%)	DMSO (0,05%)	DMF (25 μM)	MMF (25 μM)	7β-OHC (50 μM)	7β-OHC (50 μM) + DMF (25 μM)	7β-OHC (50 μM) + MMF (25 μM)
C14:1 n-5	2.19 ± 0.00	2.10 ± 0.02	1.53 ± 0.22	2.22 ± 0.16 *	3.29 ± 0.16 *	1.61 ± 0.09 *	1.82 ± 0.05 *#	1.71 ± 0.20
C16:1 n-10	231.31 ± 6.96	230.16 ± 9.14	175.46 ± 3.55	176.83 ± 13.98	241.36 ± 6.80 *	207.41 ± 6.36 *	274.92 ± 6.32 *#	276.70 ± 14.62 *#
C16:1 n-7	454.04 ± 26.71	420.16 ± 28.80	352.91 ± 10.09	400.29 ± 4.27 *	553.16 ± 11.81 *	313.62 ± 11.98 *	373.66 ± 2.06 *#	545.29 ± 4.92 *#
C18:1 n-9	2239.11 ± 16.15	2035.46 ± 48.32	1812.39 ± 30.35	2053.93 ± 47.61 *	2487.96 ± 8.81 *	1970.72 ± 36.33	1746.52 ± 0.25 *#	1759.29 ± 0.74 *#
C18:1 n-7	502.24 ± 8.92	464.92 ± 46.02	448.74 ± 28.15	546.50 ± 18.31 *	718.05 ± 51.47 *	403.71 ± 2.75 *	452.47 ± 31.14 #	439.80 ± 1.16 #
C20:1 n-9	62.63 ± 3.25	54.37 ± 0.23	56.61 ± 2.99	91.13 ± 8.80 *	84.90 ± 4.67 *	16.82 ± 0.11 *	55.57 ± 0.17#	55.03 ± 1.27 #
C20:1 n-7	32.03 ± 0.04	34.63 ± 0.47	35.26 ± 0.16	24.77 ± 2.21 *	27.13 ± 0.48 *	5.65 ± 1.00 *	12.83 ± 0.45 *#	14.74 ± 0.40 *#
C22:1 n-9	2.37 ± 0.05	2.34 ± 0.04	2.00 ± 0.06	2.96 ± 0.14 *	2.85 ± 0.25 *	2.29 ± 0.16	3.06 ± 0.20 #	2.25 ± 0.11
C24:1 n-9	12.58 ± 0.53	13.01 ± 0.01	14.61 ± 0.51	22.37 ± 0.58 *	24.19 ± 1.78 *	32.71 ± 0.96 *	23.52 ± 1.44 *#	23.99 ± 2.85 *#
C26:1 n-9	0.59 ± 0.03	0.62 ± 0.00	0.57 ± 0.04	1.25 ± 0.05 *	1.32 ± 0.05 *	2.27 ± 0.08 *	1.30 ± 0.02 *#	1.64 ± 0.03 *#
ΣAGMI	3539.09 ± 47.48	3257.77 ± 17.64	2900.09 ± 13.39	3322.26 ± 78.18 *	4144.22 ± 55.05*	2956.82 ± 13.18 *	2945.67 ± 20.57*	3120.44 ± 22.97 #

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules.

L'analyse statistique des données est réalisée par le tes de Mann whitney. Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart type de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par*, Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM) et (7β-OHC + MMF (25μM) sont indiquées par #. ΣAGMI ; somme des acides gras mono-insaturés.

Tableau 11: Profil des acides gras mono-insaturés au niveau des cellules 158N traitées par la biotine associée ou non au 7β-hydroxycholestérol

	Contrôle	Véhicule (EtOH: 0,6%)	Biotine (10 nM)	Biotine (100 nM)	7β-OHC (50 μM)	7β-OHC + Biotine (10 nM)	7β-OHC + Biotine (100 nM)
C14:1 n-5	2.19 ± 0.00	2.10 ± 0.02	3.34 ± 0.14 *	3.32 ± 0.19 *	1.61 ± 0.09 *	2.34 ± 0.08 #	2.18 ± 0.18 #
C16:1 n-10	231.31 ± 6.96	230.16 ± 9.14	297.48 ± 9.00 *	273.97 ± 12.24 *	207.41 ± 6.36 *	285.44 ± 7.43 *#	226.04 ± 5.61 #
C16:1 n-7	454.04 ± 26.71	420.16 ± 28.80	617.21 ± 19.11 *	574.15 ± 14.72 *	313.62 ± 11.98 *	617.24 ± 7.88 *#	622.45 ± 0.69 *#
C18:1 n-9	2239.11 ± 16.15	2035.46 ± 48.32	2317.24 ± 26.52 *	2519.05 ± 39.06 *	1970.72 ± 36.33	2391.74 ± 85.82* #	2147.86 ± 25.81 #
C18:1 n-7	502.24 ± 8.92	464.92 ± 46.02	670.29 ± 33.45 *	478.28 ± 20.01	403.71 ± 2.75 *	651.32 ± 1.43 *#	482.86 ± 2.72 #
C20:1 n-9	62.63 ± 3.25	54.37 ± 0.23	74.37 ± 4.77 *	68.47 ± 0.43 *	16.82 ± 0.11 *	58.64 ± 1.79 #	50.22 ± 2.96#
C20:1 n-7	32.03 ± 0.04	34.63 ± 0.47	37.54 ± 1.82 *	23.88 ± 2.18 *	5.65 ± 1.00 *	26.96 ± 1.49 *#	26.50 ± 1.17 *#
C22:1 n-9	2.37 ± 0.05	2.34 ± 0.04	3.47 ± 0.01 *	3.35 ± 0.00 *	2.29 ± 0.16	3.33 ± 0.09 *#	2.35 ± 0.08
C24:1 n-9	12.58 ± 0.53	13.01 ± 0.01	29.20 ± 0.27 *	16.89 ± 0.42 *	32.71 ± 0.96 *	33.61 ± 0.20*	26.31 ± 0.83 *#
C26:1 n-9	0.59 ± 0.03	0.62 ± 0.00	1.22 ± 0.03 *	0.62 ± 0.03	2.27 ± 0.08 *	2.03 ± 0.01 *#	1.50 ± 0.10 *#
ΣAGMI	3539.09 ± 47.48	3257.77 ± 17.64	4051.37 ± 27.41 *	3962.00 ± 84.09 *	2956.82 ± 13.18 *	4072.65 ± 99.38* #	3588.28 ± 22.11*#

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart type de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par * (test de Mann-Whitney; $P < 0,05$). Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + Biotine (10 nM)) ou (7β -OHC + biotine (100 nM)) sont indiquées par #. ΣAGMI ; somme des acides gras mono-insaturés.

Lorsque les cellules 158N ont été traitées avec de la biotine (10 et 100 nM) et du 7 β -OHC (50 μ M), une augmentation significative de la plupart des AGMI ainsi qu'une réduction significative des taux d'acide nervonique (C24:1 n-9) et d'acide hexacénoïque (C26:1 n-9) ont été observées, par rapport aux cellules traitées avec du 7 β -OHC. De plus, dans les mêmes conditions, une augmentation significative de la somme des AGMI a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC seul. En effet, dans ces conditions de traitements, les taux des AGMI se sont normalisés (**Tableau 11**).

Pour les acides gras poly-insaturés (AGPI), une diminution significative de tous les AGPI a été observée suite au traitement des cellules 158N avec du 7 β -OHC (50 μ M), comparativement aux cellules non traitées ou les cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)).

Le traitement des cellules 158N avec du DMF ou du MMF pendant 24 h a montré une augmentation des taux de l'acide linoléique (C18:2 n-6), de l'acide arachidonique (AA; C20:4 n-6) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA; C22:6 n-3) par rapport à leur véhicule (DMSO (0,05%)).

Lorsque les cellules 158N ont été traitées successivement avec du DMF (25 μ M) ou MMF (25 μ M) et du 7 β -OHC, une normalisation des niveaux de tous les AGPI a été observée (**Tableau 12**), à l'exception de l'AA et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA; C20:5 n-3) (**Tableau 12**).

Cependant, en présence de la biotine (10 et 100 nM) une augmentation des niveaux d'AGPI a été observée, comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC seul (**Tableau 13**).

En présence du 7 β -OHC, une diminution significative des tous les AGPI, de la somme des AGPI n-3 et de la somme des AGPI n-6 par rapport aux cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)). Ces niveaux ont été significativement corrigés en présence de la biotine (10 et 100 nM) utilisée en pré-traitement, comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC seul (**Tableau 13**).

D'autres part, le 7 β -OHC induit une augmentation significative de différents indices de l'activité des désaturases, citant la Δ 4-désaturase (C22: 6 n-3 / C22: 5 n-3), la Δ 8-désaturase (C20: 3 n-6 / C20: 2 n-6) et la Δ 9-désaturase (C18:1 n-9 / C18: 0) ainsi que l'indice de l'activité élongase (C22: 5 n-3 / C20: 5 n-3), par rapport aux cellules traitées avec le véhicule (**Tableau 12**). Ces indices ont été significativement réduits lorsque le 7 β -OHC a été associé au DMF ou au MMF. De plus, en présence du 7 β -OHC, une diminution significative de l'indice d'élongation (C18:0 / C16:0) a été observée, comparativement aux cellules traitées

avec le véhicule. Cette diminution a été légèrement corrigée en présence du DMF (25 μ M) (**Tableau 12**).

Lorsque les cellules 158N ont été traitées successivement avec de la biotine (10 nM) et du 7 β -OHC, une diminution significative de l'indice de l'activité du Δ 5-désaturase (C20:4 n-6 / C20:3 n-6) et du Δ 9-désaturase (C18:1 n-9 / C18:0) a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC. De plus, une diminution de l'indice d'activité de Δ 8-désaturase (C20:3 n-6 / C20:2 n-6) a été mise en évidence en présence de la biotine (10 nM) ou la biotine (100 nM). Dans les mêmes conditions, l'indice de l'activité Δ 9-désaturase (C18:1 n-9 / C18:0) et l'indice de l'activité d'élongation (C22:5 n-3 / C20: 5 n-3) et (C18:1 n-9 / C18:0) ont été normalisés par rapport aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (**Tableau 13**)

L'ensemble de nos résultats ont mis en évidence l'impact du 7 β -OHC sur le métabolisme des acides gras, ce qui pourrait être dû, en partie, aux dommages causés au niveau des mitochondries et des peroxysomes, car ces organites jouent un rôle important dans l'anabolisme et le catabolisme des acides gras. De plus, nos résultats montrent que le DMF, le MMF et la biotine pourraient prévenir les troubles métaboliques des acides gras aux niveaux des cellules traitées avec du 7 β -OHC.

Tableau 12: Profil des acides gras poly-insaturés des cellules 158N traitées par le diméthyle fumarate et le monométhyle fumarate associés ou non au 7β-hydroxycholestérol

	Contrôle	EtOH (0,6%)	DMSO (0,05%)	DMF (25 µM)	MMF (25 µM)	7β-OHC (50 µM)	7β-OHC (50 µM) + DMF (25 µM)	7β-OHC (50 µM) + MMF (25 µM)
C18:2 n-6	32.66 ± 2.10	28.06 ± 0.94	29.72 ± 0.41	36.30 ± 1.14 *	36.77 ± 3.82 *	23.14 ± 1.48 *	26.58 ± 1.44 *#	26.33 ± 1.95*
C20:4 n-6 (AA)	314.84 ± 6.38	277.13 ± 2.48	269.37 ± 1.78	338.36 ± 44.67 *	317.85 ± 15.25 *	203.91 ± 2.73 *	185.39 ± 5.99*#	195.29 ± 13.48*
C20:5 n-3 (EPA)	450.26 ± 2.05	400.48 ± 22.37	451.25 ± 13.07	200.83 ± 5.67 *	203.16 ± 10.21 *	127.58 ± 0.95 *	100.79 ± 8.65 *#	114.83 ± 5.05 *#
C20:3 n-6	87.23 ± 7.07	84.27 ± 2.34	67.61 ± 0.67	81.62 ± 2.39 *	89.69 ± 1.34 *	65.15 ± 2.24*	81.93 ± 2.81 #	72.33 ± 3.41*#
C20:2 n-6	52.96 ± 2.27	47.51 ± 0.10	51.64 ± 1.70	32.50 ± 0.25 *	36.01 ± 4.04 *	15.72 ± 2.19 *	17.71 ± 1.38*#	34.50 ± 1.08 *#
C22:6 n-3 (DHA)	95.82 ± 2.21	82.47 ± 0.90	79.76 ± 1.66	98.43 ± 5.62 *	97.45 ± 4.70 *	70.85 ± 0.86 *	70.65 ± 0.46 *	76.97 ± 3.81 *#
C22:5 n-3 (DPA)	92.21 ± 1.70	90.63 ± 3.51	79.05 ± 1.42	93.39 ± 5.68 *	89.42 ± 2.41 *	63.52 ± 0.87 *	76.81 ± 0.17 *#	75.06 ± 0.15 *#
∑AGPI	1588.33 ± 14.33	1373.67 ± 29.60	1512.94 ± 4.59	1318.22 ± 34.65 *	870.35 ± 39.09 *	872.40 ± 22.61 *	562.57 ± 0.47 *#	628.02 ± 1.89 *#
∑ AGPI (n-3)	638.29 ± 5.97	573.58 ± 26.79	610.05 ± 9.99	392.65 ± 5.60 *	390.04 ± 17.32 *	261.95 ± 0.95 *	248.25 ± 8.02 *#	266.85 ± 8.71*
∑ AGPI (n-6)	487.70 ± 5.07	436.96 ± 1.18	418.35 ± 1.16	488.78 ± 43.66 *	480.31 ± 21.77 *	307.91 ± 4.25 *	311.61 ± 6.01*	328.45 ± 17.76*
∑ AGPI n-3/∑ AGPI n-6	1.31 ± 0.00	1.31 ± 0.06	1.46 ± 0.03	0.81 ± 0.06 *	0.81 ± 0.00 *	0.85 ± 0.01 *	0.80 ± 0.04 *	0.82 ± 0.07 *
Δ 4 : C22:6 n-3/C22 :5 n-3	1.04 ± 0.00	0.91 ± 0.03	1.01 ± 0.00	1.06 ± 0.12	1.09 ± 0.02 *	1.12 ± 0.03 *	0.92 ± 0.00 #	1.03 ± 0.05 #
Δ 5: C20:4 n-6 /C20:3 n-6	3.64 ± 0.37	3.29 ± 0.12	3.98 ± 0.01	4.16 ± 0.67	3.55 ± 0.22 *	3.13 ± 0.07	2.27 ± 0.15 *#	2.70 ± 0.06 *#
Δ 8: C20:3 n-6 /C20 :2 n-6	1.64 ± 0.06	1.77 ± 0.05	1.31 ± 0.06	2.51 ± 0.09 *	2.53 ± 0.32 *	4.25 ± 0.73 *	4.67 ± 0.52 *	2.10 ± 0.16 *#
Δ 9: C16:1 n-7/ C16:0	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.00	0.21 ± 0.00 *	0.24 ± 0.00 *	0.18 ± 0.00	0.23 ± 0.00 *#	0.21 ± 0.00 *#
Δ 9: C18:1 n-9/ c18:0	1.81 ± 0.02	1.74 ± 0.07	1.92 ± 0.05	2.35 ± 0.01 *	1.86 ± 0.02	2.73 ± 0.01 *	2.17 ± 0.02 *#	2.12 ± 0.01 *#
Elongase: 22:5 n-3 /C20:5 n-3	0.20 ± 0.00	0.23 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.47 ± 0.04 *	0.44 ± 0.01 *	0.50 ± 0.00 *	0.77 ± 0.07 *#	0.65 ± 0.03 *#
Elongase : C18:0/C16:0	0.53 ± 0.00	0.51 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.45 ± 0.02 *	0.58 ± 0.01 *	0.42 ± 0.02 *	0.49 ± 0.00 #	0.32 ± 0.00 *#

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart type de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%, DMSO (0,05%)) et les cellules traitées sont indiquées par*, Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 µM)) et (7β-OHC + MMF (25µM)) sont indiquées par #. AGPI: Somme des acides gras polyinsaturés; Δ 4: désaturase delta 4; Δ 5: désaturase delta 5; Δ 8: désaturase delta 8; Δ 9: désaturase delta 9.

Tableau 13: Profil des acides gras poly-insaturés des cellules 158N traitées par la biotine associée ou non au 7β-hydroxycholestérol

	Contrôle	Véhicule (EtOH : 0,6%)	Biotine (10 nM)	Biotine (100 nM)	7β-OHC (50 μM)	7β-OHC + Biotine (10 nM)	7β-OHC + Biotine (100 nM)
C18:2 n-6	32.66 ± 2.10	28.06 ± 0.94	37.72 ± 1.08 *	38.50 ± 1.17 *	23.14 ± 1.48*	34.63 ± 0.81#	27.78 ± 0.66 #
C20:4 n-6 (AA)	314.84 ± 6.38	277.13 ± 2.48	326.89 ± 4.57 *	276.78 ± 9.70 *	203.91 ± 2.73*	276.71 ± 3.86#	264.79 ± 4.70 #
C20:5 n-3 (EPA)	450.26 ± 2.05	400.48 ± 22.37	144.79 ± 2.62 *	155.04 ± 1.28 *	127.58 ± 0.95*	148.40 ± 2.20 **	145.38 ± 5.51**
C20:3 n-6	87.23 ± 7.07	84.27 ± 2.34	87.55 ± 0.10	120.40 ± 0.85 *	65.15 ± 2.24*	97.37 ± 3.56 **	88.22 ± 6.46 **
C20:2 n-6	52.96 ± 2.27	47.51 ± 0.10	32.73 ± 2.60 *	33.71 ± 0.98 *	15.72 ± 2.19*	42.69 ± 0.53**	41.36 ± 1.57 **
C22:6 n-3 (DHA)	95.82 ± 2.21	82.47 ± 0.90	102.16 ± 2.47 *	103.62 ± 0.49 *	70.85 ± 0.86*	96.70 ± 3.52 **	95.34 ± 0.21**
C22:5 n-3 (DPA)	92.21 ± 1.70	90.63 ± 3.51	91.29 ± 2.52	102.96 ± 1.88 *	63.52 ± 0.87*	92.06 ± 2.32#	90.10 ± 5.93#
ΣAGPI	1588.33 ± 14.33	1373.67 ± 29.60	823.12 ± 8.36 *	834.13 ± 8.76 *	569.87 ± 3.31*	802.95 ± 0.70 **	759.34 ± 24.67 **
ΣAGPI (n-3)	638.29 ± 5.97	573.58 ± 26.79	338.24 ± 2.36 *	361.61 ± 0.11 *	261.95 ± 0.95*	337.16 ± 3.40 **	330.82 ± 11.65 **
ΣAGPI (n-6)	487.70 ± 5.07	436.96 ± 1.18	484.88 ± 5.99	469.40 ± 6.71 *	307.91 ± 4.25*	451.40 ± 6.08 **	422.17 ± 13.38#
ΣAGPI (n-3)/ΣAGPI (n-6)	1.31 ± 0.00	1.31 ± 0.06	0.70 ± 0.00 *	0.77 ± 0.01 *	0.85 ± 0.01*	0.75 ± 0.02 **	0.78 ± 0.00 **
Δ 4 : C22:6 (n-3)/C22 :5 (n-3)	1.04 ± 0.00	0.91 ± 0.03	1.12 ± 0.00 *	1.01 ± 0.02	1.12 ± 0.03*	1.05 ± 0.06	1.06 ± 0.07
Δ 5: C20:4 (n-6) /C20:3 (n-6)	3.64 ± 0.37	3.29 ± 0.12	3.73 ± 0.06	2.30 ± 0.10 *	3.13 ± 0.07	2.84 ± 0.06 **	3.01 ± 0.17*
Δ 8: C20:3 (n-6) /C20 :2 (n-6)	1.64 ± 0.06	1.77 ± 0.05	2.69 ± 0.22 *	3.57 ± 0.08 *	4.25 ± 0.73*	2.28 ± 0.11 **	2.13 ± 0.08 **
Δ 9: C16:1 (n-7)/ C16:0	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.01*	0.22 ± 0.00 *	0.18 ± 0.00	0.22 ± 0.00#	0.22 ± 0.00#
Δ 9: C18:1 (n-9)/ c18:0	1.81 ± 0.02	1.74 ± 0.07	1.87 ± 0.00 *	2.07 ± 0.03 *	2.73 ± 0.01*	1.55 ± 0.02 **	1.61 ± 0.02 **
Elongase: 22:5 (n-3)/C20:5 (n-3)	0.20 ± 0.00	0.23 ± 0.00	0.63 ± 0.03 *	0.66 ± 0.02 *	0.50 ± 0.00*	0.62 ± 0.02 **	0.62 ± 0.02 **
Elongase : C18:0/C16:0	0.53 ± 0.00	0.51 ± 0.02	0.44 ± 0.01*	0.46 ± 0.01 *	0.42 ± 0.02*	0.54 ± 0.01 #	0.48 ± 0.01 #

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart type de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les véhicules (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par*, Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + Biotine (10 nM) et (7β-OHC + biotine (100 nM) sont indiquées par #. AGPI: Somme des acides gras polyinsaturés; Δ 4: désaturase delta 4; Δ 5: désaturase delta 5; Δ 8: désaturase delta 8; Δ 9: désaturase delta 9.

8.3. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7β-hydroxycholestérol, sur la teneur en sphingomyéline et en phosphatidylcholine

La gaine de myéline est constituée en forte proportion en sphingomyélines qui n'est autre qu'un lipide complexe formé d'acide gras et de phosphocholine. Ces constituants sont impliqués dans le maintien de la structure et du fonctionnement de la gaine de myéline (Morell and Quarles, 1999). De ce fait, une évaluation des effets du DMF et du MMF seuls ou associés au 7β-OHC sur le contenu cellulaire en sphingomyéline (SM) et en phosphatidylcholine (PC) a été réalisée par CPG/SM. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 45.

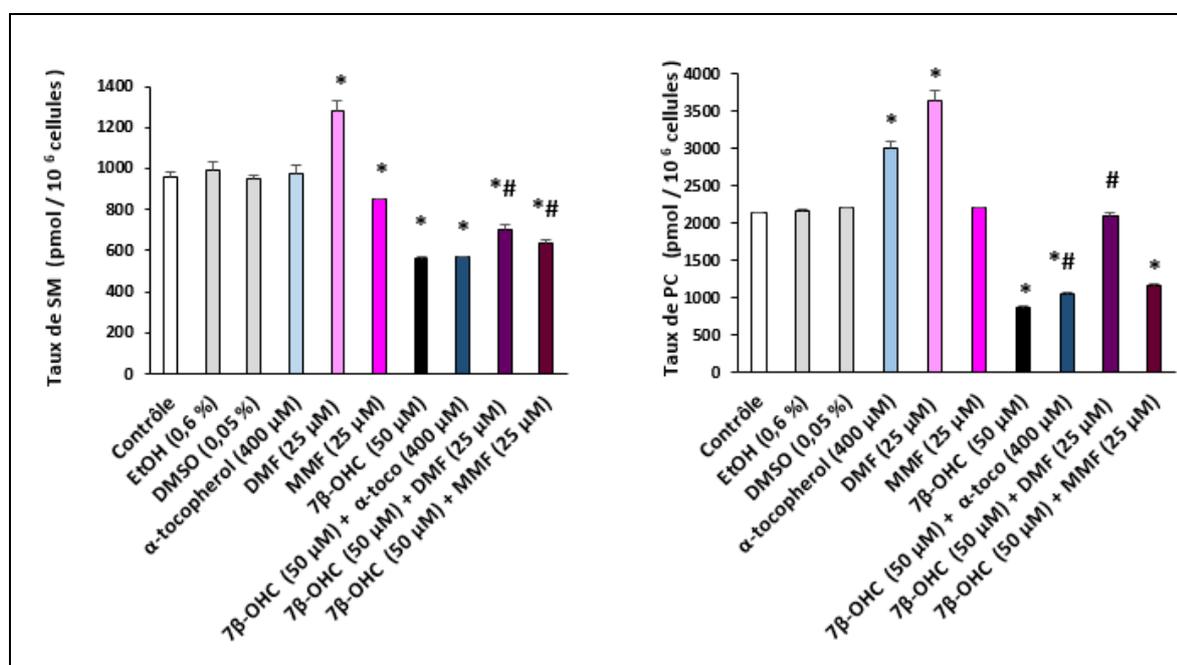


Figure 45: Teneur en sphingomyéline et phosphatidylcholine dans des cellules 158N traitées avec du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7β-hydroxycholestérol

La quantité de sphingomyéline (SM) et de phosphatidylcholine (PC) est déterminée par CG / SM. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées et les cellules non traitées ou traitées avec les véhicules (Ethanol (EtOH) 0,6%), ou DMSO (0,05%); sont indiquées par *. Des différences entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées avec (7β-OHC + DMF), (7β-OHC + MMF) ou (7β-OHC + α-toco) sont indiquées par #. Aucune différence

significative n'a été observée entre le contrôle (cellules non traitées) et les cellules traitées avec les véhicules ((EtOH 0,6%) et DMSO 0,05%).

Les taux les plus élevés en SM et PC ont été observés dans les cellules 158N traitées avec du DMF (25 μ M) pendant 24 h. Suite au traitement avec du 7 β -OHC (50 μ M), une diminution significative des taux de SM et de PC a été observée, comparativement aux cellules non traitées (contrôle) ou aux cellules traitées avec le véhicule (EtOH à 0,6%) (**Figure. 45**). Alors que l' α -tocophérol (utilisé comme contrôle positif) n'a pas eu ou a eu un effet mineur sur la correction des taux du SM et de PC. Le DMF s'est avéré plus efficace que le MMF puisqu'il a induit une correction plus marquée (**Figure. 45**).

9. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'expression des protéines de myéline (PLP, MBP)

Les protéine protéolipides (PLP) et les protéines basiques de la myéline (MBP) correspondent respectivement à 50 et 30% des protéines de myéline (**Baumann and Pham-Dinh, 2001**). Ces protéines sont exprimées au niveau des cellules 158N (**Baarine et al., 2009**). Il est donc intéressant d'évaluer les effets du 7 β -OHC (50 μ M), sur l'expression de PLP et de MBP ainsi que l'impact du DMF, du MMF et de la biotine, associés ou non au 7 β -OHC (50 μ M) sur ces protéines.

L'expression de cette protéine (PLP) est au même niveau dans les cellules traitées avec l' α -tocophérol, le DMF, le MMF ou la biotine. Cependant, une expression plus élevée de PLP a été observée au niveau des cellules traitées avec du 7 β -OHC, ((7 β -OHC + α -tocophérol), (7 β -OHC + DMF), (7 β -OHC + MMF), (7 β -OHC + biotine 10 nM) et (7 β -OHC + biotine 100 nM) (**Figures 46-47**). Par ailleurs, l'expression de la protéine MBP a été plus élevée dans les cellules traitées avec du DMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM) par rapport aux cellules non traitées (contrôle) (**Figure 46**). En présence du 7 β -OHC, une augmentation de l'expression de MBP a été observée par rapport aux cellules traitées avec le véhicule. Lorsque le 7 β -OHC a été associé à l' α -tocophérol, l'expression de MBP a été fortement augmentée. Par ailleurs une légère augmentation a été observée au niveau des cellules traitées par (7 β -OHC + DMF), (7 β -OHC + MMF), (7 β -OHC + biotine 10 nM) ou (7 β -OHC + biotine 100 nM) (**Figures 46-47**).

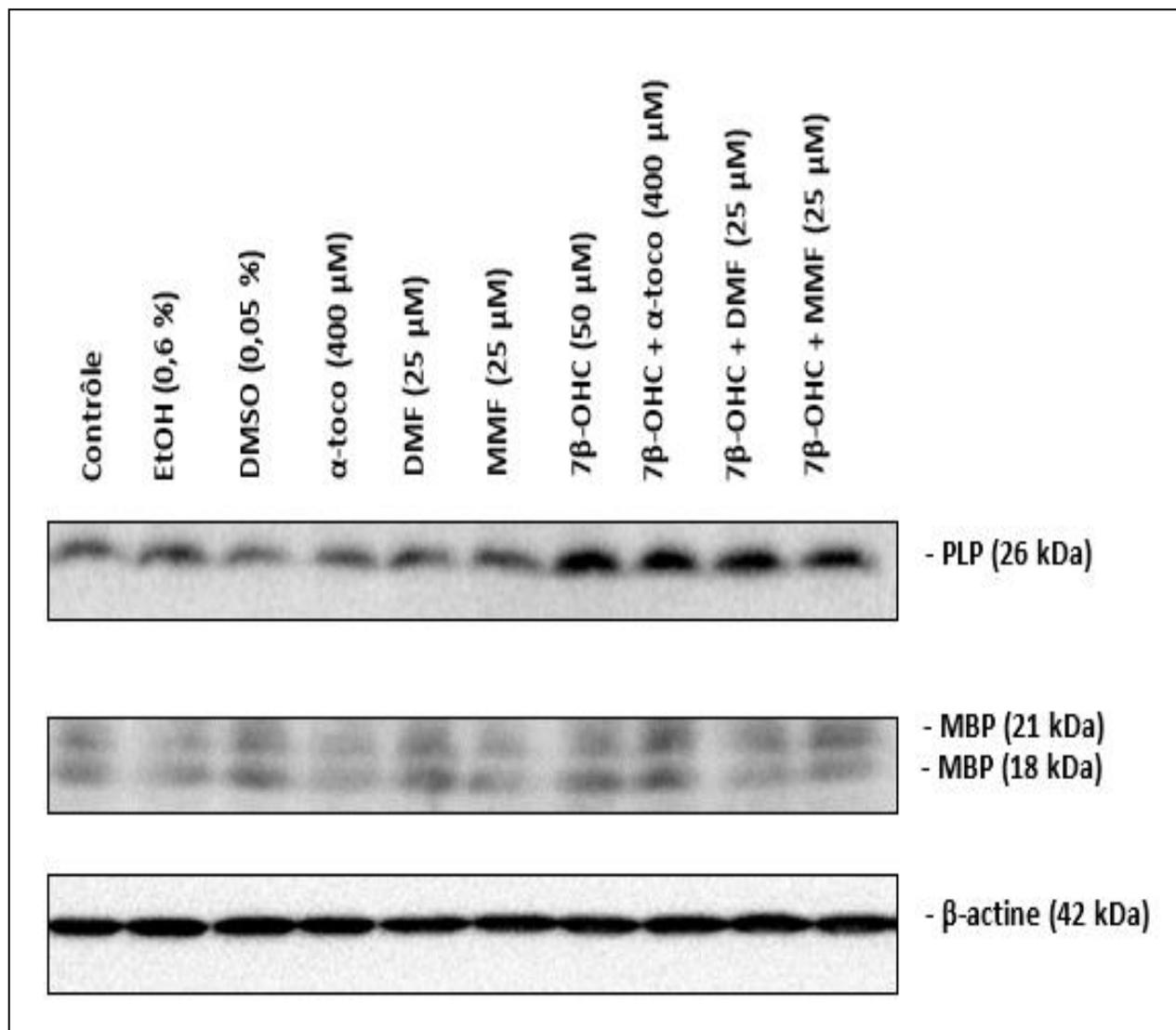


Figure 46 : Expression des protéines de myéline (PLP, MBP) : Analyse par western blot de l'effet du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur

Les cellules oligodendrocytaires 158N murines ont été traitées pendant 24 h en absence ou en présence du 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC, 50 μ M) associées ou non au DMF (25 μ M) et MMF (25 μ M) ou à la-tocophérol (400 μ M). Les protéines majeures de la myéline PLP et MBP ainsi que l'actine (utilisée comme référence interne) ont été caractérisées par Western blot avec des anticorps appropriés. Deux expériences indépendantes, donnant des résultats similaires, ont été réalisées.

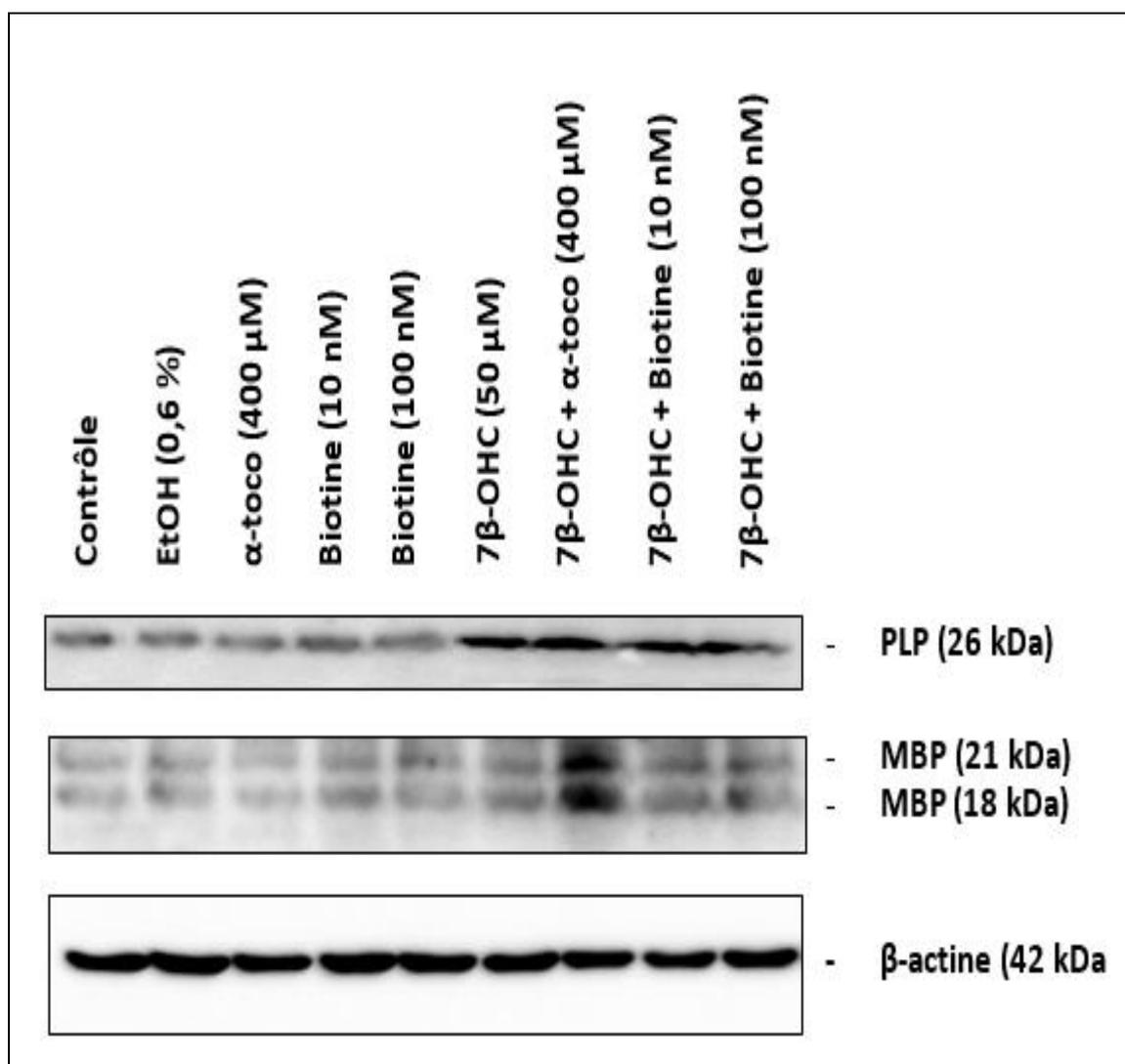


Figure 47 : Expression des protéines de myéline (PLP, MBP) : Analyse par western blot de l'effet de la biotine associée ou non au 7 β -hydroxycholestérol

Les cellules oligodendrocytaires 158N murines ont été traitées pendant 24 h en absence ou en présence du 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC, 50 μ M) associées ou à la biotine (10 nM) et (100 nM) ou à la-tocophérol (400 μ M). Les protéines majeures de la myéline PLP et MBP ainsi que l'actine (utilisée comme référence interne) ont été caractérisées par Western blot avec des anticorps appropriés. Deux expériences indépendantes, donnant des résultats similaires, ont été réalisées.

10. Evaluation de l'effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine sur la mort cellulaire induite par le 7β-hydroxycholestérol

10.1 Evaluation des voies de signalisation associées à la mort cellulaire induite par le 7β-hydroxycholestérol

Il existe peu d'informations sur les voies de signalisations conduisant à la mort cellulaire induite par le 7β-OHC. Plusieurs inhibiteurs ont été testés sur des cellules 158N : H89 (20 μM), U73122 (1 μM), la chelerythrine (1 μM) et U0126 (20 μM), qui inhibent la protéine kinase A (PKA), la phospholipase C (PLC), la protéine kinase C (PKC) et MEK, respectivement.

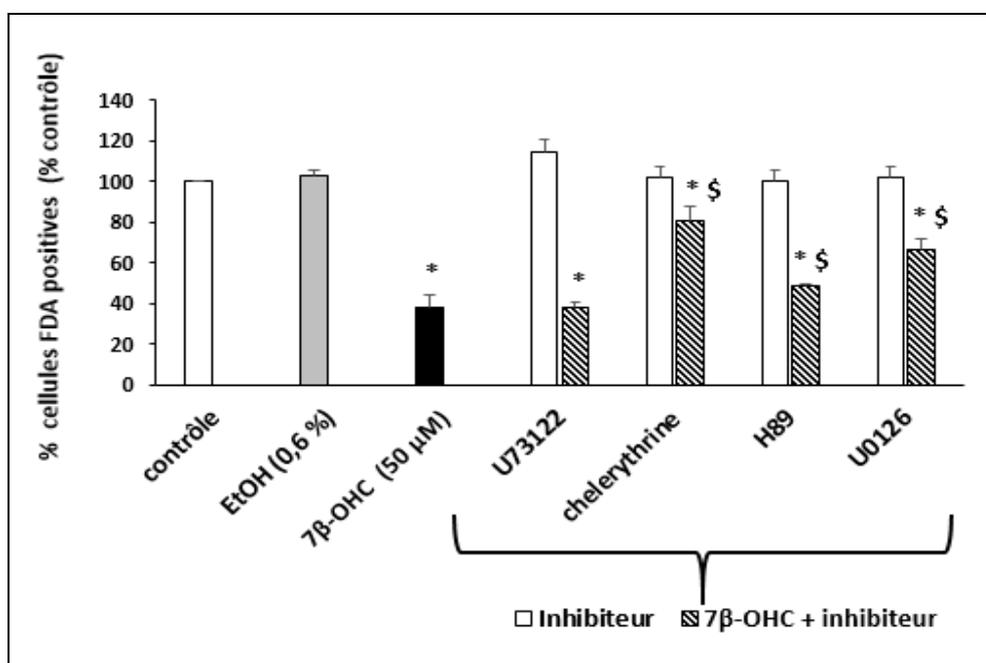


Figure 48 : Evaluation des voies de signalisation des protéines kinase A (PKA), phospholipase C (PLC) / protéine kinase C (PKC) et MEK / ERK associées à la mort cellulaire induite par le 7β-OHC sur des cellules 158N.

L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann Whitney. Les données présentées en moyenne ± l'écart type de deux expériences indépendantes réalisées en triplicate. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle), les cellules traitées avec le véhicule (éthanol (EtOH): 0,6%), ou les cellules traitées par les différents inhibiteurs (H89, U0126, U73122 ou chélénithrine). Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec le 7β-OHC et les cellules traitées avec le véhicule (EtOH 0,6%); sont indiquées par : *. Des différences Significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec le 7β-

OHC et les cellules traitées avec le 7 β -OHC associées aux différents inhibiteurs (H89, U0126, U73122 ou chillarhrine)) sont indiquées par : \$.

Les cellules oligodendrocytaires murines 158N préalablement cultivées ont été ensuite traitées en absence ou en présence du 7 β -OHC (50 μ M) pendant 24 h associées ou non aux différents d'inhibiteurs, H89, U0126, U73122 et de chélérithrine, introduits 30 minutes avant l'ajout du 7 β -OHC. Afin d'évaluer la viabilité cellulaire dans les différentes conditions, un test FDA a été réalisé. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 48**.

Les résultats ont montré une légère inhibition de la mort cellulaire lorsque le 7 β -OHC était associée au H89 (**Figure 48**). Cependant, en présence de la chelerythrine et de U0126, une nette inhibition de la mort cellulaire induite par le 7 β -OHC, qui est traduit par une augmentation de pourcentage des cellules viables, a été observée comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (**Figure 48**). Ces résultats confirment l'implication de la PKC et de la MEK dans les effets délétères du 7 β -OHC dans les cellules 158N.

10.2. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité lactate déshydrogénase

La mort cellulaire peut se produire selon différents mécanismes : apoptotique, nécrotique (ou nécroptotique) ou autophagique. La mort cellulaire par apoptose, appelée aussi mort cellulaire programmée, fait intervenir des cascades de transduction des signaux impliquant ainsi des caspases et peut aussi se produire par nécrose (nécrose primaire). Le processus nécrotique ou nécroptotique est accompagné d'une altération de la membrane plasmique associé à une libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire y compris le lactate déshydrogénase (LDH). Ainsi, la mesure de l'activité de cette enzyme cytosolique, nous permet d'évaluer le type de mort cellulaire, en particulier la nécrose primaire et la nécrose secondaire (nécrose suite à l'apoptose).

Il est donc important de déterminer les effets du DMF, du MMF et de la biotine, associés ou non au 7 β -OHC sur l'activité de la LDH.

La mesure de l'activité de la LDH a été réalisée dans le milieu de culture des cellules 158N traitées avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) ou de la biotine (10 et 100 nM) en absence ou en présence du 7 β -OHC (50 μ M) pendant 24 h. Les résultats sont obtenus dans la **Figure 59**.

Une augmentation de l'activité du LDH a été révélée en présence du 7 β -OHC. Cette augmentation a été significativement atténuée lorsque les cellules 158N ont été pré-traitées avec du DMF, du MMF et de la biotine

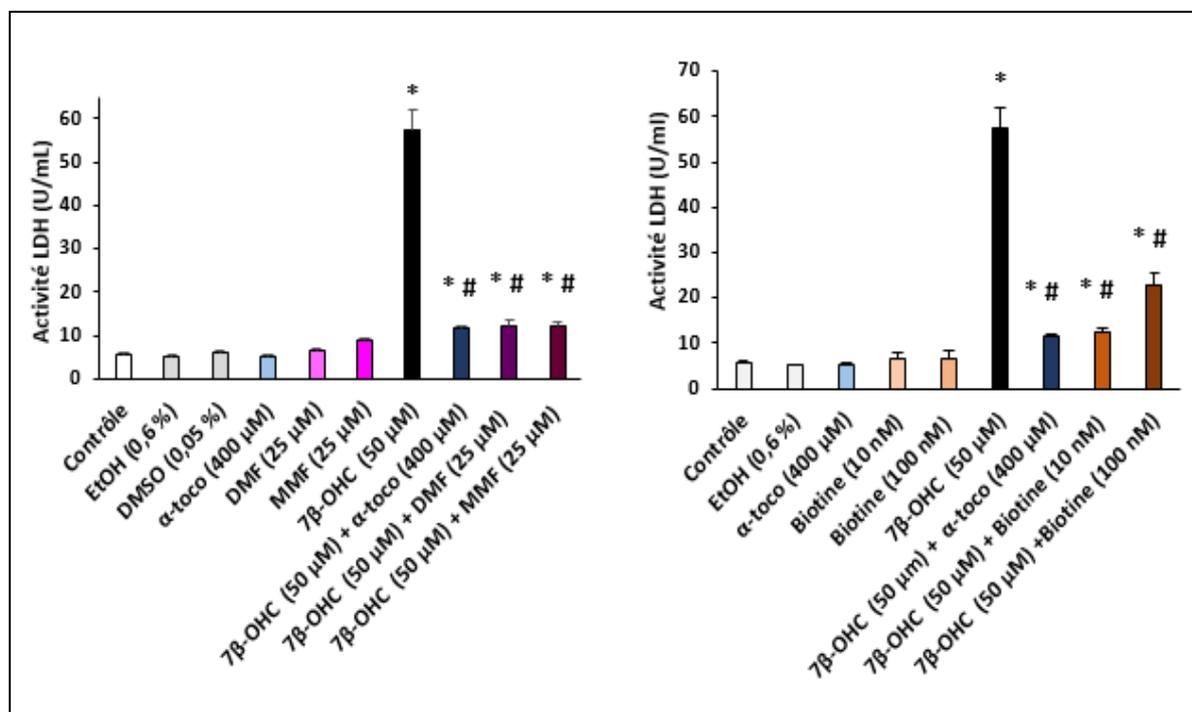


Figure 49 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'activité lactate déhydrogénase.

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h en absence ou en présence du 7 β -OHC (50 μ M) associées ou non au DMF (25 μ M), MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) (2 h de prétraitement). L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type (SD) de 3 expériences indépendantes. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10 nM)), (7 β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7 β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'est observée entre contrôle et EtOH (0, 6%).

10.3. Evaluation des effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur la fragmentation nucléaire

La mort cellulaire par apoptose se caractérise par certains changements morphologiques tels que la condensation de la chromatine, la rupture de la membrane nucléaire, la fragmentation des noyaux et l'apparition de vésicules intracellulaires appelées corps apoptotiques. Afin de caractériser le type de mort cellulaire en particulier l'apoptose, les cellules 158N ont été prétraitées ou non par le DMF (25 μM), le MMF (25 μM), la biotine (10 et 100 nM) ou l'α-tocophérol (400 μM) pendant 2 h, en présence ou en absence du 7β-OHC (50 μM). Après 24 h du traitement une coloration au Hoechst 33342 ou au Giemsa a été réalisée sur les cellules en suspension et les noyaux ont été visualisés au microscope à fluorescence. Pour chaque échantillon, 300 cellules ont été comptées pour déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques. Les cellules normales ont des noyaux réguliers et ronds alors que les cellules apoptotiques ont des noyaux condensés et / ou fragmentés. Les résultats sont présentés dans la **Figure 50**.

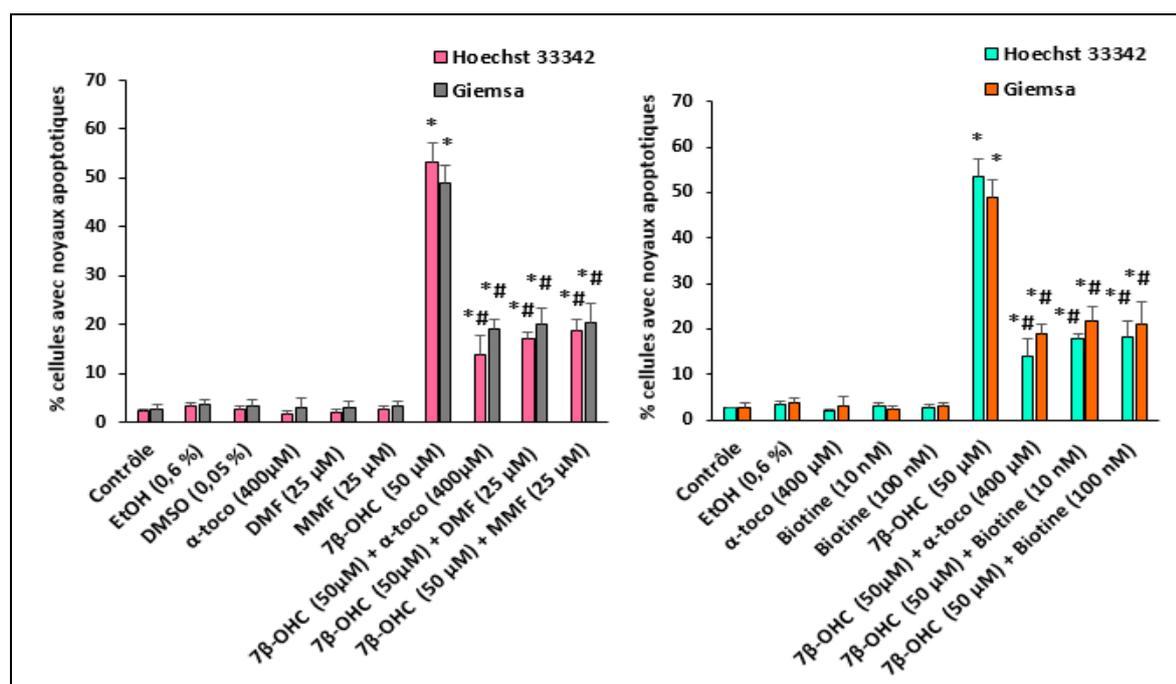


Figure 50 : Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur la morphologie nucléaire.

La quantification des cellules avec des noyaux apoptotiques a été évaluée après coloration avec Giemsa et Hoechst 33342. Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et

les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β -OHC et les cellules traitées au (7β -OHC + DMF (25 μ M), (7β -OHC + MMF (25 μ M), (7β -OHC + biotine (10 nM)), (7β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'est observée entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec les véhicules (EtOH (0, 6%), DMSO (0,05%)).

Les images des noyaux de cellules traitées avec du DMF, du MMF, de la biotine ou de l' α -tocophérol ne montrent aucune modification comparativement aux cellules contrôles et aux cellules traitées avec les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)). Les noyaux ont gardé leur forme ronde et circulaire. Cependant, le traitement des cellules 158N avec du 7β -OHC (50 μ M) pendant 24 h, a montré une augmentation significative des cellules apoptotiques, caractérisées par des noyaux cellulaires condensés et / ou fragmentés, comparativement aux cellules contrôles ou aux cellules traitées avec le véhicule (Ethanol) (**Figure 50**). Cette augmentation a été fortement atténuée en présence du DMF, du MMF, ou de la biotine. Ce même effet a été observé en présence de l' α -tocophérol (**Figure 50**). Ainsi, le DMF, le MMF, la biotine et l' α -tocophérol sont capables de s'opposer aux changements morphologiques nucléaires induits par le 7β -OHC à savoir la condensation et / ou la fragmentation des noyaux, caractéristiques de l'apoptose.

10.4. Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β - hydroxycholestérol sur l'intégrité lysosomale

L'acridine orange est une sonde lysosomotropique qui permet de mettre en évidence les vésicules acides telles que les lysosomes. C'est un fluorochrome métachromatique lipophile, qui permet d'évaluer l'intégrité des lysosomes. Ce dernier émet une fluorescence orange/rouge dans des conditions de pH acide, et une fluorescence verte dans les conditions de pH neutre. De ce fait, la quantité de fluorescence orange / rouge est proportionnelle à la quantité de compartiments acides dans la cellule et donc à la perméabilisation de la membrane lysosomale et/ou à la diminution de l'activité des pompes à protons.

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) en présence ou en absence du 7β -OHC (50 μ M). A la fin du traitement, une coloration à l'acridine orange est réalisée, les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 51**.

L'analyse par cytométrie n'a révélé aucune différence significative entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées avec les véhicules (EtOH (0,6%), DMSO (0,05%)). Cependant, une déstabilisation significative des lysosomes des cellules 158N traitées par le 7 β -OHC (50 μ M), qui est caractérisée par une augmentation significative des cellules avec des lysosomes déstabilisés, a été remarquée par rapport aux cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)). Ces effets ont été fortement atténués en présence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) et de la biotine (10 et 100 nM). Des effets similaires ont été observés avec l' α -tocophérol. On note également que le DMF, le MMF et la biotine ainsi que l' α -tocophérol s'opposent à la déstabilisation des lysosomes (**Figure 51**).

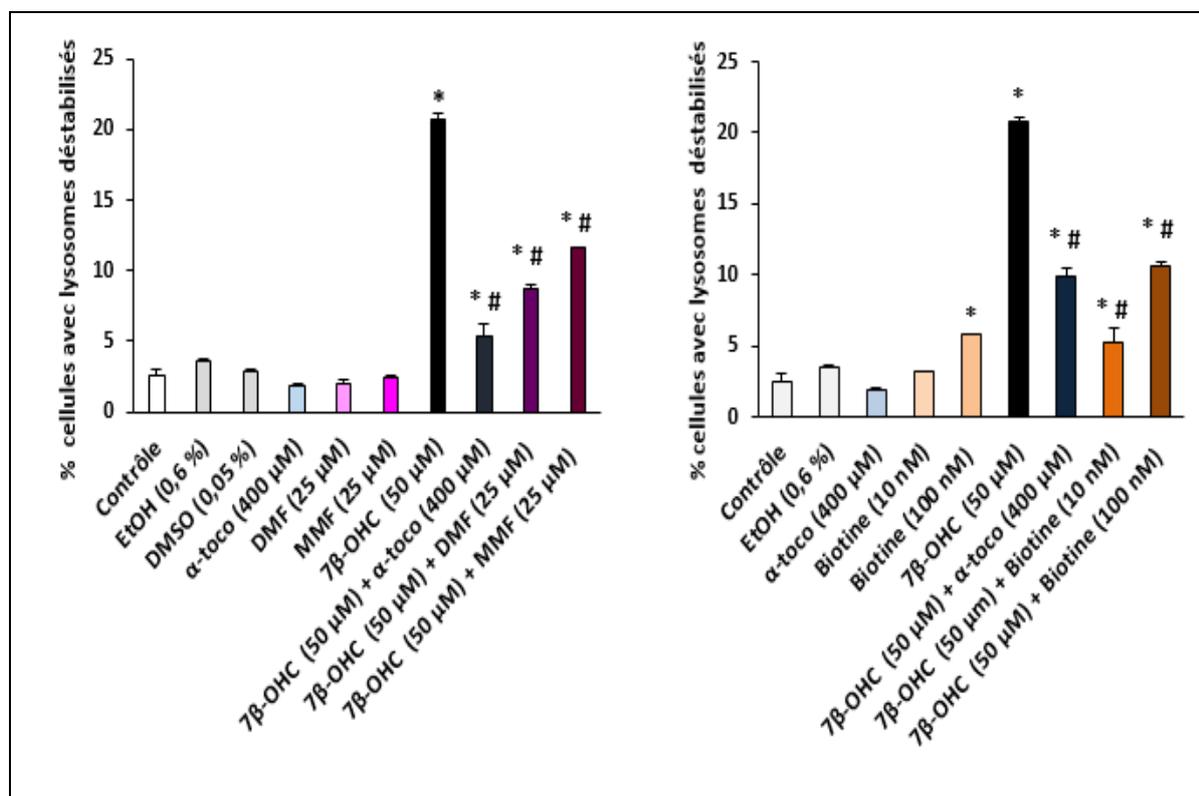


Figure 51: Effet du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7 β -hydroxycholestérol sur l'intégrité lysosomale.

Les cellules 158N ont été traitées en absence ou en présence du DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) et de la biotine (10 et 100 nM) associé ou non au 7 β -OHC (50 μ M). Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart type de trois expériences différentes. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7 β -OHC et les cellules traitées au (7 β -OHC + DMF (25 μ M), (7 β -OHC + MMF (25 μ M), (7 β -OHC + biotine (10

nM), (7β -OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β -OHC + α -tocophérol); sont indiquées par #. Aucune différence significative n'est observée entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec les véhicules (EtOH (0, 6%), DMSO (0,05%)).

10.5. Effets du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine associés ou non au 7β -hydroxycholestérol sur l'apoptose et l'autophagie

Les caspases jouent un rôle clé dans les phases d'initiation et d'exécution de l'apoptose. La caspase-3 est une protéine effectrice dont le clivage est induit lors du processus apoptotique. Lorsque la caspase-3 est activée, elle forme des tétramères qui vont cliver certaines protéines de la cellule conduisant à une mort cellulaire programmée. Ainsi, l'expression de la caspase-3 clivée ou pas a été étudiée par western blotting afin d'évaluer un processus apoptotique

La caspase-3 non clivée (inactive) est une protéine de 35 kDa son clivage donne une bande à 17 kDa.

Les cellules 158N ont été prétraitées ou non avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M), de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M) en absence ou en présence du 7β -OHC (50 μ M). Les résultats sont présentés dans les **Figures 52 et 53**.

Lorsque les cellules sont traitées avec du DMF, du MMF, de la biotine (10 nM) ou de l' α -tocophérol aucune induction du clivage de la caspase-3 n'a été observée. Par contre, un léger effet pro-apoptotique a été observé en présence de la biotine (100 nM) (**Figures 52 et 53**).

Par ailleurs, une activation de la caspase-3 (caractéristique de l'apoptose) est clairement observée après traitement des cellules 158N avec du 7β -OHC (50 μ M). Cette induction du clivage de la caspase 3 est fortement atténuée en présence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) et de la biotine (10 et 100 nM) ou de l' α -tocophérol (400 μ M). En effet, en présence du 7β -OHC (50 μ M), le MMF (25 μ M) et la biotine (10 nM) se sont avérés plus efficace que le DMF et la biotine (100 nM) pour réduire le clivage de la caspase-3 (**Figures 52 et 53**).

La protéine LC3 qui a été utilisée comme marqueur de la mort cellulaire par autophagie. Le clivage de cette protéine a été mis en évidence par western blot.

En effet, il existe deux formes de LC3 : la LC3-I dans le cytoplasme qui donne une bande de 18 kDa et la LC3-II formée suite à un clivage de la LC3-I lorsqu'elle est associée au phagosome et au phagosome, et elle est de 16 kDa. Le taux de la LC3-II produite est donc corrélé à la formation de l'autophagosome et par conséquent à l'implication du processus

d'autophagie dans la mort cellulaire. Ainsi le calcul du ratio LC3-II / LC3-I permet d'évaluer si l'autophagie est activée ou non.

Lorsque les cellules 158N ont été traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M) une induction d'autophagie a été révélée par une augmentation importante du rapport [LC3-II / LC3-I] comparativement aux cellules contrôles (**Figures 52 et 53**). Cette augmentation est fortement atténuée quand le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M), à la biotine (10 et 100 nM) ou à l' α -tocophérol (utilisé comme contrôle positif).

Une diminution du ratio [LC3-II / LC3-I] est observée dans les cellules traitées avec (7 β -OHC+ DMF), (7 β -OHC+ MMF), (7 β -OHC+ Biotine (10 et 100 nM)) ou (7 β -OHC+ α -tocophérol) par rapport aux cellules traitées avec le 7 β -OHC (50 μ M). Ainsi, lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF (25 μ M), au MMF (25 μ M) ou à l' α -tocophérol, le rapport [LC3-II / LC3-I] s'est rapproché à celui détecté dans cellules traitées avec le véhicule (EtOH (0,6%)) (**Figures 52 et 53**). Ainsi, le DMF, le MMF et la biotine sont capables à s'opposer à l'apoptose et l'autophagie induites par le 7 β -OH sur les cellules 158N.

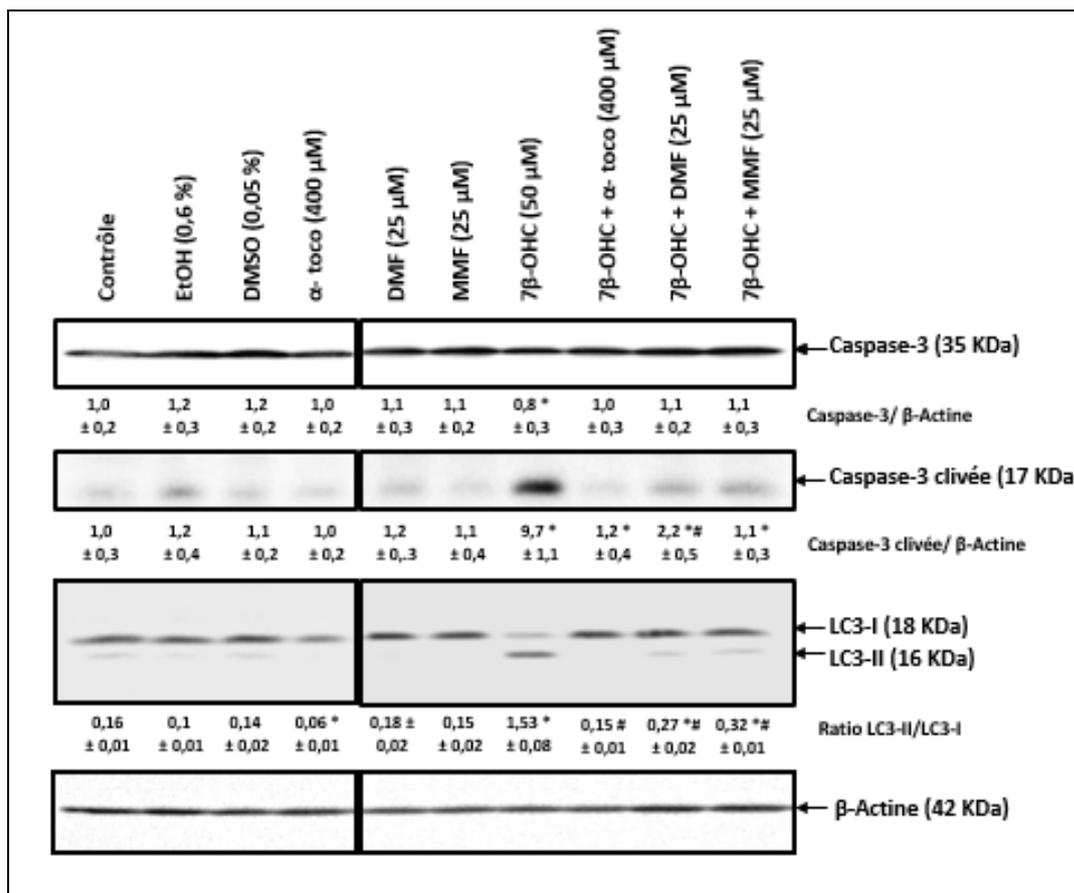


Figure 52 : Effet du diméthyle fumarate et du monométhyle fumarate associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur certains marqueurs de mort cellulaire

(Apoptose (caspase-3) et Autophagie (LC3))

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h avec du DMF (25 μM) et du MMF (25 μM) ou de l'α-tocophérole (400 μM) associées au ou non au 7β-OHC (50 μM). L'apoptose et l'autophagie sont caractérisées par western blotting. L'apoptose est évaluée par le clivage de la caspase-3 (bande clivée de 17 kDa) et l'autophagie est évaluée par la conversion de LC3-I en LC3-II. Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #.

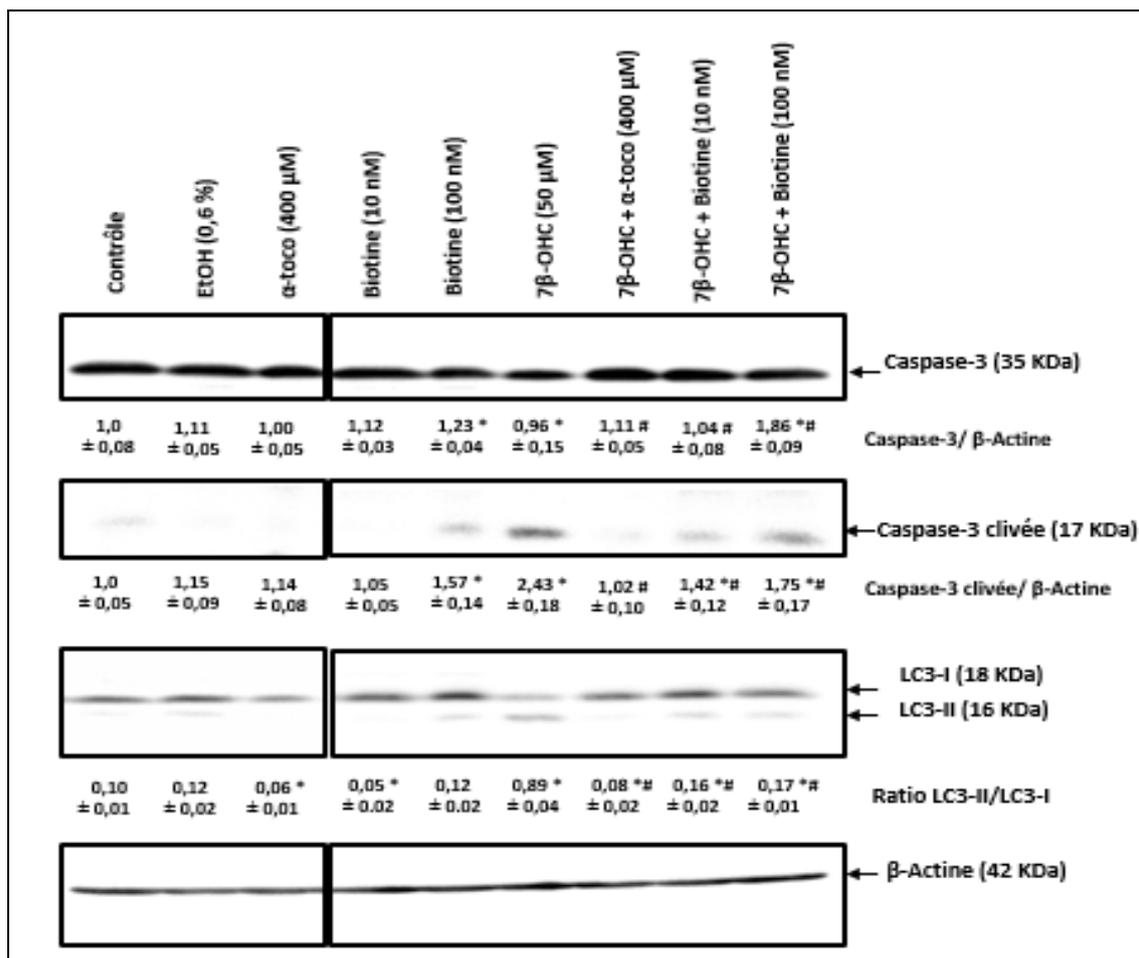


Figure 53 : Effet de la biotine associée ou non au 7β-hydroxycholestérol sur certains marqueurs de mort cellulaire (Apoptose (caspase-3) et Autophagie (LC3)).

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h avec de la biotine (10 et 100 nM) ou de l'α-tocophérole (400 μM) associées au ou non au 7β-OHC (50 μM). L'apoptose et l'autophagie sont caractérisées par western blotting. L'apoptose est évaluée par le clivage de la caspase-3 (bande clivée de 17 kDa) et l'autophagie est évaluée par la conversion de LC3-I en LC3-II. Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. L'analyse statistique des données est réalisée par le test de Mann whitney. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre le véhicule (éthanol (EtOH) 0,6%) et les cellules traitées sont indiquées par *. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les cellules traitées avec du 7β-OHC et les cellules traitées au (7β-OHC + DMF (25 μM), (7β-OHC + MMF (25μM), (7β-OHC + biotine (10 nM)), (7β-OHC + biotine (100 nM)) ou au (7β-OHC + α-tocophérol); sont indiquées par #.

DISCUSSION

I. Etude clinique préliminaire

La sclérose en plaques (SEP) constitue un vrai problème de santé public. Mieux comprendre cette pathologie, qui affecte surtout les femmes jeunes, étudier les paramètres associés directement ou indirectement au développement et/ou à la progression de cette pathologie et identifier des nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de développer des nouveaux traitements et/ou d'optimiser des traitements déjà existants permettant de guérir mais tout au moins d'améliorer le plus possible l'état des malades et à défaut de retarder l'évolution de la maladie, est une priorité. De même, trouver des biomarqueurs associés à la SEP est primordial pour le diagnostic de cette maladie. Dans ce contexte, une étude clinique préliminaire a été effectuée sur 20 sujets dont 10 patients atteints de SEP récurrente rémittente (SEP RR) et 10 patients atteints d'une maladie neurologique autre que la SEP (Témoins). Le plasma et le liquide céphalorachidien (LCR) ont servi de matrice biologique pour les dosages biologiques.

Il existe maintenant de plus en plus de preuves qui suggèrent l'importance du stress oxydant dans l'initiation et le développement des maladies neurodégénératives notamment la SEP (**Radi et al., 2014; Lassmann and van Horsen, 2016**). Plusieurs études ont fourni des arguments en faveur de la relation entre le déséquilibre du statut RedOx et les dommages neuronaux associés à la SEP (**Lassmann et al., 2012; Zarrouk et al., 2014**). En effet, la surproduction d'espèces radicalaires et l'oxydation des protéines et des lipides, sont souvent les causes des lésions cérébrales observées chez les patients atteints de SEP (**Fischer et al., 2012**).

Nos résultats préliminaires nous ont permis de mettre en évidence une accumulation significative du taux de l'hydroxy-acides octadecadiénoïques (HODEs), considérés comme biomarqueurs de la peroxydation lipidique (**Chen et al., 2006**), notamment les taux de 9-hydroxy-octadecadiénoate (9-HODE) et de 13-hydroxy-octadecadiénoate (13-HODE), qui sont les produits d'oxydation de l'acide linoléique (**Yoshida and Niki, 2006**), chez les patients atteints de SEP RR comparativement aux témoins. Cela concorde avec les résultats de **Håkansson et al., 2018**, issus d'une étude menée sur 41 patients atteints de la SEP RR et 22 témoins, qui ont montré une augmentation des taux de 9-HODE et de 13-HODE cérébraux chez les patients atteints de SEP RR par rapport aux témoins.

Par ailleurs, l'augmentation du taux de HODE plasmatique chez les patients atteints d'X-ALD a été associée à des taux élevés en oxystérols, essentiellement en 7-hydroxycholestérols (**Baarine et al., 2011**), issus de l'auto-oxydation du cholestérol, en particulier le 7 α -

hydroxycholestérol (7α -OHC), le 7β -hydroxycholestérol (7β -OHC) et le 7-cétocholestérol (7KC) (Vejux and Lizard, 2009). En effet, l'accumulation plasmatique et /ou cérébrale des oxystérols est une caractéristique biochimique commune à de nombreuses maladies neurodégénératives en particulier la SEP (Vejux and Lizard., 2009; Senanayake et al., 2015; Zarrouk et al., 2015)

Nos résultats préliminaires révèlent également une augmentation significative du taux plasmatique du 7β -OHC et du 7KC chez les patients atteints de SEP RR comparativement aux témoins. Des teneurs cérébrales élevées en 7KC ont été souvent détectées chez les patients atteints de SEP. Leurs accumulations pourraient être associées à une augmentation du stress oxydant et pourraient ainsi induire des lésions neuronales par l'intermédiaire de l'activation des microglies au niveau du SNC chez les patients atteints de SEP (Diestel et al., 2003). En outre l'étude de Leoni et al., 2005, menée sur 29 patients atteints de SEP et 24 témoins, a montré une légère augmentation du taux cérébral du 7 KC et du 7β -OHC chez les patients atteints de SEP comparativement aux témoins (Leoni et al., 2005). En revanche, une autre étude réalisée par Mukhopodhay et al., 2017, menée sur 221 patients SEP RR et 126 SEP progressive (SEP P), n'a montré aucune différence significative du taux du 7KC entre les patients SEP RR et les témoins. Cependant, cette étude a mis en évidence une augmentation significative du taux du 7KC plasmatique chez les patients atteints de SEP P par rapport à ceux atteints de SEP RR et par rapport aux témoins (Mukhopadhyay et al., 2017).

En outre, nos résultats montrent une augmentation significative du taux plasmatique du 24-hydroxycholestérol (24S-OHC), qui est le principal métabolite du cholestérol synthétisé *via* le cytochrome P450 (CYP46A1) et considéré comme un marqueur de neurones métaboliquement actifs (Leoni & Caccia, 2011), chez les patients atteints de SEP par rapport aux témoins. Cette accumulation du taux plasmatique en 24S-OHC pourraient être la conséquence d'une altération de la BHE (Saeed et al., 2014). Ceci pourrait être expliqué par une démyélinisation aiguë associée à une perte neuronale, puisque cet oxystérol est produit exclusivement dans les neurones. Ces taux plasmatiques anormaux en 24S-OHC suggèrent une atrophie cérébrale accompagnée d'une perte neuronale, ce qui pourrait être la conséquence d'une anomalie du métabolisme du cholestérol au niveau du SNC (Leoni et al., 2002). Il est maintenant bien établi que la perturbation du métabolisme du cholestérol cérébral est à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives, comme la SEP. Ces résultats concordent avec l'étude de Leoni et al., 2002, réalisée sur 118 patients qui a montré une augmentation significative du taux plasmatique du 24S-OHC chez tous les patients SEP à

différents stades de la maladie avec un taux plus élevé chez les patients les plus jeunes atteints de SEP par rapport aux patients SEP âgés (**Leoni et al., 2002**). A l'opposé, une étude menée sur 20 patients de chaque sous-type de SEP, a montré une diminution du taux de 24S-OHC chez les patients atteints de SEP de forme progressive primaire ainsi que chez les patients âgés atteints de SEP progressive récurrente (**Teunissen et al., 2003**).

Par ailleurs, en ce qui concerne les taux de 7 α -hydroxycholestérol (7 α -OHC) et de 27-hydroxycholestérol (27-OHC), aucune différence significative n'a été observée entre les patients SEP RR et les témoins. Cependant, **Mukhopodhay et al., 2017** ont montré une augmentation du taux de 7 α -OHC chez les patients SEP dans ces deux formes ; récurrente rémittente et progressive par rapport aux témoins, et une légère diminution du taux de 27-OHC chez les patients atteints de la SEP RR alors qu'une diminution plus prononcée a été observée chez les patients atteints de SEP P par rapport aux témoins (**Mukhopadhyay et al., 2017**).

L'ensemble de ces résultats suggèrent une relation entre les taux anormaux en oxystérols et la survenue de la SEP (dans ses différents stades).

Etant donné que les oxystérols jouent un rôle important dans le métabolisme du cholestérol *via* l'activation des facteurs de transcription nucléaire notamment celui de la famille des SREBP (Sterol Responsive Element Binding Protein), qui active à son tour plusieurs gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, des triglycérides, des phospholipides et des acides gras (**Horton et al., 2002**), entraînant ainsi d'importantes modifications du profil lipidique, il est donc important de déterminer une éventuelle altération du profil lipidique chez les patients atteints de SEP. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à étudier le profil de certains AG, en particulier les AGTLC, chez les patients atteints de SEP.

Nos résultats ont montré des modifications du profil des AG chez les patients atteints de SEP par rapport aux contrôles, tant au niveau plasmatique que cérébral. Une diminution significative du taux d'acide arachidonique (AA) (C20:4 n-9) et d'acide docosahexaénoïque (DHA) (C22:6 n-3) a été observée chez les patients atteints de SEP RR par rapport aux témoins, ainsi qu'une augmentation significative du taux d'acide docosanoïque (C22:0). Ces résultats pourraient suggérer un dysfonctionnement du métabolisme peroxysomal chez les patients atteints de SEP, puisque la β -oxydation des AGTLC se passe dans le peroxysome (**Wanders and Waterham, 2006; Lizard et al., 2012**), ou bien une altération de l'activité des élongases et des désaturases, qui sont des enzymes impliquées dans la biosynthèse des AG (**Zarrouk et al., 2015**). La diminution du taux du DHA peut être aussi due à une déficience

de l'enzyme bifonctionnelle (codée par le gène de HSD17B4), qui catalyse la conversion de l'acide tétracosahexaénoïque (C24:6 n-3) en DHA. Cet évènement peut réduire la biosynthèse du DHA ainsi que le flux de cet AG neuroprotecteur au cerveau (**Astarita et al., 2010**). Les acides gras polyinsaturés (AGPI) en particulier l'AA et le DHA sont très abondants dans le cerveau. Ils sont nécessaires pour un bon fonctionnement des cellules neuronales et pour maintenir la fluidité des membranes neuronales (**De Lau et al., 2005**); leurs diminutions pourraient donc être impliquées dans le processus de neurodégénérescence et donc dans la survenue des maladies neurodégénératives en particulier la SEP (**Youdim et al., 2000; De Lau et al., 2005**).

Sur la base de cette étude clinique préliminaire, qui a montré un stress oxydant chez les patients atteints de SEP, associé à un désordre du métabolisme lipidique traduit par une augmentation du taux des oxystérols (notamment le 7 β -OHC et le 7KC) ainsi qu'une altération du profil des acides gras, une possible altération peroxysomale (diminution de la biogénèse et/ou de l'activité de la β -oxydation peroxysomale) est suspectée.

Il est donc primordial de trouver des molécules ou des traitements capables de s'opposer à tous ces effets potentiellement délétères qui peuvent être impliqués directement ou indirectement dans l'initiation et/ou dans le développement de la SEP. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier, *in vitro*, les effets de deux médicaments utilisées dans le traitement de la SEP, sur les différents aspects impliqués dans la pathogenèse de la SEP. Nous avons donc étudié les effets du diméthyl fumarate (DMF) qui est le principe actif du Tecfidera, un traitement de fond de la SEP RR, et de son métabolite le monométhylfumarate (MMF) (**Werdenberg et al., 2003**), ainsi que de la biotine à fortes doses (MD1003), qui est un traitement oral de la SEP P (**Sedel et al., 2016**).

II. Etude *in vitro*

Le stress oxydant et le dysfonctionnement mitochondrial sont impliqués dans de nombreuses maladies neurodégénératives en particulier la SEP (**Di Carlo et al., 2012**). Ces dysfonctionnements sont connus pour amplifier la surproduction des espèces radicalaires favorisant ainsi la peroxydation lipidique et donc l'augmentation des taux des oxystérols, en particulier le 7KC et le 7 β -OHC (**Iuliano, 2011; Ragot et al., 2013**). Ces oxystérols sont souvent associés au développement de maladies neurodégénératives en particulier la SEP. Des taux élevés en oxystérols ont été identifiés dans le cerveau, le LCR et / ou le plasma des patients atteints la SEP (**Leoni and Caccia, 2015; Mukhopadhyay et al., 2017**), de la MA

(Zarrouk et al., 2014) et de l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD) (Nury et al., 2017).

En effet, le 7β -OHC et le 7KC sont connus comme des bons marqueurs du stress oxydant (Ziedén et al., 1999). La capacité de ces oxystérols à induire d'importants dysfonctionnements cellulaires (en particulier au niveau de la mitochondrie) leurs permettrait à contribuer dans l'évolution et l'aggravation des maladies neurodégénératives en particulier la SEP (Vejux and Lizard, 2009; Zarrouk et al., 2014; Nury et al., 2015; Nury et al., 2017). En effet, ils sont impliqués dans le déclenchement du stress oxydant associé à une perturbation de l'homéostasie RedOx, le désordre du métabolisme lipidique, l'inflammation, le dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomal et l'induction de la mort cellulaire qui sont les principales caractéristiques des maladies neurodégénératives comme la SEP (Vejux and Lizard, 2009; Zarrouk et al., 2014). La mort cellulaire induite par ces oxystérols a été définie comme un mode complexe de mort cellulaire impliquant le stress oxydant, l'apoptose et l'autophagie, connue sous le terme d'oxyapoptophagie. Ceci a été décrit dans plusieurs types cellulaires notamment les cellules oligodendrocytaires murines (158N) traitées avec le 7KC et le 7β -OHC mais aussi les cellules microgliales BV-2 et les promonocytes humains U937 (Nury et al., 2015).

Choix du modèle cellulaire et des conditions de traitements

Pour aborder, *in vitro*, ces différents aspects cités ci-dessus, il est nécessaire de disposer d'un modèle cellulaire approprié.

Dans la SEP, la destruction de la gaine de myéline peut conduire à un ralentissement des impulsions nerveuses d'où l'apparition des symptômes de cette pathologie. La myéline est formée par la fusion de membranes d'oligodendrocytes qui sont enroulées concentriquement autour de l'axone et compactées pour former un revêtement multilamellaire. Chaque oligodendrocyte myélinise des segments internodaux de 1 à 20 axones afin d'assurer un bon fonctionnement axonal et neuronal (Raymond AS et al., 2004). L'altération du métabolisme cellulaire des oligodendrocytes pourrait être une étape déterminante dans le processus de démyélinisation et de neurodégénérescence dans la SEP. Ainsi, nous avons caractérisé une lignée d'oligodendrocytes murins (158N) présentant les caractéristiques d'oligodendrocytes matures, notamment les marqueurs de différenciation terminale des oligodendrocytes impliqués dans la production, la maturation, la stabilisation ainsi que dans la compaction de la myéline (CNPase, MBP, PLP, MOG) (Feutz et al., 2001; Ghandour et al., 2002). En effet, la CNPase est une enzyme associée aux cellules productrices de la myéline dans le SNC

(**Sprinkle, 1989**). La protéolipide (PLP) et la protéine basique de la myéline (MBP), protéines majeures de la myéline, sont impliquées dans la stabilisation et la compaction de la myéline (**de Vries and Hoekstra, 2000**). La MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) est une protéine de myéline exprimée tardivement et indique la fin de la maturation oligodendrogliale (**Scolding et al., 1989**). L'expression de ces protéines de myéline montre que cette lignée oligodendrocytaire 158N constitue un outil intéressant pour évaluer les effets de certains facteurs et molécules tels que les oxystérols sur la prolifération et/ou la mort cellulaire. Le stress oxydant, l'activité peroxysomale incluant l'activité catalase, l'activité de certaines enzymes impliquées dans la β -oxydation (Acox1, Mfp-2) et l'expression des transporteurs peroxysomaux (Abcd1 et Abcd3), et l'activité mitochondriale ont été évalués sur 158N (**Baarine et al., 2009; Nury et al., 2015; Leoni et al., 2017**). Sur cette base, les cellules 158N peuvent être considérées comme un modèle cellulaire fiable pour explorer l'impact du stress oxydant, des altérations du métabolisme lipidique et du dysfonctionnement des organites (mitochondrie, peroxysome et lysosome) sur la dégénérescence oligodendrocytaire.

Par ailleurs, sur la base de plusieurs travaux, il est bien établi que la perturbation du métabolisme du cholestérol est à l'origine de multiples maladies neurodégénératives. Des taux accrus en oxystérols, en particulier en 7β -OHC, ont été observés au niveau du plasma et du LCR de patients atteints de maladies neurodégénératives (**Cheng et al., 2011; Nelson and Alkon, 2005**). Des taux élevés en 7β -OHC ont été rapportés dans le cortex des patients atteints de MA (**Testa et al., 2016**), ainsi que dans le plasma de patients atteints d'X-ALD (**Nury et al., 2017**), renforçant l'intérêt pour cet oxystérol dans le processus de démyélinisation.

Par ailleurs, comme le 7KC a été trouvé à des niveaux élevés dans le cerveau et le LCR des patients atteints de SEP (**Leoni et al., 2005**), et qu'il peut être converti en 7β -OHC par l'enzyme 11β -HSD1 (codée par le gène HSD11B1) (**Larsson et al., 2007; Odermatt and Klusonova, 2015**), on peut supposer que les effets délétères de ces deux oxystérols sont étroitement liés, et que le 7β -OHC pourrait contribuer directement ou indirectement (par sa conversion en 7KC) à la démyélinisation en induisant des dysfonctionnements au niveau des oligodendrocytes ce qui favoriserait le développement de la SEP. De plus, **Leoni et al., 2005** ont montré une légère augmentation du taux cérébral du 7β -OHC chez les patients atteints de SEP, comparativement aux témoins (**Leoni et al., 2005**). Ceci suggère l'implication probable de cet oxystérol dans la pathogenèse de la SEP.

Des études *in vitro* sur des oligodendrocytes 158N ont montré que le 7 β -OHC déclenche un stress oxydant associé à des dysfonctionnements mitochondriaux, signes distinctifs de la neurodégénérescence (**Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015**). En se référant aux travaux antérieurs menés dans notre laboratoire, et par d'autres équipes, une gamme de concentration du 7 β -OHC (allant de 1; 6,25 ; 12,5; 25; 50;100 et 200 μ M) a été appliquée sur les cellules 158N. Cette gamme présente à la fois des concentrations faiblement et moyennement toxiques (1; 6,25 ; 12,5 et 25 μ M) et des concentrations toxiques (50; 100 et 200 μ M). Ainsi la concentration du 7 β -OHC qui induit une diminution de 50% des cellules MTT positives est celle de 50 μ M, même concentration utilisée dans le travail réalisé par **Ragot et al., 2013**. Cette concentration semble être élevée par rapport au taux plasmatique et cérébral chez les patients SEP (**Leoni et al., 2005**). Cependant, avec les concentrations utilisées, seule une partie de ces oxystérols (10 à 20%) s'accumule dans les cellules ; dans ces conditions, le niveau intracellulaire se situe donc dans la marge de concentration en oxystérols trouvée dans les cellules de la paroi artérielle chez les patients atteints d'athérome. Pour des raisons éthiques, aucune donnée n'est disponible sur le niveau intracellulaire d'oxystérols dans les cellules nerveuses. Sur cette base, nous avons calculé les niveaux de 7 β -OHC présents dans les cellules (traitées avec du 7 β -OHC, uniquement). Après 24 heures d'incubation, cela ne représente que 1% de la quantité d'oxystérol introduite dans le milieu de culture. À la lumière de toutes ces données, la concentration en 7 β -OHC la plus appropriée, utilisée sur les cellules 158N, dans cette étude est celle de 50 μ M.

Les effets cytotoxiques du 7 β -hydroxycholestérol sur les oligodendrocytes murins 158N

Actuellement, il est bien établie que toutes les maladies neurodégénératives ont une pathoétiologie similaire impliquant le stress oxydant, les altérations mitochondriales et l'inflammation associés à une mort des cellules du système nerveux y compris les oligodendrocytes, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, le phénomène de la démyélinisation dans la SEP.

L'accumulation cérébrale et plasmatique d'oxystérols est considérée comme une caractéristique biochimique commune de nombreuses maladies neurodégénératives y compris la SEP (**Zarrouk et al., 2014; Senanayake et al., 2015; Nury et al., 2016**). On suppose qu'une meilleure prise en charge de la SEP, passe par une meilleure compréhension et identification des cibles des oxystérols, impliqués dans la physiopathologie de la SEP y compris le 7 KC et le 7 β -OHC, et des voies menant à leurs toxicités.

Il est bien établie, sur les cellules 158N, que le 7 β -OHC induit une dégénérescence cellulaire associée à un stress oxydant et un dysfonctionnement mitochondrial (**Vejux and Lizard, 2009; Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015**).

Pour expliquer la part prise par le 7 β -OHC dans la pathogenèse de la SEP, des cellules oligodendrocytaires murines (158N) ont été mises en présence de cet oxystérol pendant 24 h.

La cytotoxicité du 7 β -OHC sur les cellules 158N a été souvent caractérisée par des modifications de la morphologie et/ou du fonctionnement cellulaire (**Nury et al., 2015; Ragot et al., 2013**). En accord avec ces observations, dans le présent travail, et dans les conditions du traitement des cellules 158N par le 7 β -OHC, une augmentation marquée des cellules rondes et flottantes et une diminution des cellules adhérentes ont été mises en évidence, suggérant une inhibition de la croissance cellulaire et une perte d'adhésion cellulaire, qui pourrait être en partie due à des modifications de la configuration de l'actine (**Zahm et al., 2003**). Ces changements ont été associés à une perte d'intégrité membranaire, suggérant une altération des constituants de la membrane associée à une mort cellulaire. Ces altérations pourraient être expliquées par un déséquilibre du statut RedOx et donc la survenue d'un stress oxydant, induit par le 7 β -OHC, qui pourrait affecter les différents compartiments et constituants cellulaires suite à une oxydation des macromolécules cellulaires (protéines et lipides). En faveur de cette hypothèse, nos résultats ont montré que dans les cellules 158N, le 7 β -OHC induit une surproduction des espèces radicalaire de l'oxygène (ERO), à savoir une production accru d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), de peroxydes d'hydrogène (H_2O_2), et d' $O_2^{\bullet-}$ mitochondrial associée à une augmentation des activités enzymatiques antioxydantes (SOD, catalase, GPx). De plus, une accumulation des produits d'oxydation des lipides et des protéines ont été révélés suite au traitement des cellules 158N par le 7 β -OHC. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par **Zarrouk et al., 2018a**. En effet, l'accumulation intracellulaire d' $O_2^{\bullet-}$ pourrait être la conséquence d'une lésion mitochondriale et / ou d'une activation de différents isoformes de la NADPH oxydase (**Nury et al., 2015**); (**Chew and Watts, 2004**). Par ailleurs, la stimulation de l'activité d'enzymes anti-oxydantes tels que le GPx, la catalase et la SOD a été considérée comme une réaction cellulaire nécessaire pour la défense contre les ERO produites par le 7 β -OHC, notamment $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 . En faveur cette hypothèse, **Yuan et al.** ont montré, dans les macrophages humains exposés au 7KC, une augmentation de niveau d'ARNm de MnSOD (**Yuan et al., 2000**). En effet, la surproduction des radicaux libres à savoir les ERO pourrait favoriser l'augmentation de l'activité des

enzymes anti-oxydantes suite à une cascade d'événements nécessaires à la réduction du stress oxydant.

En accord avec des études antérieures (**Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2018a**), la rupture de l'équilibre RedOx, observée suite au traitement des cellules 158N par le 7 β -OHC, est également associée à une augmentation de l'oxydation des lipides et des protéines et à une accumulation de leurs produits d'oxydations tels que les malondialdhydes (MDA), les diènes conjugués (DC) et les protéines carbonylées (PC). L'ensemble de ces résultats suggère que ces produits d'oxydation de lipides et de protéines pourraient être considérés comme des biomarqueurs du stress oxydant dans les maladies neurodégénératives associées à des taux élevés en 7 β -OHC.

Au niveau des cellules 158N exposées au 7 β -OHC, pareils que lorsqu'elles sont exposées au 7KC (**Leoni et al., 2017**), la surproduction d'ERO est associée à une perte de potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et donc à une dépolarisation mitochondriale. Ainsi, nous nous sommes intéressés à caractériser les altérations mitochondriales associées au 7 β -OHC. En accord avec des études précédentes, nous avons trouvé que le 7 β -OHC est capable d'induire des dysfonctionnements mitochondriaux, notamment des altérations morphologiques, fonctionnelles et métaboliques (**Nury et al., 2015**). Cela inclut: une perte de l'activité de la succinate déshydrogénase, une perte de $\Delta\Psi_m$, une surproduction d'O₂^{•-} au niveau de la mitochondrie. Ces résultats sont en accord avec d'autres études menées sur différents types cellulaires tels que les cellules neuronales humaines (**Ferrera et al., 2008; Zarrouk et al., 2015a**). Ces événements étaient associés à une augmentation de la masse mitochondriale qui pourrait être une conséquence de la perte de $\Delta\Psi_m$. On peut également supposer que l'augmentation de la masse mitochondriale pourrait être une conséquence du dysfonctionnement des complexes mitochondriaux (**Mahad et al., 2009; Witte et al., 2009**), impliqués dans le processus de démyélinisation (**Campbell and Mahad, 2011**). Toutefois, l'augmentation de la masse mitochondriale suite à l'exposition au 7 β -OHC pourrait être aussi un outil de protection contre le dysfonctionnement de cet organe. Ceci correspond à une réponse adaptative de la mitochondrie pour maintenir des niveaux d'ATP nécessaires pour le bon fonctionnement et la survie cellulaire (**Gomes and Scorrano, 2011**), prévenir la chute de $\Delta\Psi_m$ et préserver le métabolisme mitochondrial (**Zahm et al., 2003**). Par ailleurs, il a été rapporté qu'une augmentation de la masse mitochondriale est corrélée à une hyperactivité du complexe mitochondrial IV dans les axones de patients atteints de SEP (**Mahad et al., 2009; Witte et al., 2009**). Cette augmentation de la masse mitochondriale déterminée après

coloration au MitoTracker-Red, qui est fluorochrome capable de diffuser rapidement et de s'accumuler à l'intérieurs des mitochondries métaboliquement actives, pourrait être associée à des éventuelles modifications des constituants et des caractéristiques de la membrane mitochondriale. Nous avons ainsi cherché à déterminer l'effet du 7 β -OHC sur le taux des cardiolipines, qui sont des phospholipides mitochondriaux synthétisés et situés dans la membrane mitochondriale interne, impliqués dans diverses fonctions mitochondriales, notamment la phosphorylation oxydative et la production d'ATP (**Zahm et al., 2003; Paradies et al., 2014;**). Il apparaît que le traitement des cellules 158N avec du 7 β -OHC agit non seulement en modifiant la morphologie des mitochondries mais aussi la composition biochimique et les caractéristiques de leurs membranes internes.

Nos résultats ont révélés une diminution du taux des cardiolipines suite au traitement des cellules 158N par le 7 β -OHC. Des résultats similaires ont été observés suite au traitement des cellules 158N par le 7KC (**Nury et al., 2018**). Ceci pourrait être expliqué par i) une conversion des cardiolipines en d'autres lipides, ii) une oxydation accrue des cardiolipines, iii) une hydrolyse accrue par des phospholipases endogènes, iiiii) une diminution de leur synthèse de *novo* résultant d'une altération de la fonction des enzymes impliquées dans leur synthèse ou d'une diminution de la biodisponibilité des précurseurs des cardiolipines, qui pourrait refléter des modifications structurales biochimiques, bioénergétiques et fonctionnelles au niveau de la mitochondrie (**Sorice et al., 2004**). Ainsi, on peut supposer un relargage de cardiolipines, résultants de modifications topographiques des mitochondries, vers la membrane plasmique (**Sorice et al., 2000; Sorice et al., 2004;**). Ces données soulignent le rôle majeur du 7 β -OHC dans le dysfonctionnement mitochondrial.

La mitochondrie joue ainsi un rôle principale dans le contrôle de la chaîne respiratoire afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP *via* le cycle de Krebs (aussi appelé cycle de l'acide tri-carboxylique, TCA), qui est primordial pour de nombreuses fonctions cellulaires incluant le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides (**Pierrel et al., 2007**). Nos résultats ont montré un dysfonctionnement de cycle de Krebs dans les cellules 158N traitées par le 7 β -OHC, qui est révélé par une augmentation du taux du lactate et une diminution du taux de pyruvate. Ceci pourrait être expliqué par un défaut du métabolisme des glucides en particulier un défaut de la glycolyse ou par une altération des activités des canaux K⁺ mitochondriaux (**Bezine et al., 2017**). En présence du 7 β -OHC, l'accumulation d'acide lactique résultant de la conversion du pyruvate afin de régénérer le NAD⁺, est utilisé ultérieurement pour rétablir la glycolyse. Puisque le pyruvate est le précurseur de l'acétyl-CoA, la diminution du taux de

pyruvate pourrait être à l'origine de l'atération du cycle de Krebs et de la perturbation de l'activité des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs. En faveur de cette hypothèse, une baisse du taux de certains acides organiques impliqués dans l'activité du cycle de Krebs, en particulier le citrate, le fumarate, la succinate et le malate, a été démontrée suite au traitement des cellules 158N par le 7 β -OHC. Ainsi, la perturbation du cycle de Krebs pourrait entraîner une altération de la phosphorylation oxydative associée à une perturbation de l'homéostasie RedOx, qui sont les principales causes des dysfonctionnement mitochondriaux ((**Mamer et al., 2013; Leoni et al., 2017**).

En raison des interactions et des complémentarités métaboliques entre les mitochondries et les peroxysomes, qui sont des cibles potentielles pour les oxystérols et qui sont vulnérables au stress oxydant (**Pascual-Ahuir et al., 2017; Nury et al., 2018**), il est donc intéressant d'étudier les effets du 7 β -OHC sur les peroxysomes, en évaluant l'expression de certains marqueurs peroxysomaux tels que les protéines impliquées dans le transport des AGTLC du cytosol vers le peroxysome en vue de leur dégradation par la voie de la β -oxydation peroxysomale (ABCD1 et ABCD3) et les enzymes assurant la β -oxydation peroxysomale, notamment ACOX1 (enzyme qui catalyse la première étape de la β -oxydation peroxysomale) et MFP2 (enzyme qui catalyse la deuxième étape de la β -oxydation peroxysomale) (**Wanders and Waterham, 2006; Kemp et al., 2011**), ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse de plasmalogènes peroxysomals (DHAPAT et ADHAPS) (**Brites et al., 2004; Wanders et al., 2016**).

L'observation des cellules immunomarquées en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre ABCD3 a montré une plus faible densité en peroxysomes dans les cellules 158N traitées par le 7 β -OHC. Cette observation a été confirmée par une analyse par cytométrie en flux avec laquelle une augmentation significative du pourcentage des cellules sous-exprimant ABCD3 associée à une baisse de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marquage d'ABCD3 a été révélée. Etant donnée que ABCD3 est un marqueur de masse peroxysomale (**Santos et al., 1994**), ces résultats confirment une diminution de la masse et/ou du nombre des peroxysomes dans les cellules 158N traitées par le 7 β -OHC.

De plus, une diminution de l'expression génique de différents marqueurs peroxysomales (ABCD3, ABCD1, ACOX1, MFP2, DHAPAT et l'ADHAPS) a été observée dans les cellules 158N traitées par le 7 β -OHC. Ces résultats soulignent l'impact du 7 β -OHC sur les différentes protéines peroxysomales (transporteurs et enzymes). On peut donc supposer que le 7 β -OHC est impliqué dans l'altération de nombreuses réactions du métabolisme peroxysomal à savoir,

i) l'inhibition de la synthèse de plasmalogènes, qui jouent un rôle dans la dynamique membranaire, constituent des éléments structuraux de la myéline, maintiennent l'équilibre RedOx et participent au métabolisme des AGPI (**Maeba and Ueta, 2003; Brites et al., 2004; Kuczynski and Reo, 2006**) et ii) l'altération de la voie de la β -oxydation peroxysomale, qui pourrait conduire à un défaut de signalisation cellulaire, un désordre dans le métabolisme des acides gras mais aussi une perturbation dans l'homéostasie du statut RedOx et par conséquent une amplification de la peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines. Sur la base de ces observations, nous avons ainsi supposé que ces dysfonctionnements peroxisomaux pourraient impacter l'activité mitochondriale dont les altérations sont bien établies dans la pathogenèse de la SEP (**Witte et al., 2009**). En faveur de cette hypothèse, dans les cellules 158N et les cellules microgliales BV-2, le 7KC induit une baisse du niveau d'expression des marqueurs peroxysomaux associée au dysfonctionnement mitochondrial et à l'amplification du stress oxydant caractéristiques des maladies neurodégénératives comme la SEP (**Baarine et al., 2012; Nury et al., 2017; Nury et al., 2018**).

Dans leur ensemble, nos résultats montrent que le 7 β -OHC affecte les marqueurs peroxysomaux (ABCD3, ABCD1) responsables du transport et de la dégradation des AGTLG ainsi que la synthèse de plasmalogènes qui sont impliqués dans de multiples fonctions cellulaires. Une déficience ou une altération de ces marqueurs peroxysomaux pourrait être à l'origine de nombreux dommages cellulaires contribuant au processus neurodégénératif (**Aubourg and Wanders, 2013; De Munter et al., 2015**). Ces observations sont en faveur d'une implication du métabolisme peroxysomal dans la pathogenèse de la SEP.

L'observation des modifications ultrastructurales des cellules 158N traitées avec le 7 β -OHC, réalisées par microscopie électronique à transmission, renforce l'hypothèse selon laquelle le 7 β -OHC induit des altérations mitochondriales et peroxysomales dans les cellules 158N. Dans ces conditions, une modification de la morphologie peroxysomale et mitochondriale a été observée. En effet, plusieurs peroxysomes et mitochondries de formes irrégulières ont été visualisés. Ces observations soulignent l'impact du 7 β -OHC sur les principaux organelles cellulaires (peroxysomes et mitochondries) ce qui pourrait expliquer au moins en parties les différents dommages mitochondriaux et peroxysomaux observés chez les patients de SEP.

Outre leur rôle dans le métabolisme des AG et dans le contrôle de l'équilibre du stress oxydant, les peroxysomes sont impliqués dans la synthèse du cholestérol (**Faust and Kovacs, 2014**). De ce fait, l'évaluation de l'impact du 7 β -OHC sur le métabolisme du cholestérol, à

savoir la quantification de certains précurseurs et dérivés du cholestérol, était un paramètre intéressant à aborder.

Les lipides en particulier le cholestérol, sont indispensables pour un bon fonctionnement du cerveau (**Dietschy and Turley, 2004**). Environ 25% du cholestérol total est présent dans le cerveau (**Björkhem, 2006**) dont 70% se localise dans la gaine de myéline, synthétisée par les oligodendrocytes (**Morell and Quarles, 1999**). Le cholestérol est donc un composant structural essentiel de la myéline et joue également un rôle majeur dans la régulation de la structure de la myéline en modifiant le ciblage de la protéine de base de la myéline (MBP) et du compactage de la myéline (**Saher et al., 2009**).

La présente étude montre une diminution significative du taux du cholestérol total ainsi que de ses précurseurs, le lathostérol, le lanostérol et le desmostérol dans les cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC, ce qui suggère un défaut de synthèse du cholestérol. Nos résultats sont en accord avec d'autres études, effectuées sur différents types cellulaires exposées à différents oxystérols cytotoxiques tels que le 24S-OHC et le 7KC, qui ont montré que l'altération de la synthèse du cholestérol est associée à un dysfonctionnement mitochondrial entraînant différentes formes de mort cellulaire, notamment l'apoptose et la nécroptose (**Yamanaka et al., 2015; Leoni et al., 2017**). Ceci laisse supposer que l'altération de la synthèse du cholestérol pourrait contribuer au processus de démyélinisation et à des défauts dans la composition, la structure et la qualité de la myéline (**Brahmi et al., 2018**), caractéristique des maladies démyélinisantes, notamment la SEP. Dans cette étude, nous pouvons donc supposer qu'un stress oxydant associé à des altérations mitochondriales et peroxysomales induites par le 7 β -OHC, pourrait expliquer au moins en partie le désordre du métabolisme et de la synthèse du cholestérol

Ainsi, dans les conditions du stress oxydant, le cholestérol peut être oxydé, entraînant la formation des dérivés oxydés du cholestérols tels que le 7KC et le 7 β -OHC (**Iuliano, 2011**). Néanmoins, en présence du 7 β -OHC, une accumulation intracellulaire du 7KC a été révélée, témoignant d'une augmentation du stress oxydant et d'une amplification de la peroxydation lipidique (**Iuliano, 2011**). Nos résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'altération de la synthèse du cholestérol conduit à une perturbation de l'homéostasie du cholestérol (**Dias et al., 2018**) qui dans les conditions du stress oxydant, pourrait être associée à une augmentation des taux de certains oxystérols. De plus, il a été rapporté que les oxystérols peuvent perturber l'homéostasie lipidique par l'activation de facteurs de transcription. Ils peuvent agir sur les protéines de liaison aux éléments sensibles aux stérols

(SREBP), qui activent à leurs tours plusieurs gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, des triglycérides, des phospholipides et des acides gras (**Horton et al., 2002**), entraînant ainsi des modifications du profil lipidique. De plus, les acides gras, composants essentiels des phospholipides, jouent un rôle important dans la maintenance de la de la structure et du bon fonctionnement de la gaine de myéline (**Morell and Quarles, 1999**). Il était donc important d'évaluer à la fois le profil des acides gras et la teneur en phospholipides tels que les sphingomyélines, ainsi que les phosphatidylcholines dans les cellules traitées avec du 7 β -OHC. Dans ces conditions du traitement, une baisse du taux des acides gras saturés en particulier l'acide myristique (C14:0), l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18: 0), qui sont des éléments structuraux des phospholipides membranaires, ainsi qu'une diminution du taux de phosphatidylcholine et de sphingomyéline a été observée. Ces données constituent un argument supplémentaire en faveur d'une corrélation entre le dysfonctionnement du cycle de Krebs et l'altération de la synthèse des acides gras (**Koh et al., 2004**).

De plus, une accumulation des AGTLC, en particulier l'acide béhénique (C22:0), l'acide tétracosanoïque (C24:0) et l'acide cérotique (C26:0), a été également mise en évidence dans les cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC. Ceci suggère un dysfonctionnement peroxysomal et un défaut dans la β -oxydation peroxysomale, puisque la dégradation des AGTLC se produit dans le peroxysome (**Wanders and Waterham, 2006**). Ainsi, comme indiqué avec le 7KC, le traitement des cellules 158N avec du 7 β -OHC induit un dysfonctionnement peroxisomal (**Nury et al., 2018**). Il est à noter qu'un excès en AGTLC peut induire une mort cellulaire associée à un dysfonctionnement mitochondrial et à un stress oxydant au niveau des cellules nerveuses (**Hapala et al., 2011**), ce qui pourrait aggraver l'effet cytotoxique du 7 β -OHC. Conformément à des études antérieures, les taux des acides gras mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) ont également été réduits dans les cellules 158N traitées par le 7 β -OHC (**Zarrouk et al., 2018a**). Il est également bien établi que les AGMI et les AGPI sont indispensables à la fluidité de la membrane neuronale (**Simopoulos, 1999; De Lau et al., 2005**) et possèdent des propriétés neuroprotectrices, anti-inflammatoires et antioxydantes (**Colette et al., 2003; De Lau et al., 2005; Dyll, 2015**). Ceci laisse supposer que leurs diminutions pourraient être impliquées dans le déclenchement et/ou dans l'exacerbation de la dégénérescence (**Youdim et al., 2000; De Lau et al., 2005**). Il est également important de souligner que ces modifications au niveau des acides gras cellulaires pourraient être liées à la répression de l'activité de l'ATP-citrate lyase (ACYL), ce qui déclenche une régulation négative de l'élongase (ELOVL6) et pourrait donc contribuer à la modification du profil des

acides gras (**Migita et al., 2014**). Dans l'ensemble, les modifications quantitatives des lipides (cholestérol, acides gras, et phospholipides), induites par le 7β -OHC, pourraient être impliquées dans le processus de démyélinisation, étant donné leurs rôles dans la biogenèse, la composition et le fonctionnement de la gaine de myéline.

Il est donc intéressant d'étudier l'impact du 7β -OHC sur les principales protéines de myéline, notamment la PLP et la MBP, qui correspondent respectivement à 50 et 30% des protéines totales de la myéline (**Baumann and Pham-Dinh, 2001**), et qui sont exprimées dans les cellules 158N (**Baarine et al., 2009**). Nos résultats ont montré une augmentation de l'expression de PLP et MBP dans les cellules 158N traitées avec du 7β -OHC. Ceci pourrait correspondre à une réponse adaptative des oligodendrocytes pour remédier aux effets délétères du 7β -OHC. Ceci suggère la capacité des cellules 158N à développer un moyen de lutte et de régénération de la myéline après l'action des facteurs nocifs tels que les oxystérols cytotoxiques notamment le 7β -OHC. Ces observations laissent supposer l'installation d'un processus de remyélinisation après une démyélinisation aiguë, phénomène observé chez les patients atteints de SEP RR.

Sur la base de multiples travaux antérieurs sur différentes lignées cellulaires, il est bien établi que le 7β -OHC est un oxystérol fortement cytotoxique, induisant une mort cellulaire complexe (**Lizard et al., 1999; Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2015a**). Nous avons donc caractérisé le type de mort cellulaire induite par le 7β -OHC. Nos données montrent que le 7β -OHC induit une mort cellulaire de type apoptotique impliquant la voie de signalisation mitochondriale et l'activation de la caspase-3, et caractérisée morphologiquement par des noyaux fragmentés et / ou condensés. Par ailleurs, une implication des lysosomes a été mise en évidence, témoignant d'une mort cellulaire par autophagie qui est caractérisée par une déstabilisation de la membrane lysosomale et une perturbation de l'intégrité lysosomale ainsi que la formation de vésicules autophagiques. Ces données soulignent l'implication du dysfonctionnement lysosomal dans la mort cellulaire induite par le 7β -OHC (**Malvitte et al., 2008**). Ces dysfonctionnements pourraient ainsi contribuer à des altérations mitochondriales (**Chwieralski et al., 2006**), puisque la déstabilisation de la membrane lysosomale favorise le relargage d'enzymes protéolytiques dans le cytoplasme, ce qui contribue à la dépoliarisation des mitochondries. En outre, une conversion de LC3-I en LC3-II et une augmentation du rapport (LC3-II / LC3-I), caractéristique de l'autophagie, ont été également observées, montrant que le 7β -OHC induit un mode particulier de mort cellulaire, connue sous le nom d'oxyapoptophagie (**Nury et al., 2015**).

Globalement, nos données mettent en évidence le rôle du 7 β -OHC dans l'induction du stress oxydant, le dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomal, l'altération du métabolisme cellulaire et l'induction de la mort cellulaire, caractéristiques communes des maladies neurodégénératives. De plus, notre étude apporte de nouvelles informations sur la voie de signalisation induite par le 7 β -OHC. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs universels de PKA, PLC, PKC et MEK, conforte l'hypothèse d'une activation de la voie de signalisation PKC / p38 / MEK dans les cellules 158N traitées par le 7 β -OHC (Clarion et al., 2012). Des expériences consistant à utiliser des antagonistes et/ou des agonistes spécifiques pour les récepteurs du 7 β -OHC, n'ont pas été réalisées mais seraient certainement intéressantes pour mieux comprendre les voies de signalisation de cet oxystérol.

Les différents événements associés à l'oxyapoptophagie, révélés à partir des données obtenues dans la présente étude et dans des études antérieures, sont résumés dans la **Figure 54**.

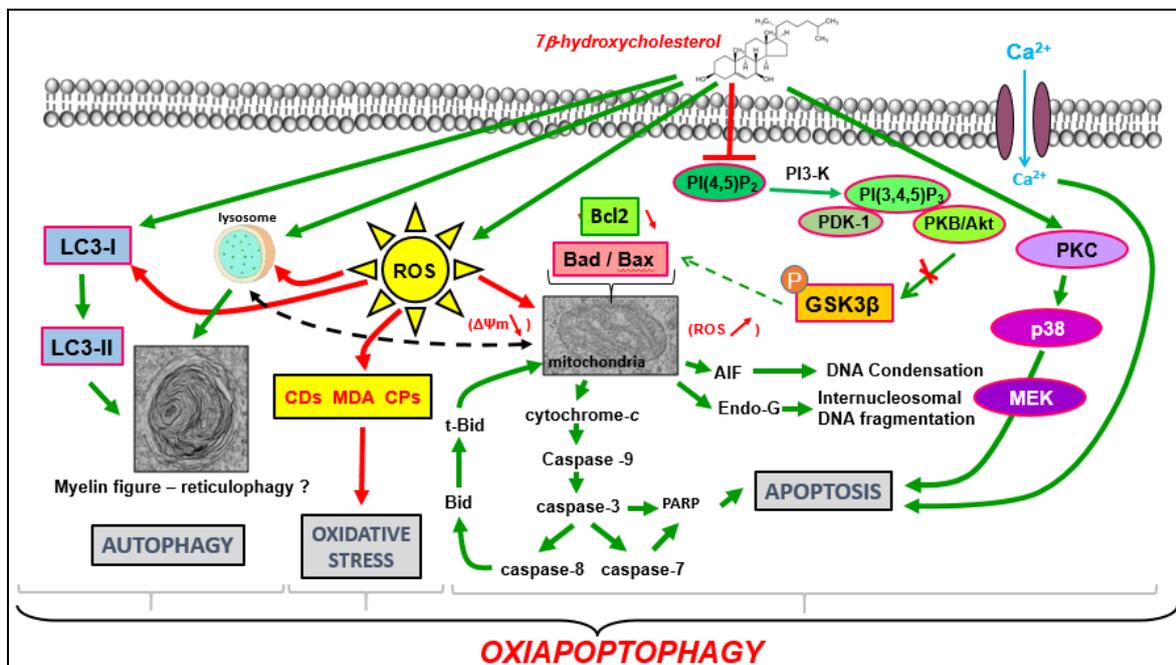


Figure 54 : Schématisation des voies de signalisation associées à l'oxyapoptophagie induite par le 7 β -hydroxycholestérol

Le schéma présenté résume les données obtenues à partir de différents types de cellules (Rothe and Valet, 1990; Wanders and Waterham, 2006; Vejux et al., 2008; Vejux and Lizard, 2009; Zarrouk et al., 2014; Nury et al., 2015). Dans les différents types cellulaires étudiés, le 7 β -OHC a été démontré comme un puissant inducteur de surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dans les cellules 158N, le 7 β -OHC induit une perturbation de l'homéostasie RedOx en augmentant la formation de produits de peroxydation lipidique (malondialdéhyde (MDA), diènes conjugués (CD)) et protéines carbonylées (PC) pouvant

contribuer à la mort cellulaire. Un impact important sur les mitochondries a également été observé. Dans les cellules humaines monocytaires THP-1 et U937, une inhibition de l'expression de Bcl-2 a également été détectée, ainsi qu'une surexpression des protéines pro-apoptotiques (Bid, Bax), associée à une libération de cytochrome c et à une activation des caspases-9, -8, -3 et -7. Dans les cellules U937, le 7 β -OHC induisait également une augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique, associée à une diminution de l'activation d'Akt et à une libération mitochondriale de diverses protéines telles que le cytochrome-c, le facteur inducteur de l'apoptose (AIF) et l'endonucléase G), associé à l'activation des caspases-3, -7, -8 et -9, au clivage de Bid et à la dégradation de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP). Dans les cellules de glioblastome C6, le 7 β -OHC induit une apoptose associée à une diminution de la signalisation ERK, une activation transitoire de PI3K / Akt, une perte d'activation de GSK3 β et une activation de p38. Les données obtenues dans la présente étude sur des cellules 158N confirment que l'activation de p38 pourrait être déclenchée par la PKC. Sur les cellules U937 ainsi que sur les cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes humaines (ARPE-19), des corps myéliniques (évoquant une réticulophagie) ont été observés. Sur les cellules ARPE-19, un lien entre le lysosome et la mort cellulaire a également été établi. Dans les cellules 158N, le mode complexe de mort cellulaire induit par le 7 β -OHC (oxyapoptophagie) est caractérisé par une déphosphorylation de PKB / Akt, une activation de GSK3 et une expression réduite de Bcl-2; ensemble, ces événements contribuent à la dépolarisation des mitochondries conduisant à l'activation de la caspase-3, à la dégradation de la PARP et à la fragmentation de l'ADN internucléosomal. De plus, le 7 β -OHC favorise la conversion de LC3-I en LC3-II, critère d'autophagie. Globalement, ces données suggèrent que le 7 β -OHC est un puissant inducteur de l'oxyapoptophagie par l'activation concomitante de plusieurs voies de signalisation impliquées dans le stress oxydant, l'apoptose et l'autophagie.

Effets cytoprotecteurs du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine

L'ensemble de nos données fournissent des preuves en faveur l'implication du 7 β -OHC dans le processus neurodégénératif étant donné qu'il induit un déséquilibre du stress oxydant caractérisé par une surproduction des ERO et des produits d'oxydation lipidiques et protéiques, ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial, lysosomal et peroxysomal associé à une mort cellulaire (Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015). Ces événements contribuent au processus dégénératif observé dans les maladies neurodégénératives comme la SEP (Gonsette et al., 2008). Il est donc primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ou

d'identifier et/ ou d'optimiser des molécules déjà existantes pour s'opposer aux effets délétères du 7 β -OHC qui pourrait être impliqué dans le processus dégénératif dans la SEP. A l'heure actuelle, plusieurs molécules ont été identifiées pour atténuer et/ou inhiber les activités cytotoxiques induites par les oxystérols, en particulier le 7 β -OHC. Parmi ces molécules, l' α -tocophérol est considérée comme le composé le plus puissant pour s'opposer aux effets cytotoxiques du 7 β -OHC (**Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2015a**). Cependant, cette molécule est utilisée à des concentrations élevées (200 à 400 μ M) pour avoir un effet protecteur (**Ragot et al., 2013**).

Dans la présente étude, le diméthyle fumarate (DMF) et son principal métabolite, le monométhyle fumarate (MMF) ont été choisis pour lutter contre le stress oxydant, les dommages mitochondriaux et peroxysomaux et la mort cellulaire induits par le 7 β -OHC. Ces molécules ont été choisies en raison de leurs capacités à prévenir le stress oxydant par la régulation positive des mécanismes anti-oxydants (**Fox et al., 2014**). Le DMF, commercialisé sous le nom de *Tecfidera* (Biogen), est utilisé pour traiter les patients atteints de SEP-RR.

Par ailleurs, des résultats encourageants ont été obtenus avec la biotine utilisée chez des patients atteints de SEP P (**Sedel et al., 2016**). Ceci nous a mené à se demander si ce coenzyme ubiquitaire est capable d'atténuer les effets nocifs induits par le 7 β -OHC. Il est à noter que la biotine, actuellement en cours d'évaluation dans le traitement de l'X-ALD et de la SEP P (**Sedel et al., 2016; Sedel, 2017**), joue un rôle crucial dans la chimie du cerveau, la synthèse de la myéline et les fonctions mitochondriales (**Tong, 2013; Sedel et al., 2015**). Etant donné que la biotine est un coenzyme pour cinq carboxylases impliquées dans le cycle de Krebs et le métabolisme des acides gras (**Tong, 2013**), ceci laisse supposer que cette molécule pourrait favoriser la formation et/ou la réparation de la myéline dans les oligodendrocytes et augmenter la production d'énergie cérébrale (**Sedel et al., 2016**). Ceci serait une stratégie attrayante pour le traitement de la SEP dans sa forme progressive (**Franklin, 2008**).

Il est donc important d'étudier, sur des cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC, les effets du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) et de la biotine (10-100 nM) sur le stress oxydant, les dysfonctionnements mitochondriaux et peroxysomaux, l'expression des protéines de myéline et la mort cellulaire, qui sont les principaux paramètres impliqués dans le processus de démyélinisation.

Dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées dans des travaux antérieurs, pour évaluer les effets de l' α -tocophérol (200-400 μ M) (**Ragot et al., 2013; Nury et al.,**

2015), nos résultats montrent que le DMF (25 μ M), le MMF (25 μ M) et la biotine (10-100 nM) sont aussi efficaces que l' α -tocophérol pour atténuer des effets cytotoxiques induits par le 7 β -OHC.

En effet, une atténuation du détachement cellulaire et une préservation de l'intégrité de la membrane plasmique ont été observées dans les cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M), en présence du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) ou de la biotine. Ces observations suggèrent la capacité de ces molécules à réparer les fonctions cellulaires altérées suite au traitement avec du 7 β -OHC.

Par ailleurs, il a été démontré que le DMF induit une augmentation des molécules antioxydantes telles que le glutathion (GSH), la carnitine et l'acide ascorbique (**Huang et al., 2015**). Ces molécules, notamment l'acide ascorbique, sont capables de maintenir l'intégrité de la membrane plasmique dans un environnement pro-oxydant en empêchant la peroxydation des lipides (**Chwieralski et al., 2006**). Dans notre étude, la capacité du DMF à augmenter le niveau de groupements SH suggère que ce composé pourrait favoriser ce mécanisme de protection, par l'activation de la voie Nrf2 (**Nguyen et al., 2009**). Il est donc intéressant d'évaluer la part prise par le DMF et son métabolite majeur, le MMF, dans le maintien de l'équilibre RedOx.

Nos résultats montrent que le DMF et le MMF sont capables d'inhiber la surproduction des ERO, d'amplifier les activités enzymatiques antioxydantes (SOD, catalase, GPx), d'augmenter le niveau des groupements SH et de réduire les produits de peroxydations lipidiques et d'oxydation des protéines. L'ensemble de ces observations souligne la capacité du DMF et du MMF à atténuer la cytotoxicité induite par le 7 β -OHC sur les cellules 158N.

Ces résultats concordent avec d'autres études effectuées sur des cellules oligodendrocytaires humaines (cellules MO3.13), qui ont permis de mettre en évidence la capacité du DMF à moduler l'activité des enzymes antioxydantes et à prévenir la mort cellulaire induite par la surproduction du H₂O₂ (**Huang et al., 2015**), soulignant ainsi le pouvoir anti-oxydant et cytoprotecteur du DMF. Ces observations renforcent l'intérêt porté à cette molécule.

Parallèlement à ces données, étant donnée que le DMF est capable de réguler l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes, il pourrait donc intervenir activement dans la régulation de l'homéostasie RedOx. En accord avec d'autres travaux (**Lismont et al., 2015; Suneetha, 2016**), le DMF et le MMF sont capables de contrecarrer la surproduction de O₂^{•-} mitochondrial dans les cellules 158N traitées avec du le 7 β -OHC. Ceci suggère le rôle de ces

molécules dans le maintien de l'équilibre RedOx mais aussi dans la prévention des lésions mitochondriales.

Une deuxième molécule, la biotine, est aussi efficace que le DMF, le MMF et l' α -tocophérol pour contrôler le statut RedOx.

Sur la base des différentes constatations et hypothèses, il est pertinent d'examiner si la biotine est aussi capable de prévenir les modifications cellulaires induites par le 7 β -OHC sur les cellules 158N. Lorsque la biotine ou l' α -tocophérol ont été ajoutés aux cellules 158N traitées par le 7 β -OHC, une augmentation significative de l'activité de la GPx et de la SOD ainsi qu'une restauration du taux de groupements SH ont été observées. Comparée aux cellules traitées avec du 7 β -OHC, l'augmentation de l'activité de la CAT a été révélée plus efficace dans les cellules traitées avec (7 β -OHC + α -tocophérol) que celles traitées avec (7 β -OHC + biotine (10 et 100 nM)). Ceci suggère que les cibles cellulaires de l' α -tocophérol et de la biotine sont différentes. De plus, comme le DMF et le MMF, la biotine était également capable de prévenir la surproduction des ERO notamment O₂^{•-} et H₂O₂ induites par le 7 β -OHC. De surcroît, la biotine atténue la peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines d'où une baisse des taux de malondialdéhyde, de diènes conjugués, et de protéines carbonylées. Ces données concordent avec une autre étude antérieure menée sur des reins de souris diabétiques (**Aldahmash et al., 2015**) ce qui souligne l'effet de la biotine dans la régulation du statut RedOx.

Dans l'ensemble, ces observations mettent en évidence les propriétés anti-oxydantes et cytoprotectrices du DMF, du MMF et de la biotine, qui sont des molécules utilisées dans le traitement de la SEP (**Aldahmash et al., 2015; Suneetha, 2016**).

Comme la cytotoxicité du 7 β -OHC est manifestée par un stress oxydant associé à un dysfonctionnement mitochondrial, une molécule protectrice contre ses effets délétères doit absolument avoir la capacité à réduire ou à prévenir les altérations mitochondriales induites par le 7 β -OHC. En effet, nos résultats montrent que le DMF et le MMF ont pu atténuer l'augmentation de la masse mitochondriale, qui correspond à une augmentation du nombre et / ou de la taille de mitochondries, qui est considéré comme un marqueur d'anomalies mitochondriales (**Zarrouk et al., 2012**). Ces données suggèrent que le DMF et le MMF pourraient réparer et régénérer les mitochondries endommagées et moduler les caractéristiques des membranes mitochondriales, puisque l'augmentation de la masse mitochondriale est associée à des modifications des caractéristiques de leurs membranes. Ceci pourrait expliquer le rôle du DMF et du MMF, à la fois, dans la suppression des effets

toxiques du 7 β -OHC mais aussi dans le maintien de la structure et du bon fonctionnement mitochondrial (**Hayashi et al., 2017**).

Le DMF et le MMF normalisent également les taux de cardiolipines, qui sont des phospholipides mitochondriaux, dans les cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC. En effet, il a été rapporté que la perte du contenu en cardiolipines et/ou la modification dans leurs compositions sont associées à un dysfonctionnement mitochondrial (**Sorice et al., 2004**). De ce fait, la capacité du DMF et du MMF à restaurer les taux de cardiolipines constitue un argument en faveur de la potentialité de ces molécules à prévenir et à rétablir les dysfonctionnements mitochondriaux. Ceci nous a mené à poser la question sur le rôle du DMF et du MMF au niveau du cycle de Krebs.

Nos résultats ont montré que le DMF et le MMF induisent une augmentation des taux de succinate, malate, fumarate et citrate, qui sont les principaux acides organiques impliqués dans le cycle de Krebs, dans les cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC. Ces observations soulignent le rôle du DMF et du MMF dans la régulation du cycle de Krebs et la stimulation de l'activité des enzymes mitochondriales, en particulier les enzymes impliquées dans le cycle de Krebs (**Huang et al., 2015**). Dans les mêmes conditions, une augmentation du taux de pyruvate et une réduction du taux de lactate ont été observées. Ceci fournit des preuves en faveur du rôle du DMF et du MMF dans la récupération du métabolisme des glucides et en particulier dans la régulation de la glycolyse (**Angiari and O'Neill, 2018**).

La biotine pourrait également prévenir les modifications mitochondriales induites par le 7 β -OHC. Cette molécule s'est révélée capable d'atténuer l'augmentation de la masse mitochondriale induite par le 7 β -OHC et de normaliser les taux de cardiolipines, qui sont nécessaires pour le maintien de la stabilité, de la structure et du dynamisme mitochondrial et qui sont impliquées dans la bioénergétique mitochondriale (**Paradies et al., 2014**). Nos résultats ont montré également que la biotine est capable de réguler la glycolyse et d'empêcher les altérations du cycle de Krebs. Ceci pourrait être expliqué par la fonction principale de la biotine en tant que coenzyme de cinq carboxylases, participant à différentes réactions de carboxylation impliquées dans plusieurs événements cellulaires tels que le métabolisme du glucose, le catabolisme des acides aminés et le métabolisme des acides gras qui sont primordiaux pour un bon fonctionnement mitochondrial (**Tong, 2013; Sedel et al., 2016**).

En raison de l'interaction entre la mitochondrie et le peroxysome, il était important d'évaluer les effets du DMF, du MMF et de la biotine associés ou non au 7 β -OHC sur le peroxysome. En effet, le peroxysome est un organite impliqué dans une variété de voies métaboliques

assurées par différents complexes enzymatiques. L'observation par microscopie à fluorescence montre une densité plus élevée de peroxysomes au niveau des cellules traitées avec du DMF (25 μ M), du MMF (25 μ M) et de la biotine (10 et 100 nM) associées ou non au 7 β -OHC (50 μ M) comparativement aux cellules traitées avec du 7 β -OHC (50 μ M). De surcroît, la quantification de l'intensité du marquage ABCD3 a révélé une augmentation significative du niveau d'expression de ce transporteur peroxysomal dans les cellules traitées avec DMF+,7 β -OHC, MMF +,7 β -OHC ou biotine (10 et 100 nM) + 7 β -OHC par rapport aux cellules traitées avec du 7 β -OHC seul.

Comme ABCD3 est considéré comme un marqueur du peroxysome ceci nous a permis d'évaluer la masse de peroxysome par cellule (**Gray et al., 2014**). Nos résultats révèlent une augmentation du nombre de peroxysomes lorsque le 7 β -OHC est associé au DMF, au MMF ou à la biotine. Ceci suggère une implication probable de ces différentes molécules (DMF, MMF, biotine) dans la biogenèse des peroxysomes, ce qui pourrait expliquer au moins en partie leurs capacités à atténuer les effets cytotoxiques induits par le 7 β -OHC sur les cellules 158N.

Nous avons ainsi montré, pour la première fois, que le DMF, le MMF et la biotine sont capables d'atténuer les dysfonctionnements peroxysomaux induits par le 7 β -OHC. Ces molécules se sont révélées capables de réguler les niveaux d'expression d'ARNm des gènes impliqués dans la β -oxydation peroxysomale. En effet, en présence du 7 β -OHC, le traitement des cellules 158N par le DMF, le MMF ou la biotine, a montré une augmentation de l'expression d'ARNm des transporteurs peroxysomaux (ABCD1 et ABCD3) et de l'expression génique de MFP2, enzyme impliquée dans la β -oxydation peroxysomale, ce qui suggère l'implication de ces molécules (DMF, MMF, biotine) dans la régulation du métabolisme peroxysomal mais aussi dans le rétablissement du profil des acides gras à très longue chaîne, puisque la β -oxydation de ces derniers a lieu dans le peroxysome.

De plus, l'expression d'ARNm de DHAPAT, enzyme impliquée dans la biogenèse des plasmalogènes, a été augmentée dans les cellules traitées avec la biotine 100 nM en présence du 7 β -OHC, mais pas avec la biotine 10 nM. En revanche, le niveau d'ARNm de ADHAPS, enzyme impliquée également dans la biogenèse de plasmalogène, n'a pas été modifié lorsque le 7 β -OHC est associé à la biotine (10 nM et 100 nM), ce qui illustre un effet sélectif de la biotine. L'ensemble de ces observations fournit des preuves en faveur des effets cytoprotecteurs du DMF, du MMF et de la biotine vis-à-vis du 7 β -OHC.

Il est bien connu que la gaine de myéline est composée d'environ 70-80% de lipides (**Morell and Quarles, 1999**). La synthèse et l'incorporation de phospholipides, de sphingolipides et de cholestérol est essentielles à sa structure, son développement et ses fonctions.

Ainsi, sur la base des résultats obtenus soulignant les effets cytoprotecteurs du DMF, du MMF et de la biotine, nous pouvons donc supposer que ces molécules pourraient réguler la synthèse et le métabolisme des lipides, composants majeurs de la gaine de myéline. Nos résultats ont montré que le DMF et le MMF peuvent rétablir la synthèse du cholestérol en restaurant le contenu de ses précurseurs. La formation de dérivés oxydés du cholestérol en particulier le 7KC, résultant principalement de l'auto-oxydation du cholestérol, a également été réduite en présence du DMF et du MMF. Il est également intéressant de noter que la biotine neutralise les modifications induites par le 7 β -OHC au niveau de certains précurseurs du cholestérol et atténue également l'augmentation du 7KC. Ces données fournissent des preuves en faveur de la capacité du DMF, du MMF et de la biotine à prévenir le stress oxydant ainsi que la peroxydation lipidique induite par le 7 β -OHC. Cependant, ces molécules n'ont pas pu empêcher l'accumulation intracellulaire du 7 β -OHC, bien que l'interconversion du 7KC en 7 β -OHC soit exclue, car l'enzyme 11 β -HSD1 n'a pas été détectable dans les cellules 158N. Il existe deux explications rationnelles pour expliquer ce phénomène, cependant aucune expérience n'a été entreprise pour le moment. En effet, il est bien connu que le 7 β -OHC favorise la phospholipidose ; les vésicules correspondantes de la phospholipidose (évoquant une réticulophagie) sont connues pour accumuler des oxystérols. Par conséquent, on peut supposer que le DMF, le MMF et la biotine favoriseraient la formation de vésicules de phospholipidose (également appelées figures myéliniques) qui favoriseraient l'accumulation du 7 β -OHC dans le cytoplasme. De ce fait, lorsque le 7 β -OHC est présent dans ces vésicules, il est séquestré et non cytotoxique, car la principale caractéristique des vésicules de phospholipidose est d'accumuler des composés cytotoxiques tels que les oxystérols afin d'empêcher leurs effets cytotoxiques. En outre, il est connu que les oxystérols cytotoxiques ne perdent leurs toxicités que lorsqu'ils sont estérifiés (**Tabas, 2002**). Ainsi, on peut supposer que le DMF, le MMF et la biotine pourraient être impliqués dans l'augmentation de l'estérification du 7 β -OHC.

Par ailleurs, Il est intéressant de noter que le DMF, le MMF et la biotine sont capables de normaliser le niveau des acides gras saturés en augmentant la quantité d'acides gras saturés à longues ou à moyennes chaînes (AGS; C <22) et en réduisant la quantité d'acides gras saturés à très longue chaîne (AGSTLC; C \geq 22). Ces observations supportent l'hypothèse que ces

molécules (DMF, MMF, biotine) sont impliquées dans le maintien la structure et la réparation de l'activité des mitochondries mais aussi des peroxysomes (**Schrader and Fahimi, 2008**). En plus, en présence du 7 β -OHC, la biotine favorise l'augmentation des taux des AGMI et des AGPI qui possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et neuroprotectrices (**Morishima et al., 2001; Colette et al., 2003**). Ainsi, la biotine induit une augmentation des taux d'acide arachidonique (AA), d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA), qui sont des puissants modulateurs de la fluidité membranaire et promoteurs de différents mécanismes cellulaires liés au stress oxydant, à l'apoptose et à l'inflammation (**Young and Conquer, 2005; Bousquet et al., 2011**). Ces données mettent en évidence la biotine en tant qu'une molécule possédant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et neuroprotectrices, ce qui suggère sa capacité à moduler la fluidité membranaire et l'activité neuronale.

Par ailleurs, comme le DHA est un substrat de la β -oxydation peroxysomale, l'augmentation du taux du DHA en présence de la biotine dans les cellules traitées avec du 7 β -OHC pourrait être expliqué par un rétablissement du métabolisme peroxysomal (**Lizard et al., 2012**).

L'ensemble de ces résultats montre que la biotine non seulement participe à la biosynthèse des acides gras, mais contribue également à la prévention de l'altération de leur métabolisme. Ceci constitue un argument en faveur des propriétés de la biotine en tant que régulateur du métabolisme des acides gras et souligne sa capacité à maintenir la composition de la myéline dans le cas d'un stress oxydant généré par l'exposition des oligodendrocytes à des agents toxiques tels que le 7 β -OHC. Ainsi, la biotine régule les altérations quantitatives et qualitatives des lipides (cholestérol, précurseurs du cholestérol et acides gras) qui sont impliqués dans le maintien de la structure, la biogenèse et / ou la composition de la myéline. Ces résultats suggèrent que la biotine joue un rôle structural et fonctionnel au niveau de la gaine de myéline.

Outre leurs capacités à atténuer les altérations de synthèse et du métabolisme des acides gras dans les cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC, le DMF et le MMF sont capables de restaurer les taux de sphingomyéline et phospholipides (phosphatidylcholine), principaux composants de la myéline (**Morell and Quarles, 1999**). Alors que le rapport molaire du cholestérol, des phospholipides et des glycosphingolipides dans la plupart des membranes est de l'ordre de 25% : 65% : 10%, respectivement, il est de 40% : 40% : 20% dans la myéline (**O'Brien, 1965**). Ceci suggère le rôle de ces molécules (DMF, MMF, biotine) dans la protection de la myéline en condition de stress.

Étant donné que la myéline est un complexe lipoprotéique (**Morell and Quarles, 1999**), il était aussi intéressant d'évaluer les effets du DMF, du MMF et de la biotine sur les protéines majeures de la myéline à savoir PLP et MBP qui représentent respectivement 50% et 30% des protéines de myéline (**Baumann and Pham-Dinh, 2001**).

Dans ce contexte, nos résultats montrent que l'expression accrue de la PLP observée dans les cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC a été normalisée avec le MMF. En plus l'augmentation de l'expression de la MBP observée avec le 7 β -OHC a été légèrement atténuée par le DMF et le MMF. Par ailleurs, une légère augmentation de l'expression de PLP et MBP a été mise en évidence avec la biotine dans les cellules 158N traitées avec du 7 β -OHC. Ceci suggère que ces molécules (DMF, MMF, biotine) peuvent moduler l'expression de protéines de myéline en condition du stress. Ces observations confortent l'hypothèse de l'implication du DMF, du MMF et de la biotine dans le contrôle de la structure et du fonctionnement de la myéline en cas du stress.

Le DMF, le MMF et la biotine sont également capables de contrecarrer l'apoptose et l'autophagie induites par le 7 β -OHC sur les cellules 158N: En effet, en présence de ces molécules (DMF, MMF, biotine), le pourcentage des cellules avec des noyaux condensés et/ou fragmentés a été significativement réduit, le taux du LDH a été normalisé suggérant la capacité de ces molécules à prévenir la mort cellulaire de type oxyapoptophagie. Le pourcentage de cellules avec des lysosomes déstabilisés a été significativement réduit. En plus, le clivage de la caspase 3 et l'activation de LC3-I en LC3-II, qui sont des critères de mort cellulaire par apoptose et autophagie, respectivement, ont été fortement atténués. Il convient de noter, que les effets cyto-protecteurs du DMF, du MMF et de la biotine sont similaires à ceux de l' α -tocophérol qui est utilisé comme témoin positif de cytoprotection et qui concidéré comme la molécule la plus efficace pour s'opposer aux effets toxiques du 7 β -OHC (**Ragot et al., 2013; Nury et al., 2015**).

Globalement, nos résultats montrent la capacité du DMF, du MMF et de la biotine à activer les mécanismes de réparation cellulaire qui contribuent à prévenir l'oxyapoptophagie induite par le 7 β -OHC. Ceci suggère que ces molécules ont la capacité à s'opposer au processus de neurodégénérescence observé dans des maladies comme la SEP.

La **Figure 55** résume les effets cytoprotecteurs du DMF, du MMF et de la biotine sur les différents paramètres associés à la mort cellulaire.

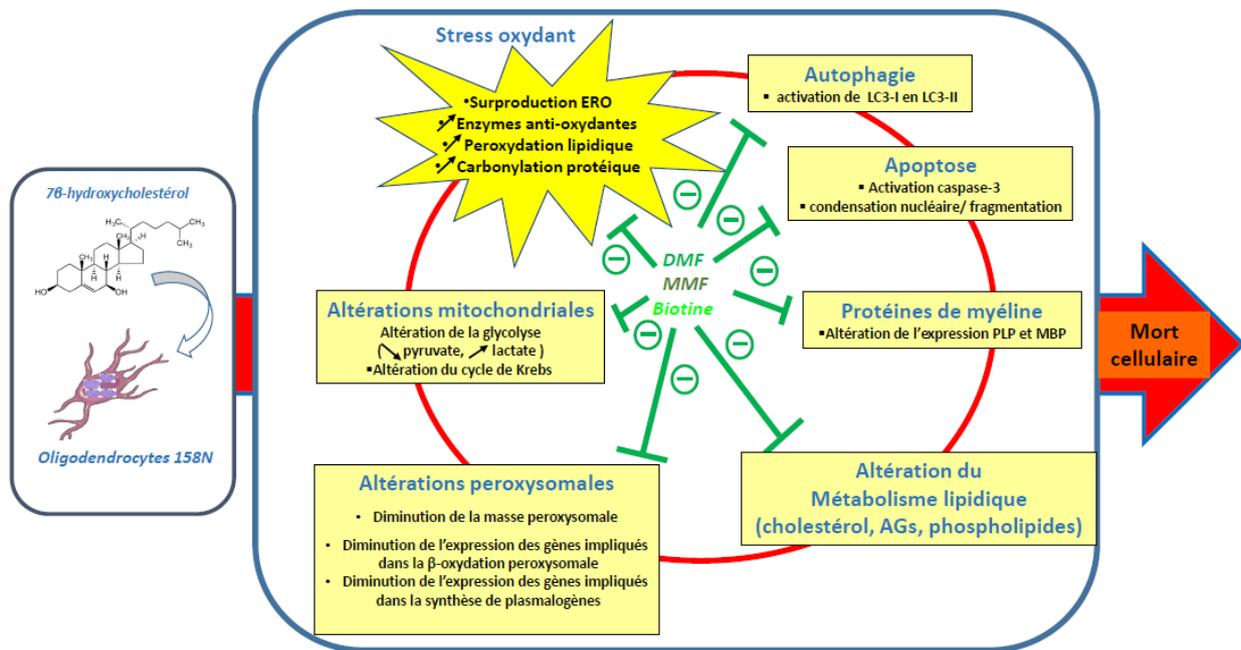


Figure 55 : Effets cytoprotecteurs du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine contre les effets toxiques du 7β-hydroxycholestérol sur des cellules oligodendrocytaires murines (cellules 158N)

Le DMF, le MMF et la biotine atténuent les altérations induites par le 7β-OHC à savoir: l'induction du stress oxydant, le dysfonctionnement des organites cellulaires (mitochondrie, peroxysome), les altérations du métabolisme lipidique (acides gras, cholestérols, phospholipides), l'augmentation de l'expression des protéines de myéline et l'induction d'une mort cellulaire par apoptose et autophagie (oxyapoptophagie). Il est à noter que ces différents effets indésirables sont souvent observés dans les maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques. Ces résultats renforcent l'intérêt de ces différentes molécules (DMF, MMF, biotine) pour traiter les malades atteints de sclérose en plaques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Il est maintenant bien établi qu'une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol est un facteur de risque majeur dans de nombreuses maladies neurodégénératives. En effet, il existe maintenant de plus en plus des preuves qui soulignent le rôle des oxystérols, produits d'oxydation du cholestérol, dans le développement mais aussi dans l'évolution des maladies neurodégénératives dont la sclérose en plaques (SEP) (**Leoni et al., 2002; Kreilaus et al., 2016**). Cependant, peu d'informations sont disponibles sur la relation entre l'accumulation des oxystérols et les mécanismes cellulaires impliqués dans leurs toxicités ainsi que sur leurs impacts sur la démyélinisation et le développement de la neurodégénérescence.

Dans une première partie, une étude clinique préliminaire a été réalisée sur 20 sujets dont 10 patients atteints de SEP RR et 10 sujets contrôles. Ainsi, nous nous sommes intéressés à identifier des biomarqueurs lipidiques notamment des oxystérols et des acides gras ainsi que des biomarqueurs de stress oxydant. Dans une deuxième partie, une étude *in vitro* a été réalisée sur un modèle d'oligodendrocyte murin présentant des caractéristiques d'oligodendrocyte mature (**Baarine et al., 2009**), les cellules 158N. Nous avons essentiellement centré notre étude sur l'impact du 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC), sur les différents mécanismes qui pourraient être associés directement ou indirectement à la pathogenèse de la SEP. Ensuite, nous avons évalué les activités biologiques de trois molécules, le diméthyle fumarate (DMF) et son métabolite majeur le monométhyle fumarate (MMF), et la biotine, utilisées dans le traitement de la SEP, pour s'opposer aux effets cytotoxiques du 7 β -OHC.

Nos résultats cliniques préliminaires ont permis de mettre en évidence certains paramètres associés à la SEP. En effet, nous avons montré une augmentation du taux de HODE dans le plasma et le LCR des patients atteints de SEP associée à une augmentation de la peroxydation lipidique *via* une augmentation des taux plasmatiques des oxystérols en particulier, le 7-cétocholestérol (7KC) et le 7 β -OHC chez des patients SEP RR, ce qui renforce l'hypothèse d'une rupture de l'équilibre RedOx et d'une surproduction des ERO chez ces malades. Par ailleurs, nous avons constaté une diminution du taux plasmatique et cérébral d'acide arachidonique (AA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) chez les patients SEP RR reflétant une altération du métabolisme des acides gras, qui pourrait être due au moins en partie aux altérations peroxysomales puisque le DHA est un substrat de la β -oxydation peroxysomale.

Ces différentes observations ont été développées plus spécifiquement dans le cadre d'une étude *in vitro*. Ainsi, le 7 β -OHC, trouvé à des taux élevés chez les sujets SEP, a été utilisé pour mimer un environnement pro-oxydant afin d'approfondir la compréhension des mécanismes cellulaires et/ou moléculaires impliqués dans le processus de la démyélinisation

et dans le développement de la SEP. Les effets de nouvelles molécules préconisées pour le traitement de la SEP, à savoir le DMF, le MMF et la biotine sur les différents paramètres associés à la démyélinisation dans la SEP, ont été caractérisés. Aussi, notre étude a été focalisée sur des marqueurs du stress oxydant, du métabolisme mitochondrial et peroxysomale, du métabolisme lipidique et de la mort cellulaire.

Nos résultats montrent que le 7 β -OHC déclenche un mode complexe de mort cellulaire par apoptose et autophagie associé à un stress oxydant et un dysfonctionnement mitochondrial, défini par le terme « oxyapoptophagie ». Nous avons ainsi montré que le 7 β -OHC induit des modifications structurales des cellules 158N associées à une inhibition de la croissance cellulaire et à une perte d'adhésion cellulaire. Le 7 β -OHC induit aussi une rupture de l'équilibre RedOx caractérisée par une surproduction des ERO, une activité accrue des principales enzymes anti-oxydantes incluant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx), une amplification de l'oxydation des macromolécules notamment les lipides et les protéines. Par ailleurs, le 7 β -OHC déclenche des dysfonctionnements mitochondriaux importants : diminution de potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), augmentation de la masse mitochondriale, diminution de la teneur en cardiolipines et altération du cycle du TCA.

De plus, la lipotoxicité du 7 β -OHC affecte l'expression de marqueurs peroxysomaux (ABCD1, ABCD3, ACOX1, MFP2, DHAPT et ADHAPS) et modifie le métabolisme du cholestérol et des acides gras en augmentant le taux des acides gras saturés et en diminuant le taux des acides gras mono- et poly-insaturés. Le 7 β -OHC induit aussi une altération de l'expression de protéines de myéline (PLP, MBP) ce qui pourrait expliquer la démyélinisation.

Das leur ensemble, nos résultats montrent que le DMF, le MMF et la biotine atténuent le stress oxydant, le dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomal, l'altération du métabolisme lipidique et la mort cellulaire, induits par le 7 β -OHC, considérées comme des caractéristiques des maladies neurodégénératives, incluant la SEP.

Ainsi, avec la présente étude, trois nouvelles molécules, DMF, MMF et biotine, s'ajoutent à la liste peu nombreuse des molécules déjà identifiées comme cytoprotectrices vis-à-vis du 7 β -OHC : α -tocophérol et DHA (C22: 6 n-3) (Nury et al., 2015).

Comme le 7 β -OHC est associé à la neurodégénérescence, l'aptitude du DMF, du MMF et de la biotine à contrecarrer la toxicité de cet oxystérol renforce l'intérêt de ces molécules pour le traitement des maladies neurodégénératives incluant la SEP, ainsi que d'autres maladies

associées à une augmentation du taux de 7β -OHC ((**Vejux and Lizard, 2009; Zarrouk et al., 2014**)).

Compte tenu des résultats obtenus, ces travaux ouvrent des nouvelles perspectives à différents niveaux. Il serait donc intéressant de:

- Identifier des biomarqueurs sanguins de la SEP chez des patients recevant un traitement (DMF, MMF, biotine) afin d'évaluer l'efficacité des molécules utilisées et leurs impacts sur le profil lipidique, le statut inflammatoire et oxydant.
- Déterminer le mécanisme d'action du 7β -OHC ainsi que du DMF, MMF et biotine en identifiant des récepteurs potentiels médiant leurs effets et les voies de signalisations impliquées.
- Evaluer l'efficacité de ces médicaments (DMF, MMF et biotine) sur d'autres lignées cellulaires, notamment les cellules microgliales, les cellules neuronales en utilisant éventuellement des cultures organotypiques, des cocultures, des approches « Lab on Chip » ou des organoïdes.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abramov, A. Y., Scorziello, A., Duchen, M. R., 2007. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *Journal of Neuroscience* 27, 1129-1138.

Adams, R. D., Kubik, C. S., 1952. The morbid anatomy of the demyelinating diseases. *The American journal of medicine* 12, 510-546.

Adibhatla, R. M., Hatcher, J. F., 2008. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders.

Lipids in health and disease. Springer, pp. 241-268.

Adiele, R. C., Adiele, C. A., 2019. Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitochondrion* 44, 7-14, doi:10.1016/j.mito.2017.12.005.

Akram, M., 2014. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell biochemistry and biophysics* 68, 475-478.

Aldahmash, B. A., El-Nagar, D. M., Ibrahim, K. E., Metwaly, M. S., 2015. Biotin amelioration of nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice. *Saudi journal of biological sciences* 22, 564-569.

Al-Ghobashy, M. A., ElMeshad, A. N., Abdelsalam, R. M., Nooh, M. M., Al-Shorbagy, M., Laible, G., 2017. Development and pre-clinical evaluation of recombinant human myelin basic protein nano therapeutic vaccine in experimental autoimmune encephalomyelitis mice animal model. *Scientific reports* 7, 46468.

Alirezai, M., Fox, H. S., Flynn, C. T., Moore, C. S., Hebb, A. L. O., Frausto, R. F., Bhan, V., Kiosses, W. B., Whitton, J. L., Robertson, G. S., 2009. Elevated ATG5 expression in autoimmune demyelination and multiple sclerosis. *Autophagy* 5, 152-158.

Allen, I. V., McKeown, S. R., 1979. A histological, histochemical and biochemical study of the macroscopically normal white matter in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 41, 81-91.

Allison, R. S., Millar, J. H. D., 1954. Prevalence of disseminated sclerosis. *The Ulster medical journal* 23, 5.

Alperovitch, A., Bouvier, M. H., 1982. Geographical pattern of death rates from multiple sclerosis in France: an analysis of 4912 deaths. *Acta Neurologica Scandinavica* 66, 454-461.

Al-Rubeai, M., Emery, A., Chalder, S., Goldman, M., 1993. A flow cytometric study of

hydrodynamic damage to mammalian cells. *Journal of biotechnology* 31, 161-177.

Altmeyer, P. J., Mattlies, U., Pawlak, F., Hoffmann, K., Frosch, P. J., Ruppert, P., Wassilew,

S. W., Horn, T., Kreysel, H. W., Lutz, G., 1994. Antipsoriatic effect of fumaric acid derivatives: results of a multicenter double-blind study in 100 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology* 30, 977-981.

Ammar, N., Gouider-Khouja, N., Hentati, F., 2006. Étude comparative des aspects cliniques et paracliniques de la sclérose en plaques en Tunisie. *Revue Neurologique* 162, 729-733.

Andalib, S., Talebi, M., Sakhinia, E., Farhoudi, M., Sadeghi-Bazargani, H., Motavallian, A., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., 2013. Multiple sclerosis and mitochondrial gene variations: a review. *Journal of the neurological sciences* 330, 10-15.

Andrews, N. W., Almeida, P. E., Corrotte, M., 2014. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends in cell biology* 24, 734-742.

Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E. C., Agid, Y., 1997. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and histopathology* 12, 25-32.

Anagnostouli, M., Livaniou, E., Nyalala, J. O., Evangelatos, G., Zournas, C., Ithakissios, D. S., Papageorgiou, C., 1999. Cerebrospinal fluid levels of biotin in various neurological disorders. *Acta neurologica scandinavica* 99, 387-392.

Angiari, S., O'Neill, L. A., 2018. Dimethyl fumarate: targeting glycolysis to treat MS. *Cell Res.* 28, 613-615.

Arenas, F., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. C., 2017. Intracellular cholesterol trafficking and impact in neurodegeneration. *Frontiers in molecular neuroscience* 10, 382.

Ascherio, A., Munger, K. L., Simon, K. C., 2010. Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 9, 599-612.

Astarita, G., Jung, K.-M., Berchtold, N. C., Nguyen, V. Q., Gillen, D. L., Head, E., Cotman, C. W., Piomelli, D., 2010. Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. *PloS one* 5, e12538.

Aubourg, P., Wanders, R., 2013. Peroxisomal disorders. *Handbook of clinical neurology*, Vol. 113. Elsevier, pp. 1593-1609

Baarine, M., Ragot, K., Athias, A., Nury, T., Kattan, Z., Genin, E. C., Andreoletti, P., Ménétrier, F., Riedinger, J.-M., Bardou, M., 2012. 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* 33, 212-228.

Baarine, M., Ragot, K., Genin, E. C., El Hajj, H., Trompier, D., Andreoletti, P., Ghandour, M. S., Ménétrier, F., Cherkaoui- Malki, M., Savary, S., 2009. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *Journal of neurochemistry* 111, 119-131.

Baarine, M., Ragot, K., Kattan, Z., Andréoletti, P., Athias, A., Savary, S., Cherkaoui-Malki, M., Lizard, G., 2011. pro-oxidative Activities Of Abcd1 Or Acox1 Deficiency, And Of Vlcfa On Oligodendrocytes Support Evidences Of Lipid Peroxidation In X-ald Patients: sc123. *European Journal of Neurology* 18, 31.

Baumann, N., Pham-Dinh, D., 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews* 81, 871-927.

Björkhem, I., 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *Journal of internal medicine* 260, 493-508.

Bolisetty, S., Jaimes, E., 2013. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *International journal of molecular sciences* 14, 6306-6344.

Bousquet, M., Calon, F., Cicchetti, F., 2011. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing research reviews* 10, 453-463.

Boya, P., Kroemer, G., 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434.

Brahmi, F., Vejux, A., Sghaier, R., Zarrouk, A., Nury, T., Meddeb, W., Rezig, L., Namsi, A., Sassi, K., Yammine, A., 2018. Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-48.

Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., 2013. Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830, 3289-3303.

Brinkmann, V., Davis, M. D., Heise, C. E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., 2002. The immune modulator, FTY720, targets sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of Biological Chemistry*.

Brites, P., Waterham, H. R., Wanders, R. J. A., 2004. Functions and biosynthesis of

plasmalogens in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1636, 219-231.

Brodde, A., Teigler, A., Brugger, B., Lehmann, W. D., Wieland, F., Berger, J., Just, W. W., 2012. Impaired neurotransmission in ether lipid-deficient nerve terminals. *Human molecular genetics* 21, 2713-2724.

Brown, D. I., Griendling, K. K., 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 1239-1253.

Brown, G. C., Borutaite, V., 2004. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1658, 44-49.

Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V., Thompson, A. J., 2014. Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83, 1022-1024.

Brzeska, M., Szymczyk, K., Szterk, A., 2016. Current knowledge about oxysterols: a review. *Journal of food science* 81, R2299-R2308.

Butts, B. D., Houde, C., Mehmet, H., 2008. Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease. *Cell death and differentiation* 15, 1178.

Buzzard, K., Broadley, S., Butzkueven, H., 2012. What do effective treatments for multiple sclerosis tell us about the molecular mechanisms involved in pathogenesis? *International journal of molecular sciences* 13, 12665-12709.

Calabrese, M., Magliozzi, R., Ciccarelli, O., Geurts, J. J. G., Reynolds, R., Martin, R., 2015. Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience* 16, 147.

Calder, P. C., 2011. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *European journal of pharmacology* 668, S50-S58.

Calon, F., Cole, G., 2007. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 77, 287-293.

Campbell, G. R., Ziabreva, I., Reeve, A. K., Krishnan, K. J., Reynolds, R., Howell, O., Lassmann, H., Turnbull, D. M., Mahad, D. J., 2011. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 69, 481-492.

Campbell, I. L., Krucker, T., Steffensen, S., Akwa, Y., Powell, H. C., Lane, T., Carr, D. J., Gold, L. H., Henriksen, S. J., Siggins, G. R., 1999. Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN- α 1. *Brain research* 835, 46-61.

Campos-Peña, V., Meraz-Ríos, M. A., 2014. Alzheimer disease: the role of A β in the glutamatergic system. *Neurochemistry*. InTech.Cantorna, M. T., 2006. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Progress in biophysics and molecular biology* 92, 60-64.

Cappellano, G., Woldetsadik, A. D., Orilieri, E., Shivakumar, Y., Rizzi, M., Carniato, F., Gigliotti, C. L., Boggio, E., Clemente, N., Comi, C., 2014. Subcutaneous inverse vaccination with PLGA particles loaded with a MOG peptide and IL-10 decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vaccine* 32, 5681-5689.

Capra, V., Rovati, G. E., Mangano, P., Buccellati, C., Murphy, R. C., Sala, A., 2015. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 377-382.

Carlson, N. G., Hill, K. E., Tsunoda, I., Fujinami, R. S., Rose, J. W., 2006. The pathologic role for COX-2 in apoptotic oligodendrocytes in virus induced demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 174, 21-31.

Carvalho, K. S., 2013. Mitochondrial dysfunction in demyelinating diseases. *Seminars in pediatric neurology*, Vol. 20. Elsevier, pp. 194-201.

Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B., Sharpe, M. A., 2002. β - Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *Journal of neurochemistry* 80, 91-100.

Chadha, K. C., Ambrus Jr, J. L., Dembinski, W., Ambrus Sr, J. L., 2004. Interferons and interferon inhibitory activity in disease and therapy. *Experimental Biology and Medicine* 229, 285-290.

Chang, S.-W., Zhang, D., Chung, H. D., Zassenhaus, H. P., 2000. The frequency of point mutations in mitochondrial DNA is elevated in the Alzheimer's brain. *Biochemical and biophysical research communications* 273, 203-208.

Chataway, J., Schuerer, N., Alsanousi, A., Chan, D., MacManus, D., Hunter, K., Anderson, V., Bangham, C. R. M., Clegg, S., Nielsen, C., 2014. Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet* 383, 2213-2221.

Chen, H., Chan, D. C., 2009. Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Human molecular genetics* 18, R169-R176.

Chen, M., Chen, G., Nie, H., Zhang, X., Niu, X., Zang, Y. C. Q., Skinner, S. M., Zhang, J. Z., Killian, J. M., Hong, J., 2009. Regulatory effects of IFN- β on production of osteopontin and IL-17 by CD4⁺ T Cells in MS. *European journal of immunology* 39, 2525-2536.

Chen, W. W., Zhang, X. I. A., Huang, W. J., 2016. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular medicine reports* 13, 3391-3396.

Chen, X., Guo, C., Kong, J., 2012. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research* 7, 376.

Chen, Z.-H., Yoshida, Y., Saito, Y., Sekine, A., Noguchi, N., Niki, E., 2006. Induction of adaptive response and enhancement of PC12 cell tolerance by 7-hydroxycholesterol and 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 through up-regulation of cellular glutathione via different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 281, 14440-14445.

Cheng, D., Jenner, A. M., Shui, G., Cheong, W. F., Mitchell, T. W., Nealon, J. R., Kim, W. S., McCann, H., Wenk, M. R., Halliday, G. M., 2011. Lipid pathway alterations in Parkinson's disease primary visual cortex. *PLoS One* 6, e17299.

Cheng, D., Jenner, A. M., Shui, G., Cheong, W. F., Mitchell, T. W., Nealon, J. R., Kim, W. S., McCann, H., Wenk, M. R., Halliday, G. M., 2011. Lipid pathway alterations in Parkinson's disease primary visual cortex. *PLoS One* 6, e17299.

Chew, G. T., Watts, G. F., 2004. Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the 'recoupling hypothesis'. *Qjm* 97, 537-548.

Chiurchiù, V., van der Stelt, M., Centonze, D., Maccarrone, M., 2018. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation in multiple sclerosis: Clues for other neuroinflammatory diseases. *Progress in neurobiology* 160, 82-100.

Choi, J. W., Gardell, S. E., Herr, D. R., Rivera, R., Lee, C.-W., Noguchi, K., Teo, S. T., Yung, Y. C., Lu, M., Kennedy, G., 2011. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 751-756.

Chung, J., Phukan, G., Vergote, D., Mohamed, A., Maulik, M., Stahn, M., Andrew, R., Thinakaran, G., de Chaves, E. P., Kar, S., 2018. Endosomal-lysosomal Cholesterol Sequestration by U18666A Differentially Regulates APP Metabolism in Normal and APP Overexpressing Cells. *Molecular and cellular biology*, MCB. 00529-17.

Chwieralski, C. E., Welte, T., Bühling, F., 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 11, 143-149.

Clarion, L., Schindler, M., de Weille, J., Lolmède, K., Laroche-Clary, A., Uro-Coste, E., Robert, J., Mersel, M., Bakalara, N., 2012. 7 β -Hydroxycholesterol-induced energy stress leads to sequential opposing signaling responses and to death of C6 glioblastoma cells. *Biochemical pharmacology* 83, 37-46.

Clarion, L., Schindler, M., de Weille, J., Lolmède, K., Laroche-Clary, A., Uro-Coste, E., Robert, J., Mersel, M., Bakalara, N., 2012. 7 β -Hydroxycholesterol-induced energy stress leads to sequential opposing signaling responses and to death of C6 glioblastoma cells. *Biochemical pharmacology* 83, 37-46.

Claussen, M. C., Korn, T., 2012. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS—Teriflunomide. *Clinical immunology* 142, 49-56.

Comi, C., Leone, M., Bonisconi, S., DeFranco, S., Bottarel, F., Mezzatesta, C., Chiocchetti, A., Perla, F., Monaco, F., Dianzani, U., 2000. Defective T cell fas function in patients with multiplesclerosis. *Neurology* 55, 921-927.

Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis, en revista *The Lancet*, 372 (9648): págs. 1502-1517: 10.1016/S0140-6736 (08) 61620-7. PMID.

Confavreux, C., Vukusic, S., 2006. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain* 129, 606-616.

Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., Adeleine, P., 2000. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 343, 1430-1438.

Confavreux, C., Darchy, P., Alperovitch, A., Aimard, G., Devic, M., 1987. South-Eastern France, a high risk area for multiple sclerosis? *Presse medicale* (Paris, France: 1983) 16, 622-623.

Colette, C., Percheron, C., Pares-Herbute, N., Michel, F., Pham, T. C., Brilliant, L., Descomps, B., Monnier, L., 2003. Exchanging carbohydrates for monounsaturated fats in energy-restricted diets: effects on metabolic profile and other cardiovascular risk factors. *International journal of obesity* 27, 648.

Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology* 164, 1079-1106.

Cuervo, A. M., Dice, J. F., 2000. When lysosomes get old☆. *Experimental gerontology* 35, 119-131.

Cunningham, D., DeBarber, A. E., Bir, N., Binkley, L., Merkens, L. S., Steiner, R. D., Herman, G. E., 2015. Analysis of hedgehog signaling in cerebellar granule cell precursors in a conditional *Nsdhl* allele demonstrates an essential role for cholesterol in postnatal CNS development. *Human molecular genetics* 24, 2808-2825.

Dalfó, E., Portero-Otín, M., Ayala, V., Martínez, A., Pamplona, R., Ferrer, I., 2005. Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 64, 816-830.

Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., de Courten, M., Matsoukas, J., Apostolopoulos, V., 2017. Multiple sclerosis: immunopathology and treatment update. *Brain sciences* 7, 78.

Dasgupta, A., Zheng, J., Perrone-Bizzozero, N. I., Bizzozero, O. A., 2013. Increased carbonylation, protein aggregation and apoptosis in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.

Dastmalchi, R., Sayad, A., Omrani, M. D., Ghafouri-Fard, S., Arsang-Jang, S., Mazdeh, M., Taheri, M., 2018. Investigation of the role of apoptosis, necroptosis and DNA damage signaling pathways in multiple sclerosis. *Genetics and Molecular Research* 17.

Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J. N., 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 170-185.

David, D. C., Hauptmann, S., Scherping, I., Schuessel, K., Keil, U., Rizzu, P., Ravid, R., Dröse, S., Brandt, U., Müller, W. E., 2005. Proteomic and functional analysis reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*.

De Lau, L. M. L., Bornebroek, M., Witteman, J. C. M., Hofman, A., Koudstaal, P. J., Breteler, M. M. B., 2005. Dietary fatty acids and the risk of parkinson disease the Rotterdam Study. *Neurology* 64, 2040-2045.

De Munter, S., Verheijden, S., Régal, L., Baes, M., 2015. Peroxisomal disorders: a review on cerebellar pathologies. *Brain Pathology* 25, 663-678.

Delasnerie-Laupretre, N., Alperovitch, A., 1991. Epidemiology of multiple sclerosis. *La Revue du praticien* 41, 1884-1887.

Depaz, R., Aboab, J., Gout, O., 2013. Actualités dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique de la sclérose en plaques. *La Revue de médecine interne* 34, 628-635.

de Vries, H., Hoekstra, D., 2000. On the biogenesis of the myelin sheath: cognate polarized

trafficking pathways in oligodendrocytes. *Glycoconjugate journal* 17, 181-190.

Di Carlo, M., Giacomazza, D., Picone, P., Nuzzo, D., San Biagio, P. L., 2012. Are oxidative stress and mitochondrial dysfunction the key players in the neurodegenerative diseases? *Free radical research* 46, 1327-1338.

Dias, I. H. K., Milic, I., Lip, G. Y. H., Devitt, A., Polidori, M. C., Griffiths, H. R., 2018. *Redox biology* 16, 139-145.

Dickinson, D. A., Forman, H. J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology* 64, 1019-1026

Diebold, M., Derfuss, T., *Immunological treatment of multiple sclerosis*. Vol. 53. Elsevier, pp. S54-S57.

Diestel, A., Aktas, O., Hackel, D., Häke, I., Meier, S., Raine, C. S., Nitsch, R., Zipp, F., Ullrich, O., 2003. Activation of microglial poly (ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *Journal of Experimental Medicine* 198, 1729-1740.

Diestschy, J., Turley, S., 2004. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45, 1375-1397

Dizdaroglu, M., Karakaya, A. E., 2012. *Advances in DNA damage and repair: oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences*. Springer Science & Business Media.

Donelan, J., Boucher, W., Papadopoulou, N., Lytinas, M., Papaliadis, D., Dobner, P., Theoharides, T. C., 2006. Corticotropin-releasing hormone induces skin vascular permeability through a neurotensin-dependent process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 7759-7764.

Doria, M., Maugest, L., Moreau, T., Lizard, G., Vejux, A., 2016. Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 101, 393-400.

Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* 62, 649-671.

Dringen, R., Gutterer, J. M., Hirrlinger, J., 2000. Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry* 267, 4912-4916.

DuBoff, B., Feany, M., Götz, J., 2013. Why size matters—balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences* 36, 325-335.

Dutta, R., Trapp, B. D., 2006. Anatomopathologie et définition de la sclérose en plaques. *Revue du Praticien* 56, 1293-1298.

Dyall, S. C., 2015. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in aging neuroscience* 7.

Dyment, D. A., Ebers, G. C., Sadovnick, A. D., 2004. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 3, 104-110.

E Presnell, C., Bhatti, G., S Numan, L., Lerche, M., K Alkhateeb, S., Ghalib, M., Shammaa, M., Kavdia, M., 2013. Computational insights into the role of glutathione in oxidative stress. *Current neurovascular research* 10, 185-194.

Eckert, A., Nisbet, R., Grimm, A., Götz, J., 2014. March separate, strike together—Role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1842, 1258-1266.

Edan, G., Miller, D., Clanet, M., Confavreux, C., Lyon-Caen, O., Lubetzki, C., Brochet, B., Berry, I., Rolland, Y., Froment, J.-C., 1997. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 62, 112-118.

Egawa, J., Pearn, M. L., Lemkuil, B. P., Patel, P. M., Head, B. P., 2016. Membrane lipid rafts and neurobiology: age- related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *The Journal of physiology* 594, 4565-4579.

Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V. N., Hein, B., von Middendorff, C., Schönle, A., 2009. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457, 1159.

Encinas, J. M., Manganas, L., Enikolopov, G., 2005. Nitric oxide and multiple sclerosis. *Current neurology and neuroscience reports* 5, 232-238.

Engelender, S., 2008. Ubiquitination of α -synuclein and autophagy in Parkinson's disease. *Autophagy* 4, 372-374.

Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Helkala, E. L., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H.,

- Kivipelto, M., 2008. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population- based CAIDE study. *International Journal of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences* 23, 741-747.
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., Lamas, S., 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox biology* 6, 183-197.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jürgens, G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine* 13, 341-390.
- Fabelo, N., Martín, V., Santpere, G., Marín, R., Torrent, L., Ferrer, I., Díaz, M., 2011. Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Molecular medicine* 17, 1107.
- Fahn, S., 2003. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 991, 1-14.
- Farooqui, A. A., 2010. *Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases*. Springer Science & Business Media.
- Farooqui, A. A., 2014. *Inflammation and oxidative stress in neurological disorders: effect of lifestyle, genes, and age*. Springer Science & Business Media.
- Farooqui, T., Farooqui, A. A., 2011. Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinson's disease* 2011.
- Faust, P. L., Kovacs, W. J., 2014. Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. *Biochimie* 98, 75-85.
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant. *L'actualité chimique* 108.
- Fedorova, I., Salem Jr, N., 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* 75, 271-289.
- Fender, P., Paita, M., Ganay, D., Benech, J. M., 1997. Prevalence of thirty long term disorders for French health insurance members in 1994. *Revue d'épidémiologie et de sante publique* 45, 454-464.
- Fernstrom, J. D., 1999. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function. *Lipids* 34, 161-169.

Ferrera, P., Mercado-Gómez, O., Silva-Aguilar, M., Valverde, M., Arias, C., 2008. Cholesterol potentiates β -amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochemical research* 33, 1509-1517.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Principi, F., Di Ludovico, F., Viti, B., Angeleri, V. A., Danni, M., Provinciali, L., 2005. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Multiple Sclerosis Journal* 11, 677-682.

Feutz, A. C., Pham- Dinh, D., Allinquant, B., Mische, M., Ghandour, M. S., 2001. An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia* 34, 241-252.

Filosto, M., Scarpelli, M., Cotelli, M. S., Vielmi, V., Todeschini, A., Gregorelli, V., Tonin, P., Tomelleri, G., Padovani, A., 2011. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Journal of neurology* 258, 1763-1774.

Fink, S. L., Cookson, B. T., 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity* 73, 1907-1916.

Fischer, M. T., Sharma, R., Lim, J. L., Haider, L., Frischer, J. M., Drexhage, J., Mahad, D., Bradl, M., van Horsen, J., Lassmann, H., 2012. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 135, 886-899.

Florez-McClure, M. L., Linseman, D. A., Chu, C. T., Barker, P. A., Bouchard, R. J., Le, S. S., Laessig, T. A., Heidenreich, K. A., 2004. The p75 neurotrophin receptor can induce autophagy and death of cerebellar Purkinje neurons. *Journal of Neuroscience* 24, 4498-4509.

Folch, J., Lees, M., 1951. Proteolipides, a New Type of Tissue Lipoproteins Their Isolation from Brain. *Journal of Biological Chemistry* 191, 807-817.

Fourcade, S., Ferrer, I., Pujol, A., 2015. Oxidative stress, mitochondrial and proteostasis malfunction in adrenoleukodystrophy: a paradigm for axonal degeneration. *Free Radical Biology and Medicine* 88, 18-29.

Fox, R. J., Kita, M., Cohan, S. L., Henson, L. J., Zambrano, J., Scannevin, R. H., O'Gorman, J., Novas, M., Dawson, K. T., Phillips, J. T., 2014. BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety. *Current medical research and opinion* 30, 251-262.

Franklin, R. J. M., 2008. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 839.

- French, H. M., Reid, M., Mamontov, P., Simmons, R. A., Grinspan, J. B., 2009. Oxidative stress disrupts oligodendrocyte maturation. *Journal of neuroscience research* 87, 3076-3087.
- Fromont, A., Binquet, C., Sauleau, E. A., Fournel, I., Despalins, R., Rollot, F., Weill, A., Clerc, L., Bonithon-Kopp, C., Moreau, T., 2012. National estimate of multiple sclerosis incidence in France (2001–2007). *Multiple Sclerosis Journal* 18, 1108-1115.
- Fugger, L., Friese, M. A., Bell, J. I., 2009. From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology* 9, 408.
- Gallou, M., Madigand, M., Masse, L., Morel, G., Oger, J., Sabouraud, O., 1983. Epidemiology of multiple sclerosis in Brittany. *Presse medicale (Paris, France: 1983)* 12, 995-999.
- Gamba, P., Testa, G., Sottero, B., Gargiulo, S., Poli, G., Leonarduzzi, G., 2012. The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1259, 54-64.
- Gandhi, R., Laroni, A., Weiner, H. L., 2010. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 221, 7-14.
- Gandhi, S., Abramov, A. Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012.
- Ghandour, M. S., Feutz, A. C., Jalabi, W., Taleb, O., Bessert, D., Cypher, M., Carlock, L., Skoff, R. P., 2002. Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signaling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *Glia* 40, 300-311.
- Gibson, J., Frank, A., 2002. Supporting individuals with disabling multiple sclerosis. *Journal of the Royal Society of Medicine* 95, 580-586.
- Gillard, G. O., Collette, B., Anderson, J., Chao, J., Scannevin, R. H., Huss, D. J., Fontenot, J. D., 2015. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *Journal of neuroimmunology* 283, 74-85.
- Giraudon, P., Bernard, A., 2009. Chronic viral infections of the central nervous system: Aspects specific to multiple sclerosis. *Revue neurologique* 165, 789-795.
- Girotti, S., Ferri, E., Maccagnani, L., Budini, R., Bianchi, G., 2002. Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays. *Talanta* 56, 407-414.

Gold, R., Kappos, L., Bar-Or, A., Arnold, D., Giovannoni, G., Selmaj, K., Yang, M., Dawson, K., Clinical efficacy of BG-12, an oral therapy, in relapsing-remitting multiple sclerosis: data from the phase 3 DEFINE trial. Vol. 17. SAGE PUBLICATIONS LTD 1 OLIVERS YARD, 55 CITY ROAD, LONDON EC1Y 1SP, ENGLAND, pp. S34-S34.

Gomes, L. C., Scorrano, L., 2011. Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times. *Autophagy* 7, 1251-1253.

Goodin, D. S., Jones, J., Li, D., Traboulsee, A., Reder, A. T., Beckmann, K., Konieczny, A., Knappertz, V., Year Long-Term Follow-up Study, I., 2011. Establishing long-term efficacy in chronic disease: use of recursive partitioning and propensity score adjustment to estimate outcome in MS. *PLoS One* 6, e22444.

Goritz, C., Mauch, D. H., Pfrieder, F. W., 2005. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29, 190-201.

Gorlach, A., Brandes, R. P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F., Busse, R., 2000. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circulation research* 87, 26-32.

Grabenbauer, M., Sätzler, K., Baumgart, E., Fahimi, H. D., 2000. Three-dimensional ultrastructural analysis of peroxisomes in HepG2 cells. *Cell biochemistry and biophysics* 32, 37-49.

Gray, E., Rice, C., Hares, K., Redondo, J., Kemp, K., Williams, M., Brown, A., Scolding, N., Wilkins, A., 2014. Reductions in neuronal peroxisomes in multiple sclerosis grey matter. *Multiple Sclerosis Journal* 20, 651-659.

Greco, A., Minghetti, L., Sette, G., Fieschi, C., Levi, G., 1999. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 53, 1876-1876.

Green, K. N., Martinez-Coria, H., Khashwji, H., Hall, E. B., Yurko-Mauro, K. A., Ellis, L., LaFerla, F. M., 2007. Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid- β and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *Journal of Neuroscience* 27, 4385-4395.

Griffiths, W. J., Abdel-Khalik, J., Yutuc, E., Morgan, A. H., Gilmore, I., Hearn, T., Wang, Y., 2017. Cholesterolomics: an update. *Analytical biochemistry* 524, 56-67.

Grimm, A., Mensah-Nyagan, A. G., Eckert, A., 2016. Alzheimer, mitochondria and gender. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 67, 89-101.

Grimm, M. O. W., Zimmer, V. C., Lehmann, J., Grimm, H. S., Hartmann, T., 2013. The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. *BioMed research international* 2013.

Grishkan, I. V., Fairchild, A. N., Calabresi, P. A., Gocke, A. R., 2013. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 selectively and reversibly impairs T helper-cell CNS localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 21101-21106.

Guasch-Ferré, M., Hruby, A., Salas-Salvadó, J., Martínez-González, M. A., Sun, Q., Willett, W. C., Hu, F. B., 2015. Olive oil consumption and risk of type 2 diabetes in US women–3. *The American journal of clinical nutrition* 102, 479-486.

Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in lipid research* 49, 186-199.

Haas, J., Korporal, M., Balint, B., Fritzsching, B., Schwarz, A., Wildemann, B., 2009. Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4+ CD25+ FOXP3+ CD31+ T-cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 216, 113-117.

Haas, R. H., Nasirian, F., Nakano, K., Ward, D., Pay, M., Hill, R., Shults, C. W., 1995. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 37, 714-722.

Habek, M., Hojsak, I., Brinar, V. V., 2010. Nutrition in multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 112, 616-620.

Habib, K. E., Gold, P. W., Chrousos, G. P., 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and Metabolism Clinics* 30, 695-728.

Håkansson, I., Gouveia-Figueira, S., Ernerudh, J., Vrethem, M., Ghafouri, N., Ghafouri, B., Nording, M., 2018. Oxylipins in cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis. *Prostaglandins & other lipid mediators* 138, 41-47.

Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., Karplus, P. A., 2011. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants & redox signaling* 15, 795-815.

Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry* 97, 1634-1658.

Hamazaki, K., Hamazaki, T., Inadera, H., 2012. Fatty acid composition in the postmortem

amygdala of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Journal of psychiatric research* 46, 1024-1028.

Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Dobson, R., Giovannoni, G., Ramagopalan, S. V., 2011. Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PloS one* 6, e16149.

Hannun, Y. A., Obeid, L. M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 139.

Hapala, I., Marza, E., Ferreira, T., 2011. Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation. *Biology of the Cell* 103, 271-285.

Harbige, L. S., Sharief, M. K., 2007. Polyunsaturated fatty acids in the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *British journal of Nutrition* 98, S46-S53.

Hardie, R. C., Muallem, S., 2009. *Lipids in Ca²⁺ signalling—An introduction*. Elsevier.

Hartmann, A., 2004. Postmortem studies in Parkinson's disease. *Dialogues in clinical neuroscience* 6, 281.

Hartung, H.-P., Gonsette, R., König, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S. P., Krapf, H., Zwingers, T., Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study, G., 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *The Lancet* 360, 2018-2025.

Hasima, N., Ozpolat, B., 2014. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell death & disease* 5, e1509.

Hauser, S. L., 1994. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. *Harrison's principles of internal medicine* 2287.

Havrdova, E., Hutchinson, M., Kurukulasuriya, N. C., Raghupathi, K., Sweetser, M. T., Dawson, K. T., Gold, R., 2013. Oral BG-12 (dimethyl fumarate) for relapsing–remitting multiple sclerosis: a review of DEFINE and CONFIRM: Evaluation of: Gold R, Kappos L, Arnold D, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 1098-107; and Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 1087-97. *Expert opinion on pharmacotherapy* 14, 2145-2156.

Hawkes, C. H., 2007. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Multiple Sclerosis Journal* 13, 610-615.

Hayashi, G., Jasoliya, M., Sahdeo, S., Saccà, F., Pane, C., Filla, A., Marsili, A., Puorro, G.,

- Lanzillo, R., Brescia Morra, V., 2017. Dimethyl fumarate mediates Nrf2-dependent mitochondrial biogenesis in mice and humans. *Human molecular genetics* 26, 2864-2873.
- Hayat, M. A., 2016. *Autophagy: Volume 9: Human Diseases and Autophagosome*. Elsevier Science.
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., Becher, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience* 16, 358.
- Hewson, D. C., Phillips, M. A., Simpson, K. E., Drury, P., Crawford, M. A., 1984. Food intake in multiple sclerosis. *Human nutrition. Applied nutrition* 38, 355-367.
- Hirsch, E. C., Hunot, S., 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet Neurology* 8, 382-397.
- Hof, P. R., Mobbs, C. V., 2010. *Handbook of the neuroscience of aging*. Academic Press.
- Hoivik, D. J., Qualls Jr, C. W., Mirabile, R. C., Cariello, N. F., Kimbrough, C. L., Colton, H. M., Anderson, S. P., Santostefano, M. J., Morgan, R. J. O., Dahl, R. R., 2004. Fibrates induce hepatic peroxisome and mitochondrial proliferation without overt evidence of cellular proliferation and oxidative stress in cynomolgus monkeys. *Carcinogenesis* 25, 1757-1769.
- Holman, R. T., Johnson, S. B., Kokmen, E., 1989. Deficiencies of polyunsaturated fatty acids and replacement by nonessential fatty acids in plasma lipids in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 4720-4724.
- Holmes, M. C., Seckl, J. R., 2006. The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in the brain. *Molecular and cellular endocrinology* 248, 9-14.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* 109, 1125-1131.
- Hu, G., 2010. Total cholesterol and the risk of Parkinson's disease: a review for some new findings. *Parkinson's disease* 2010.
- Huang, C., Freter, C., 2015. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *International journal of molecular sciences* 16, 924-949.
- Huang, H., Taraboletti, A., Shriver, L. P., 2015. Dimethyl fumarate modulates antioxidant and lipid metabolism in oligodendrocytes. *Redox biology* 5, 169-175.

Huitinga, I., Erkut, Z. A., van Beurden, D., Swaab, D. F., 2004. Impaired hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and more severe multiple sclerosis with hypothalamic lesions. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 55, 37-45.

Igci, M., Baysan, M., Yigiter, R., Ulasli, M., Geyik, S., Bayraktar, R., Bozgeyik, İ., Bozgeyik, E., Bayram, A., Cakmak, E. A., 2016. Gene expression profiles of autophagy-related genes in multiple sclerosis. *Gene* 588, 38-46.

Indo, H. P., Yen, H.-C., Nakanishi, I., Matsumoto, K.-i., Tamura, M., Nagano, Y., Matsui, H., Gusev, O., Cornette, R., Okuda, T., 2015. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 56, 1-7.

Inglese, M., Petracca, M., 2015. Therapeutic strategies in multiple sclerosis: a focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia. *Schizophrenia research* 161, 94-101. Innis, S. M., 2008. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain research* 1237, 35-43.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *New England Journal of Medicine* 357, 851-862.

Irvine, K. A., Blakemore, W. F., 2008. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain* 131, 1464-1477.

Ishizuka, M., Toyama, Y., Watanabe, H., Fujiki, Y., Takeuchi, A., Yamasaki, S., Yuasa, S., Miyazaki, M., Nakajima, N., Taki, S., 2004. Overexpression of human acyl-CoA thioesterase upregulates peroxisome biogenesis. *Experimental cell research* 297, 127-141.

Iuliano, L., 2011. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and physics of lipids* 164, 457-468.

Ivashchenko, O., Van Veldhoven, P. P., Brees, C., Ho, Y.-S., Terlecky, S. R., Fransen, M., 2011. Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk. *Molecular biology of the cell* 22, 1440-1451.

Janssen, C. I. F., Kiliaan, A. J., 2014. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Progress in lipid research* 53, 1-17.

Javitt, N. B., 2008. Oxysterols: novel biologic roles for the 21st century. *Steroids* 73, 149-157.

Jelinek, G. A., Marck, C. H., Weiland, T. J., Pereira, N., van der Meer, D. M., Hadgkiss, E. J., 2015. Latitude, sun exposure and vitamin D supplementation: associations with quality

of life and disease outcomes in a large international cohort of people with multiple sclerosis. *BMC neurology* 15, 132.

Jellinger, K. A., 2010. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of cellular and molecular medicine* 14, 457-487.

Jensen, C. J., Massie, A., De Keyser, J., 2013. Immune players in the CNS: the astrocyte. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 8, 824-839.

Jersild, C., Hansen, G., Svejgaard, A., Fog, T., Thomsen, M., Dupont, B., 1973. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *The lancet* 302, 1221-1225.

Johnson, E. J., Schaefer, E. J., 2006. Potential role of dietary n-3 fatty acids in the prevention of dementia and macular degeneration-. *The American journal of clinical nutrition* 83, 1494S-1498S.

Johnson, K. P., Brooks, B. R., Cohen, J. A., Ford, C. C., Goldstein, J., Lisak, R. P., Myers, L. W., Panitch, H. S., Rose, J. W., Schiffer, R. B., 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing- remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double- blind, placebo- controlled trial. *Neurology* 45, 1268-1276.

Johnson, R. R., Storts, R., Welsh Jr, T. H., Welsh, C. J. R., Meagher, M. W., 2004. Social stress alters the severity of acute Theiler's virus infection. *Journal of neuroimmunology* 148, 74-85.

Joza, N., Pospisilik, J. A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J. M., Kroemer, G., 2009. AIF: not just an apoptosis- inducing factor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171, 2-11.

Jung, S., Smith, J. J., Von Haller, P. D., Dilworth, D. J., Sitko, K. A., Miller, L. R., Saleem, R. A., Goodlett, D. R., Aitchison, J. D., 2013. Global analysis of condition-specific subcellular protein distribution and abundance. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-O112.

Kamm, C. P., Uitdehaag, B. M., Polman, C. H., 2014. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *European neurology* 72, 132-141.

Kappos, L., Freedman, M. S., Polman, C. H., Edan, G., Hartung, H.-P., Miller, D. H., Montalbán, X., Barkhof, F., Radü, E.-W., Bauer, L., 2007. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *The Lancet* 370, 389-397.

Kappos, L., Radue, E.-W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., 2010. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 362, 387-401.

Kato, T. A., Watabe, M., Kanba, S., 2013. Neuron-glia interaction as a possible glue to translate the mind-brain gap: a novel multi-dimensional approach toward psychology and psychiatry. *Frontiers in psychiatry* 4, 139.

Katsara, M., Matsoukas, J., Deraos, G., Apostolopoulos, V., 2008. Towards immunotherapeutic drugs and vaccines against multiple sclerosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40, 636-642.

Kawachi, I., Lassmann, H., 2017. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 137-145.

Kazibutowska, Z., Bal, A., Gołba, A., Ługowska, A., 2002. Metachromatic leukodystrophy in adult patient initially diagnosed as multiple sclerosis. *Neurologia i neurochirurgia polska* 36, 1209-1219.

Keeney, P. M., Xie, J., Capaldi, R. A., Bennett, J. P., 2006. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *Journal of Neuroscience* 26, 5256-5264.

Kemp, S., Theodoulou, F. L., Wanders, R. J. A., 2011. Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance. *British journal of pharmacology* 164, 1753-1766.

Kern, S., Ziemssen, T., 2008. Brain—immune communication psychoneuroimmunology of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 14, 6-21.

Kerr, J. F. R., 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181, 471-474. Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., Yoon, S., 2015. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology* 24, 325-340.

Kim, H. P., Imbert, J., Leonard, W. J., 2006. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & growth factor reviews* 17, 349-366.

Kingwell, E., Marriott, J. J., Jetté, N., Pringsheim, T., Makhani, N., Morrow, S. A., Fisk, J. D., Evans, C., Béland, S. G., Kulaga, S., 2013. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC neurology* 13, 128.

- Kiray, H., Lindsay, S. L., Hosseinzadeh, S., Barnett, S. C., 2016. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Experimental neurology* 283, 541-549.
- Kiryu-Seo, S., Ohno, N., Kidd, G. J., Komuro, H., Trapp, B. D., 2010. Demyelination increases axonal stationary mitochondrial size and the speed of axonal mitochondrial transport. *Journal of Neuroscience* 30, 6658-6666.
- Koch, M. W., Metz, L. M., Agrawal, S. M., Yong, V. W., 2013. Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 324, 10-16.
- Koch, M. W., Ramsaransing, G. S. M., Arutjunyan, A. V., Stepanov, M., Teelken, A., Heersema, D. J., De Keyser, J., 2006. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *Journal of neurology* 253, 483-487.
- Kočovská, E., Gaughran, F., Krivoy, A., Meier, U.-C., 2017. Vitamin-D deficiency as a potential environmental risk factor in multiple sclerosis, schizophrenia, and autism. *Frontiers in psychiatry* 8, 47.
- Kodas, E., Galineau, L., Bodard, S., Vancassel, S., Guilloteau, D., Besnard, J. C., Chalon, S., 2004. Serotonergic neurotransmission is affected by n- 3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *Journal of neurochemistry* 89, 695-702.
- Kodis, E. J., Choi, S., Swanson, E., Ferreira, G., Bloom, G. S., 2018. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx connects amyloid- β oligomers to ectopic neuronal cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 14, 1302-1312.
- Koh, H.-J., Lee, S.-M., Sohn, B.-G., Lee, S.-H., Ryoo, Z. Y., Chang, K.-T., Park, J.-W., Park, D.-C., Song, B. J., Veech, R. L., 2004. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*.
- Korn, T., Magnus, T., Toyka, K., Jung, S., 2004. Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide—mechanisms independent of pyrimidine depletion. *Journal of leukocyte biology* 76, 950-960.
- Kornek, B., Storch, M. K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer, M., Lassmann, H., 2000. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *The American journal of pathology* 157, 267-276.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H.,

Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 16, 3.

Kuczynski, B., Reo, N. V., 2006. Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochemical research* 31, 639-656.

Kurtzke, J. F., 1980. Geographic distribution of multiple sclerosis: an update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurologica Scandinavica* 62, 65-80.

Lambeth, J. D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* 4, 181.

Larocque, D., Richard, S., 2005. QUAKING KH domain proteins as regulators of glial cell fate and myelination. *RNA biology* 2, 37-40.

Larsson, H., Böttiger, Y., Iuliano, L., Diczfalusy, U., 2007. In vivo interconversion of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 695-701.

Lassmann, H., Brück, W., Lucchinetti, C. F., 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology* 17, 210-218.

Lassmann, H., van Horssen, J., 2016. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1862, 506-510.

Lassmann, H., Van Horssen, J., Mahad, D., 2012. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature Reviews Neurology* 8, 647-656.

Laudiero, L. B., Aloe, L., Levi-Montalcini, R., Buttinelli, C., Schilter, D., Gillessen, S., Otten, U., 1992. Multiple sclerosis patients express increased levels of β -nerve growth factor in cerebrospinal fluid. *Neuroscience letters* 147, 9-12.

Layé, S., 2010. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 82, 295-303.

Lecoœur, H., de Oliveira-Pinto, L. M., Gougeon, M.-L., 2002. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *Journal of immunological methods* 265, 81-96.

Lee, M., Cho, T., Jantaratnotai, N., Wang, Y. T., McGeer, E., McGeer, P. L., 2010. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *The FASEB Journal* 24, 2533-2545.

Lee, S., Shea, T. B., 2012. Caspase-mediated truncation of tau potentiates aggregation. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012.

Legrand, P., 2007. Les acides gras: Structures, fonctions, apports nutritionnels conseillés. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 42, 7-12.

Lemaire, S., Lizard, G., Monier, S., Miguet, C., Gueldry, S., Volot, F., Gambert, P., Néel, D., 1998. Different patterns of IL-1 β secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7 α - , 7 β - hydroxycholesterol, or 7- ketocholesterol. *FEBS letters* 440, 434-439.

Leoni, V., Caccia, C., 2015. The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 1095-1105.

Leoni, V., Caccia, C., 2011. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chemistry and physics of lipids* 164, 515-524.

Leoni, V., Lütjohann, D., Masterman, T., 2005. Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *Journal of lipid research* 46, 191-195.

Leoni, V., Masterman, T., Diczfalusy, U., De Luca, G., Hillert, J., Björkhem, I., 2002. Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neuroscience letters* 331, 163-166.

Leoni, V., Nury, T., Vejux, A., Zarrouk, A., Caccia, C., Debbabi, M., Fromont, A., Sghaier, R., Moreau, T., Lizard, G., 2017. Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, *molecular biology* 169, 96-110.

Levine, R. L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 790-796.

Ljubisavljevic, S., 2016. Oxidative stress and neurobiology of demyelination. *Molecular neurobiology* 53, 744-758.

Liang, J.-H., Jia, J.-P., 2014. Dysfunctional autophagy in Alzheimer's disease: pathogenic roles and therapeutic implications. *Neuroscience bulletin* 30, 308-316.

Lim, G. P., Calon, F., Morihara, T., Yang, F., Teter, B., Ubeda, O., Salem, N., Frautschy, S. A., Cole, G. M., 2005. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *Journal of Neuroscience* 25, 3032-3040.

Lim, Y.-A., Grimm, A., Giese, M., Mensah-Nyagan, A. G., Villafranca, J. E., Ittner, L. M., Eckert, A., Götz, J., 2011. Inhibition of the mitochondrial enzyme ABAD restores the amyloid- β -mediated deregulation of estradiol. *PloS one* 6, e28887.

Lin, M. T., Beal, M. F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787.

Lin, S. X., Lisi, L., Russo, C. D., Polak, P. E., Sharp, A., Weinberg, G., Kalinin, S., Feinstein, D. L., 2011. The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. *ASN neuro* 3, AN20100033.

Lindberg, R. L. P., De Groot, C. J. A., Certa, U., Ravid, R., Hoffmann, F., Kappos, L., Leppert, D., 2004. Multiple sclerosis as a generalized CNS disease—comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. *Journal of neuroimmunology* 152, 154-167.

Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., Vass, K., 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *The American journal of pathology* 130, 443.

Linker, R. A., Lee, D.-H., Ryan, S., van Dam, A. M., Conrad, R., Bista, P., Zeng, W., Hronowsky, X., Buko, A., Chollate, S., 2011. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 134, 678-692.

Liu, J.-P., Tang, Y., Zhou, S., Toh, B. H., McLean, C., Li, H., 2010. Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Molecular and Cellular Neuroscience* 43, 33-42.

Liu, Y., Hultén, L. M., Wiklund, O., 1997. Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 317-323.

Lismont, C., Nordgren, M., Van Veldhoven, P. P., Fransen, M., 2015. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Frontiers in cell and developmental biology* 3, 35.

Lizard, G., Rouaud, O., Demarquoy, J., Cherkaoui-Malki, M., Iuliano, L., 2012. Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. *Journal of Alzheimer's disease* 29, 241-254.

Lizard, G. r., Monier, S., Cordelet, C., Gesquiere, L., Deckert, V. r., Gueldry, S., Lagrost, L., Gambert, P., 1999. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 1190-1200.

López-Erauskin, J., Ferrer, I., Galea, E., Pujol, A., 2013. Cyclophilin D as a potential target for antioxidants in neurodegeneration: the X-ALD case. *Biological chemistry* 394, 621-629.

Love, W. C., Cashell, A., Reynolds, M., Callaghan, N., 1974. Linoleate and fatty-acid patterns of serum lipids in multiple sclerosis and other diseases. *Br Med J* 3, 18-21.

Lublin, F. D., Reingold, S. C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 46, 907-911.

Lublin, F. D., Reingold, S. C., 2003. Clinical features and subtypes of multiple sclerosis. *Blue Books of Practical Neurology*, Vol. 27. Elsevier, pp. 13-20.

Luca, M., Luca, A., Calandra, C., 2015. The role of oxidative damage in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015.

Lucas, R. M., Byrne, S. N., Correale, J., Ilschner, S., Hart, P. H., 2015. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegenerative disease management* 5, 413-424.

Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 47, 707-717.

Lucchinetti, C. F., Popescu, B. F. G., Bunyan, R. F., Moll, N. M., Roemer, S. F., Lassmann, H., Brück, W., Parisi, J. E., Scheithauer, B. W., Giannini, C., 2011. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 365, 2188-2197.

Luchtman, D. W., Song, C., 2013. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: findings from animal and clinical studies. *Neuropharmacology* 64, 550-565.

Lund, E. G., Kerr, T. A., Sakai, J., Li, W.-P., Russell, D. W., 1998. cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 273, 34316-34327.

Lütjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U., Björkhem, I., 1996. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9799-9804.

Lutterotti, A., Martin, R., 2008. Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 7, 538-547.

Lysandropoulos, A. P., Jaquiéry, E., Jilek, S., Pantaleo, G., Schlupe, M., Du Pasquier, R. A., 2011. Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects. *Journal of neuroimmunology* 233, 240-244.

M Reichardt, H., Luhder, F., 2012. The ambivalent role of apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Current pharmaceutical design* 18, 4453-4464.

Maeba, R., Ueta, N., 2003. Ethanolamine plasmalogens prevent the oxidation of cholesterol by reducing the oxidizability of cholesterol in phospholipid bilayers. *Journal of lipid research* 44, 164-171.

Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., Aloisi, F., 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130, 1089-1104.

Mahad, D. H., Trapp, B. D., Lassmann, H., 2015. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 14, 183-193.

Mahad, D. J., Ziabreva, I., Campbell, G., Lax, N., White, K., Hanson, P. S., Lassmann, H., Turnbull, D. M., 2009. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain* 132, 1161-1174.

Malvitte, L., Montange, T., Vejux, A., Joffre, C., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., Lizard, G., 2008. Activation of a Caspase-3-Independent Mode of Cell Death Associated with Lysosomal Destabilization in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells (ARPE-19) Exposed to 7 β -Hydroxycholesterol. *Current eye research* 33, 769-781.

Mamer, O., Gravel, S.-P., Choinière, L., Chénard, V., St-Pierre, J., Avizonis, D., 2013. The complete targeted profile of the organic acid intermediates of the citric acid cycle using a single stable isotope dilution analysis, sodium borodeuteride reduction and selected ion monitoring GC/MS. *Metabolomics* 9, 1019-1030.

Mancardi, G., Saccardi, R., 2008. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 7, 626-636.

Mar, S., Noetzel, M., 2010. Axonal damage in leukodystrophies. *Pediatric neurology* 42, 239-242.

Martins, I. J., Berger, T., Sharman, M. J., Verdile, G., Fuller, S. J., Martins, R. N., 2009. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 111, 1275-308.

Masliah, E., Iwai, A., Mallory, M., Uéda, K., Saitoh, T., 1996. Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 148, 201.

Masoodi, M., Kuda, O., Rossmeisl, M., Flachs, P., Kopecky, J., 2015. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 503-518.

Mathey, E. K., Derfuss, T., Storch, M. K., Williams, K. R., Hales, K., Woolley, D. R., Al-Hayani, A., Davies, S. N., Rasband, M. N., Olsson, T., 2007. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *Journal of Experimental Medicine* 204, 2363-2372.

Mattes, R. D., 2005. Fat taste and lipid metabolism in humans. *Physiology & behavior* 86, 691-697.

Matusheski, N. V., Juvik, J. A., Jeffery, E. H., 2004. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry* 65, 1273-1281.

Maxfield, F. R., Tabas, I., 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612.

Mazzulli, J. R., Xu, Y.-H., Sun, Y., Knight, A. L., McLean, P. J., Caldwell, G. A., Sidransky, E., Grabowski, G. A., Krainc, D., 2011. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 146, 37-52.

McAllister, L. D., Beatty, P. G., Rose, J., 1997. Allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia in a patient with multiple sclerosis. *Bone marrow transplantation* 19, 395.

McCoy, L., Tsunoda, I., Fujinami, R. S., 2006. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity* 39, 9-19.

McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 50, 121-127.

McGeer, P. L., McGeer, E. G., 2004. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 10, S3-S7.

McGeer, P. L., McGeer, E. G., 2013. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta neuropathologica* 126, 479-497.

McLennan, H. R., Degli Esposti, M., 2000. The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32, 153-162.

Meaney, S., Bodin, K., Diczfalusy, U., Björkhem, I., 2002. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation critical importance of the position of the oxygen function. *Journal of lipid research* 43, 2130-2135.

Medina, D. L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampanato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J. A., Sardiello, M., 2011. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Developmental cell* 21, 421-430.

Merrill, J. E., Hanak, S., Pu, S.-F., Liang, J., Dang, C., Iglesias-Bregna, D., Harvey, B., Zhu, B., McMonagle-Strucko, K., 2009. Teriflunomide reduces behavioral, electrophysiological, and histopathological deficits in the Dark Agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neurology* 256, 89-103.

Michalak, A., Mosińska, P., Fichna, J., 2016. Polyunsaturated fatty acids and their derivatives: therapeutic value for inflammatory, functional gastrointestinal disorders, and colorectal cancer. *Frontiers in pharmacology* 7, 459.

Mikaeloff, Y., Caridade, G., Tardieu, M., Suissa, S., Group, K. S., 2007. Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. *Brain* 130, 2589-2595.

Miller, D. H., Rudge, P., Johnson, G., Kendall, B. E., Macmanus, D. G., Moseley, I. F., Barnes, D., McDonald, W. I., 1988. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Brain* 111, 927-939.

Milo, R., Kahana, E., 2010. Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity reviews* 9, A387-A394.

Mindell, J. A., 2012. Lysosomal acidification mechanisms. *Annual review of physiology* 74, 69-86.

Mitić, T., Andrew, R., Walker, B. R., Hadoke, P. W. F., 2013. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the regulation of 7-oxysterol levels in the arterial wall through the inter-conversion of 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol. *Biochimie* 95, 548-555.

Mitsdoerffer, M., Kuchroo, V., 2009. New pieces in the puzzle: How does interferon- β really work in multiple sclerosis? *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 65, 487-488.

Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes & development* 21, 2861-2873. Mohammadi, N., Adib, M., Alsahebhosoul, F., Kazemi, M., Etemadifar, M., 2016. An investigation into the association between HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism and multiple sclerosis susceptibility. *Journal of neuroimmunology* 290, 115-118.

Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R. J., Shirasaki, Y., Greenberg, M. E., 2001. β -Amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *Journal of Neuroscience* 21, 7551-7560.

Murphy, R. C., Johnson, K. M., 2008. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *Journal of Biological Chemistry*.

Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., Muccioli, G. G., 2016. Oxysterols: from cholesterol metabolites to key mediators. *Progress in lipid research* 64, 152-169.

Migita, T., Okabe, S., Ikeda, K., Igarashi, S., Sugawara, S., Tomida, A., Soga, T., Taguchi, R., Seimiya, H., 2014. Inhibition of ATP citrate lyase induces triglyceride accumulation with altered fatty acid composition in cancer cells. *International journal of cancer* 135, 37-47.

Morell, P., Quarles, R. H., 1999. Characteristic composition of myelin. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* 6.

- Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R. J., Shirasaki, Y., Greenberg, M. E., 2001. β -Amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *Journal of Neuroscience* 21, 7551-7560.
- Mukhopadhyay, S., Fellows, K., Browne, R. W., Khare, P., Krishnan Radhakrishnan, S., Hagemeyer, J., Weinstock-Guttman, B., Zivadinov, R., Ramanathan, M., 2017. Interdependence of oxysterols with cholesterol profiles in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 23, 792-801.
- Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., Muccioli, G. G., 2016. Oxysterols: from cholesterol metabolites to key mediators. *Progress in lipid research* 64, 152-169.
- Na, S.-Y., Cao, Y., Toben, C., Nitschke, L., Stadelmann, C., Gold, R., Schimpl, A., Hünig, T., 2008. Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system. *Brain* 131, 2353-2365.
- Nelson, T. J., Alkon, D. L., 2005. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and β -amyloid peptide. *Journal of Biological Chemistry* 280, 7377-7387.
- Neu, I. S., 1983. Essential fatty acids in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 67, 151-163.
- Neuhaus, O., Farina, C., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 2001. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 56, 702-708.
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C. B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 284, 13291-13295.
- Nicklas, W., Vyas, I., Heikkila, R. E., 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 5, 6-tetrahydropyridine. *Life sciences* 36, 2503-2508.
- Nielsen, T. R., Rostgaard, K., Nielsen, N. M., Koch-Henriksen, N., Haahr, S., Sørensen, P. S., Hjalgrim, H., 2007. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Archives of neurology* 64, 72-75.
- Nixon, R. A., Yang, D.-S., Lee, J.-H., 2008. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* 4, 590-599.
- Nomenclature, I.-I. C. o. B., 1977. The nomenclature of lipids: Recommendations (1976). *Lipids* 12, 455-468.

Nordgren, M., Fransen, M., 2014. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie* 98, 56-62.

Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B. G., 2000. Multiple sclerosis. *New England journal of medicine* 343, 938-952.

Nunomura, A., Honda, K., Takeda, A., Hirai, K., Zhu, X., Smith, M. A., Perry, G., 2006. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *BioMed Research International* 2006.

Nury, T., Sghaier, R., Zarrouk, A., Ménétrier, F., Uzun, T., Leoni, V., Caccia, C., Meddeb, W., Namsi, A., Sassi, K., 2018. Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol: Attenuation by α -tocopherol. *Biochimie*.

Nury, T., Zarrouk, A., Ragot, K., Debbabi, M., Riedinger, J.-M., Vejux, A., Aubourg, P., Lizard, G., 2017. 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: Potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 169, 123-136.

Nury, T., Zarrouk, A., Mackrill, J. J., Samadi, M., Durand, P., Riedinger, J.-M., Doria, M., Vejux, A., Limagne, E., Delmas, D., 2015. Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 β -hydroxycholesterol-, or 24 (S)-hydroxycholesterol: Protective effects of α -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22: 6 n-3). *Steroids* 99, 194-203.

O'Brien, J. S., 1965. Stability of the Myelin Membrane: Lipid molecules may impart stability to the myelin membrane through intermolecular cohesion. *Science* 147, 1099-1107.

O'Connor, P., Wolinsky, J. S., Confavreux, C., Comi, G., Kappos, L., Olsson, T. P., Benzerdjeb, H., Truffinet, P., Wang, L., Miller, A., 2011. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 365, 1293-1303.

Odermatt, A., Klusonova, P., 2015. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1: Regeneration of active glucocorticoids is only part of the story. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 151, 85-92.

Ogier-Denis, E., Codogno, P., 2003. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1603, 113-128.

Olkkonen, V. M., Hynynen, R., 2009. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Molecular aspects of medicine* 30, 123-133.

Olkkonen, V. M., Béaslas, O., Nissilä, E., 2012. Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules* 2, 76-103.

Orrenius, S., 2007. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug metabolism reviews* 39, 443-455.

Oveisgharan, S., Buchman, A. S., Yu, L., Farfel, J., Hachinski, V., Gaiteri, C., De Jager, P. L., Schneider, J. A., Bennett, D. A., 2018. APOE $\epsilon 2\epsilon 4$ genotype, incident AD and MCI, cognitive decline, and AD pathology in older adults. *Neurology*, 10-1212.

Palavra, F., Marado, D., Mascarenhas-Melo, F., Sereno, J., Teixeira-Lemos, E., Nunes, C. C., Gonçalves, G., Teixeira, F., Reis, F., 2013. New markers of early cardiovascular risk in multiple sclerosis patients: oxidized-LDL correlates with clinical staging. *Disease markers* 34, 341348.

Palmer, A. M., 2010. Teriflunomide, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)* 11, 1313-1323.

Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., Petrosillo, G., 2014. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1837, 408-417.

Parajuli, B., Sonobe, Y., Horiuchi, H., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2013. Oligomeric amyloid β induces IL-1 β processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell death & disease* 4, e975

Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P. D., Wang, C., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Kramvis, I., Sahin, M., 2008. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 322, 963-966.

Parodi, B., Rossi, S., Morando, S., Cordano, C., Bragioni, A., Motta, C., Usai, C., Wipke, B. T., Scannevin, R. H., Mancardi, G. L., 2015. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. *Acta neuropathologica* 130, 279-295.

Pascual-Ahuir, A., Manzanares-Estreder, S., Proft, M., 2017. Pro-and antioxidant functions of the peroxisome-mitochondria connection and its impact on aging and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017.

- Passananti, C., Fanciulli, M., 2007. The anti-apoptotic factor Che-1/AATF links transcriptional regulation, cell cycle control, and DNA damage response. *Cell Division* 2, 21.
- Patten, D. A., Germain, M., Kelly, M. A., Slack, R. S., 2010. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 20, S357-S367.
- Pedersen, H. E., 1974. Cerebrospinal fluid cholesterol and phospholipids in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 50, 171-182.
- Pekmezovic, T., Drulovic, J., Milenkovic, M., Jarebinski, M., Stojisavljevic, N., Mesaros, S., Kistic, D., Kostic, J., 2006. Lifestyle factors and multiple sclerosis: a case-control study in Belgrade. *Neuroepidemiology* 27, 212-216.
- Pender, M. P., 1998. Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. *The Lancet* 351, 978-981.
- Pennington, C. R., 1997. Disease and malnutrition in British hospitals. *Proceedings of the nutrition society* 56, 393-407.
- Perriot, S., Mathias, A., Perriard, G., Canales, M., Jonkmans, N., Merienne, N., Meunier, C., El Kassab, L., Perrier, A. L., Laplaud, D.-A., 2018. Human induced pluripotent stem cell-derived astrocytes are differentially activated by multiple sclerosis-associated cytokines. *Stem cell reports* 11, 1199-1210.
- Perry, G., Nunomura, A., Hirai, K., Zhu, X., Prez, M., Avila, J., Castellani, R. J., Atwood, C. S., Aliev, G., Sayre, L. M., 2002. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radical Biology and Medicine* 33, 1475-1479.
- Perry, M., Swain, S., Kemmis-Betty, S., Cooper, P., 2014. Multiple sclerosis: summary of NICE guidance. *Bmj* 349, g5701.
- Peterson, P. K., Toborek, M., 2014. *Neuroinflammation and neurodegeneration*. Springer.
- Phillips, J. T., Fox, R., Miller, D., Kita, M., Hutchinson, M., Havrdova, E., Raghupathi, K., Yuan, H., Novas, M., Vigiotta, V., 2012. Safety and tolerability of BG-12 in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): analyses from the CONFIRM study (S41.005). *Neurology* 78, S41-005.
- Pierrel, F., Cobine, P. A., Winge, D. R., 2007. Metal Ion availability in mitochondria. *Biometals* 20, 675.

- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., Federico, A., 2014. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease* 42, S125-S152.
- Pike, J., Jones, E., Rajagopalan, K., Piercy, J., Anderson, P., 2012. Social and economic burden of walking and mobility problems in multiple sclerosis. *BMC neurology* 12, 94
- Pikuleva, I. A., 2006. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. *Drug metabolism and disposition*.
- Piomelli, D., Astarita, G., Rapaka, R., 2007. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 743.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Metz, L. M., McFarland, H. F., O'Connor, P. W., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 58, 840-846.
- Polman, C. H., O'Connor, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Wajgt, A., 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 354, 899-910.
- Poser, C. M., Brinar, V. V., 2001. Diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery* 103, 1-11.
- Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., Johnson, K. P., Sibley, W. A., Silberberg, D. H., Tourtellotte, W. W., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 13, 227-231.
- Power, J. H. T., Blumbergs, P. C., 2009. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta neuropathologica* 117, 63-73.
- Poynder, E. G. T., Russell, J., 1926. The Cholesterol Content of the Cerebro-Spinal Fluid in Certain Mental Diseases. *Journal of Mental Science* 72, 62-66.
- Praticò, D., 2008. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147, 70-78.
- Pulfer, M. K., Murphy, R. C., 2004. Formation of biologically active oxysterols during ozonolysis of cholesterol present in lung surfactant. *Journal of Biological Chemistry* 279,

26331-26338.

Qi, X., Lewin, A. S., Sun, L., Hauswirth, W. W., Guy, J., 2006. Mitochondrial protein nitration primes neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Biological Chemistry* 281, 31950-31962.

Ragot, K., Delmas, D., Athias, A., Nury, T., Baarine, M., Lizard, G., 2011. α -Tocopherol impairs 7-ketocholesterol-induced caspase-3-dependent apoptosis involving GSK-3 activation and Mcl-1 degradation on 158N murine oligodendrocytes. *Chemistry and physics of lipids* 164, 469-478.

Ragot, K., Mackrill, J. J., Zarrouk, A., Nury, T., Aires, V., Jacquin, A., Athias, A., de Barros, J.-P. P., Végux, A., Riedinger, J.-M., 2013. Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochemical pharmacology* 86, 67-79.

Raine, C. S., Scheinberg, L. C., 1988. On the immunopathology of plaque development and repair in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 20, 189-201.

Ramakrishnan, V., Husain, R. S. A., Ahmed, S. S. S. J., 2017. Genetic predisposition of IL-10 promoter polymorphisms with risk of multiple sclerosis: A meta-analysis. *Journal of neuroimmunology* 306, 11-18.

Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., Goebel, I., Mubaidin, A. F., Wriekat, A.-L., Roeper, J., 2006. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature genetics* 38, 1184.

Ramos-Cejudo, J., Oreja-Guevara, C., Aroeira, L. S., De Antonio, L. R., Chamorro, B., Diez-Tejedor, E., 2011. Treatment with natalizumab in relapsing–remitting multiple sclerosis patients induces changes in inflammatory mechanism. *Journal of clinical immunology* 31, 623-631.

Ransohoff, R. M., 2012. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nature neuroscience* 15, 1074.

Repa, J. J., Lund, E. G., Horton, J. D., Leitersdorf, E., Russell, D. W., Dietschy, J. M., Turley, S. D., 2000. Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. *J Biol Chem* 275, 39685-92, doi:10.1074/jbc.M007653200.

- Romdhane, N. A., Hamida, M. B., Mrabet, A., Larnaout, A., Samoud, S., Hamda, A. B., Hamda, M. B., Oueslati, S., 1993. Prevalence study of neurologic disorders in Kelibia (Tunisia). *Neuroepidemiology* 12, 285-299.
- Rothe, G., Valet, G., 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'- dichlorofluorescin. *Journal of leukocyte biology* 47, 440-448.
- Roy, J., Le Guennec, J.-Y., Galano, J.-M., Thireau, J., Bultel-Poncé, V., Demion, M., Oger, C., Lee, J. C.-Y., Durand, T., 2016. Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of omega-3 polyunsaturated fatty acid: Bioactive drugs? *Biochimie* 120, 56-61.
- Rubio-Perez, J. M., Morillas-Ruiz, J. M., 2012. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal* 2012.
- Russell, D. W., 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry* 72, 137-174.
- Sabbagh, M., Cummings, J., 2011. Progressive cholinergic decline in Alzheimer's Disease: consideration for treatment with donepezil 23 mg in patients with moderate to severe symptomatology. *BMC neurology* 11, 21.
- Saeed, A. A., Genové, G., Li, T., Lütjohann, D., Olin, M., Mast, N., Pikuleva, I. A., Crick, P., Wang, Y., Griffiths, W., 2014. Effects of a disrupted blood-brain barrier on cholesterol homeostasis in the brain. *Journal of Biological Chemistry* 289, 23712-23722.
- Saher, G., Quintes, S., Möbius, W., Wehr, M. C., Krämer-Albers, E.-M., Brügger, B., Nave, K.-A., 2009. Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein P0 required for peripheral myelin compaction. *Journal of Neuroscience* 29, 6094-6104.
- Salou, M., Ngono, A. E., Garcia, A., Michel, L., Laplaud, D. A., 2013. Immunité adaptative et physiopathologie de la sclérose en plaques. *La Revue de médecine interne* 34, 479-486.
- Salvesen, G. S., Dixit, V. M., 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-446.
- Satoh, J.-i., Nakanishi, M., Koike, F., Miyake, S., Yamamoto, T., Kawai, M., Kikuchi, S., Nomura, K., Yokoyama, K., Ota, K., 2005. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiology of disease* 18, 537-550.

Sawcer, S., 2008. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain* 131, 3118-3131.

Sawcer, S., Franklin, R. J. M., Ban, M., 2014. Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology* 13, 700-709.

Saxena, A., Bauer, J., Scheikl, T., Zappulla, J., Audebert, M., Desbois, S., Waisinan, A., Lassmann, H., Mars, L., Liblau, R., Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. Vol. 203. ELSEVIER SCIENCE BV PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS, pp. 272-272.

Scannevin, R., Brennan, M., Matos, M., Hronowski, X., Gao, B., Juhasz, P., Rhodes, K., 2014. Dimethyl Fumarate and Monoethyl Fumarate Exhibit Differential Effects on Glutathione, Keap1 and Nrf2 Activation In Vitro (P1. 204). *Neurology* 82, P1-204.

Scannevin, R. H., Chollate, S., Jung, M.-y., Shackett, M., Patel, H., Bista, P., Zeng, W., Ryan, S., Yamamoto, M., Lukashev, M., 2012. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341, 274-284.

Schenck, M., Carpinteiro, A., Grassmé, H., Lang, F., Gulbins, E., 2007. Ceramide: physiological and pathophysiological aspects. *Archives of biochemistry and biophysics* 462, 171-175.

Schrader, M., Fahimi, H. D., 2008. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochemistry and cell biology* 129, 421-440.

Schilling, S., Goelz, S., Linker, R., Luehder, F., Gold, R., 2006. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clinical & Experimental Immunology* 145, 101-107.

Scolding, N. J., Frith, S., Linington, C., Morgan, B. P., Campbell, A. K., Compston, D. A. S., 1989. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *Journal of neuroimmunology* 22, 169-176.

Schönenberger, M. J., Kovacs, W. J., 2015. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Frontiers in cell and developmental biology* 3, 42.

Schroepfer, G. J., 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological reviews* 80, 361-554.

Schulz, K. L., Eckert, A., Rhein, V., Mai, S., Haase, W., Reichert, A. S., Jendrach, M., Müller, W. E., Leuner, K., 2012. A new link to mitochondrial impairment in tauopathies. *Molecular neurobiology* 46, 205-216.

Schweckendiek, W., 1959. Treatment of psoriasis vulgaris. *Medizinische Monatsschrift* 13, 103.

Sedel, F., 2017. Biotin for use in treating X-linked adrenoleukodystrophy. Google Patents.

Sedel, F., Bernard, D., Mock, D. M., Tourbah, A., 2016. Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis. *Neuropharmacology* 110, 644-653.

Sedel, F., Papeix, C., Bellanger, A., Touitou, V., Lebrun-Frenay, C., Galanaud, D., Gout, O.,

Lyon-Caen, O., Tourbah, A., 2015. High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: a pilot study. *Multiple sclerosis and related disorders* 4, 159-169.

Seet, R. C. S., Lee, C.-Y. J., Lim, E. C. H., Tan, J. J. H., Quek, A. M. L., Chong, W.-L., Looi, W.-F., Huang, S.-H., Wang, H., Chan, Y.-H., 2010. Oxidative damage in Parkinson disease: measurement using accurate biomarkers. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 560-566.

Segatto, M., Leboffe, L., Trapani, L., Pallottini, V., 2014. Cholesterol homeostasis failure in the brain: implications for synaptic dysfunction and cognitive decline. *Current medicinal chemistry* 21, 2788-2802.

Senanayake, V. K., Jin, W., Mochizuki, A., Chitou, B., Goodenowe, D. B., 2015. Metabolic dysfunctions in multiple sclerosis: implications as to causation, early detection, and treatment, a case control study. *BMC neurology* 15, 154.

Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H., Rhee, S. G., 2000. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 275, 20346-20354.

Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., Ballabio, A., 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 283.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., 2012. A lysosome- to- nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal* 31, 1095-1108.

Sghaier, R., Nury, T., Leoni, V., Caccia, C., De Barros, J.-P. P., Cherif, A., Vejux, A., Moreau, T., Limem, K., Samadi, M., 2019a. Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7 β -hydroxycholesterol. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 194, 105432.

Sghaier, R., Zarrouk, A., Nury, T., Badreddine, I., O'Brien, N., Mackrill, J. J., Vejux, A., Samadi, M., Nasser, B., Caccia, C., 2019b. Biotin attenuation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism alteration and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death in 158N murine oligodendrocytes. *Free radical research* 53, 535-561.

Sheikh, S., Haque, E., Mir, S. S., 2013. Neurodegenerative diseases: multifactorial conformational diseases and their therapeutic interventions. *Journal of neurodegenerative diseases* 2013.

Shi, Y., Sun, X., Sun, Y., Hou, L., Yao, M., Lian, K., Li, J., Lu, X., Jiang, L., 2016. Elevation of cortical C26: 0 due to the decline of peroxisomal β -oxidation potentiates amyloid β generation and spatial memory deficits via oxidative stress in diabetic rats. *Neuroscience* 315, 125-135.

Sidransky, E., Nalls, M. A., Aasly, J. O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E. R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., 2009. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine* 361, 1651-1661.

Simopoulos, A. P., 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American journal of clinical nutrition* 70, 560s-569s.

Simon, K. C., Schmidt, H., Loud, S., Ascherio, A., 2015. Epstein–Barr virus candidate genes and multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders* 4, 60-64.

Simons, M., Trajkovic, K., 2006. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of cell science* 119, 4381-4389.

Simpson, S., Blizzard, L., Otahal, P., Van der Mei, I., Taylor, B., 2011. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 82, 1132-1141.

Singh, I., Paintlia, A. S., Khan, M., Stanislaus, R., Paintlia, M. K., Haq, E., Singh, A. K., Contreras, M. A., 2004. Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment. *Brain research* 1022, 1-11.

Sloka, S., Silva, C., Pryse-Phillips, W., Patten, S., Metz, L., Yong, V. W., 2011. A quantitative analysis of suspected environmental causes of MS. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 38, 98-105.

Smith, J. J., Aitchison, J. D., 2013. Peroxisomes take shape. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 803.

Song, P., Zou, M. H., 2015. Roles of reactive oxygen species in physiology and pathology. *Atherosclerosis: Risks, Mechanisms, and Therapies*, 379-392.

Sorice, M., Circella, A., Cristea, I. M., Garofalo, T., Di Renzo, L., Alessandri, C., Valesini, G., Degli Esposti, M., 2004. Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. *Cell death and differentiation* 11, 1133.

Sorice, M., Circella, A., Misasi, R., Pittoni, V., Garofalo, T., Cirelli, A., Pavan, A., Pontieri, G. M., Valesini, G., 2000. Cardiolipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for antiphospholipid antibodies. *Clinical & Experimental Immunology* 122, 277-284.

Stämpfli, M. R., Anderson, G. P., 2009. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nature Reviews Immunology* 9, 377.

Stevenson, E. V., Alexander, J. S., Yun, J. W., Becker, F., Gonzalez-Toledo, E., Minagar, A., 2016. Mechanisms of blood–brain barrier disintegration in the pathophysiology of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. Elsevier, pp. 393-413.

Stone, J. R., Yang, S., 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants & redox signaling* 8, 243-270.

Sprinkle, T. J., 1989. 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Critical reviews in neurobiology* 4, 235-301.

Stys, P. K., Zamponi, G. W., Van Minnen, J., Geurts, J. J. G., 2012. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nature Reviews Neuroscience* 13, 507.

Su, J. H., Anderson, A. J., Cribbs, D. H., Tu, C., Tong, L., Kesslack, P., Cotman, C. W., 2003. Fas and Fas Ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in β -amyloid-induced neuronal death. *Neurobiology of disease* 12, 182-193.

Su, K. G., Banker, G., Bourdette, D., Forte, M., 2009. Axonal degeneration in multiple sclerosis: the mitochondrial hypothesis. *Current neurology and neuroscience reports* 9, 411-417.

Suemaru, K., Kawasaki, H., Gomita, Y., Tanizaki, Y., 1997. Involvement of nitric oxide in development of tail-tremor induced by repeated nicotine administration in rats. *European journal of pharmacology* 335, 139-143.

Suneetha, A., 2016. Role of dimethyl fumarate in oxidative stress of multiple sclerosis: A review. *Journal of Chromatography B* 1019, 15-20.

Swarup, V., Julien, J.-P., 2011. ALS pathogenesis: recent insights from genetics and mouse models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35, 363-369.

Swerdlow, R. H., 2012. Mitochondria and cell bioenergetics: increasingly recognized components and a possible etiologic cause of Alzheimer's disease. *Antioxidants & redox signaling* 16, 1434-1455.

Tabas, I., 2002. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *The Journal of clinical investigation* 110, 905-911.

Tatton, N. A., 2000. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Experimental neurology* 166, 29-43.

Testa, G., Staurengi, E., Zerbinati, C., Gargiulo, S., Iuliano, L., Giaccone, G., Fantò, F., Poli, G., Leonarduzzi, G., Gamba, P., 2016. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox biology* 10, 24-33.

Teunissen, C. E., Dijkstra, C. D., Polman, C. H., Hoogervorst, E. L. J., Von Bergmann, K., Lütjohann, D., 2003. Decreased levels of the brain specific 24S-hydroxycholesterol and cholesterol precursors in serum of multiple sclerosis patients. *Neuroscience letters* 347, 159-162.

Thacker, E. L., Mirzaei, F., Ascherio, A., 2006. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta- analysis. *Annals of neurology* 59, 499-503.

Theoharides, T. C., Konstantinidou, A. D., 2007. Corticotropin-releasing hormone and the blood-brain-barrier. *Front Biosci* 12, 1615-1628.

Thériault, P., ElAli, A., Rivest, S., 2015. The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy* 7, 41.

Timmerman, G. M., Stuifbergen, A. K., 1999. Eating patterns in women with multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Nursing* 31, 152.

Tintoré, M., Arrambide, G., 2009. Early onset multiple sclerosis: The role of gender. *Journal of the Neurological Sciences* 286, 31-34, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.07.016>.

Tobinick, E., 2009. Tumour necrosis factor modulation for treatment of Alzheimer's disease. *CNS drugs* 23, 713-725.

Tong, L., 2013. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 863-891.

Torkildsen, Ø., Brunborg, L. A., Myhr, K. M., Bø, L., 2008. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica* 117, 72-76.

Trapp, B. D., Stys, P. K., 2009. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 8, 280-291.

Tremblay, A. J., Lamarche, B., Deacon, C. F., Weisnagel, S. J., Couture, P., 2014. Effects of sitagliptin therapy on markers of low-grade inflammation and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 63, 1141-1148.

Tremblay, M.-È., Sierra, A., 2014. *Microglia in health and disease*. Springer.

Trompier, D., Vejux, A., Zarrouk, A., Gondcaille, C., Geillon, F., Nury, T., Savary, S., Lizard, G., 2014. Brain peroxisomes. *Biochimie* 98, 102-110.

Tvrzicka, E., Kremmyda, L.-S., Stankova, B., Zak, A., 2011. FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE-A REVIEW. PART 1: CLASSIFICATION, DIETARY SOURCES AND BIOLOGICAL FUNCTIONS. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* 155.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.

Van de Kraats, C., Killestein, J., Popescu, V., Rijkers, E., Vrenken, H., Lütjohann, D., Barkhof, F., Polman, C., Teunissen, C., 2014. Oxysterols and cholesterol precursors correlate to magnetic resonance imaging measures of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 20, 412-417.

van der Goes, A., Brouwer, J., Hoekstra, K., Roos, D., van den Berg, T. K., Dijkstra, C. D., 1998. Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *Journal of neuroimmunology* 92, 67-75.

van der Goes, A., Wouters, D., van der Pol, S. M. A., Huizinga, R., Ronken, E., Adamson, P., Greenwood, J., Dijkstra, C. D., de Vries, H. E., 2001. Reactive oxygen species enhance the migration of monocytes across the blood-brain barrier in vitro. *The FASEB Journal* 15, 1852-1854.

van der Kant, R., Zondervan, I., Janssen, L., Neefjes, J., 2013. Cholesterol binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1. *Journal of lipid research*, jlr-M037325.

van der Mei, I. A. F., Ponsonby, A. L., Dwyer, T., Blizzard, L., Taylor, B. V., Kilpatrick, T., Butzkueven, H., McMichael, A. J., 2007. Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *Journal of neurology* 254, 581.

Van Horssen, J., Schreibelt, G., Drexhage, J., Hazes, T., Dijkstra, C. D., Van der Valk, P., De Vries, H. E., 2008. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radical Biology and Medicine* 45, 1729-1737.

Van Meeteren, M. E., Teunissen, C. E., Dijkstra, C. D., Van Tol, E. A. F., 2005. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *European journal of clinical nutrition* 59, 1347.

Vance, J. E., 2012. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Disease models & mechanisms* 5, 746-755.

Vance, J. E., Vance, D. E., 2008. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier.

Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., Wong, P. C., 2009. The β -secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *Journal of Neuroscience* 29, 12787-12794.

Vaya, J., Schipper, H. M., 2007. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *Journal of neurochemistry* 102, 1727-1737.

Vázquez, M., Merlos, M., Adzet, T., Laguna, J. C., 1998. Influence of lipid profile and fatty acid composition on the oxidation behavior of rat and guinea pig low density lipoprotein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 119, 311-316.

Vejux, A., Lizard, G., 2009. 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* 30, 153-170.

Vejux, A., Malvitte, L., Lizard, G., 2008. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Brazilian journal of medical and biological research* 41, 545-556.

Vermersch, P., Czlonkowska, A., Grimaldi, L. M. E., Confavreux, C., Comi, G., Kappos, L., Olsson, T. P., Benamor, M., Bauer, D., Truffinet, P., 2014. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. *Multiple Sclerosis Journal* 20, 705-716.

von Kleist-Retzow, J.-C., Hornig-Do, H.-T., Schauen, M., Eckertz, S., Dinh, T. A. D., Stassen, F., Lottmann, N., Bust, M., Galunska, B., Wielckens, K., 2007. Impaired mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels. *Experimental cell research* 313, 3076-3089.

Vukusic, S., Van Bockstael, V., Gosselin, S., Confavreux, C., 2007. Regional variations of multiple sclerosis prevalence in French farmers. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*.

Vuletic, S., Kennedy, H., Albers, J. J., Killestein, J., Vrenken, H., Lütjohann, D., Teunissen, C. E., 2014. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E and phospholipid transfer protein activity are reduced in multiple sclerosis; relationships with the brain MRI and CSF lipid variables. *Multiple sclerosis and related disorders* 3, 533-541.

Wanders, R. J. A., Waterham, H. R., 2006. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 295-332.

Wanders, R. J. A., Waterham, H. R., Ferdinandusse, S., 2016. Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Frontiers in cell and developmental biology* 3, 83.

Wallace, D. C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359-407.

Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H.-g., Zhu, X., 2014. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1842, 1240-1247.

Weisfeld-Adams, J. D., Mehta, L., Rucker, J. C., Dembitzer, F. R., Szporn, A., Lublin, F. D., Introne, W. J., Bhambhani, V., Chicka, M. C., Cho, C., 2013. Atypical Chediak-Higashi syndrome with attenuated phenotype: three adult siblings homozygous for a novel LYST deletion and with neurodegenerative disease. *Orphanet journal of rare diseases* 8, 46.

Werdenberg, D., Joshi, R., Wolfram, S., Merkle, H. P., Langguth, P., 2003. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharmaceutics & drug disposition* 24, 259-273.

Whitacre, C. C., Reingold, S. C., O'Looney, P. A., Blankenhorn, E., Brinley, F., Collier, E., Duquette, P., Fox, H., Giesser, B., Gilmore, W., 1999. A Gender Gap in Autoimmunity: Task Force on Gender, Multiple Sclerosis and Autoimmunity. *Science* 283, 1277-1278.

Widlak, P., Garrard, W. T., 2006. Regulation and action of the major apoptotic nucleases: DFF40/CAD and Endonuclease G. *Federation of American Societies for Experimental Biology*.

Widlansky, M. E., Gutterman, D. D., 2011. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling* 15, 1517-1530.

Wilkins, H. M., Carl, S. M., Swerdlow, R. H., 2014. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox biology* 2, 619-631.

Wilkins, H. M., Weidling, I. W., Ji, Y., Swerdlow, R. H., 2017. Mitochondria-derived damage-associated molecular patterns in neurodegeneration. *Frontiers in immunology* 8, 508.

Williams, C. M., Lines, C. M., McKay, E. C., 1988. Iron and zinc status in multiple sclerosis patients with pressure sores. *European journal of clinical nutrition* 42, 321-328.

Wingler, K., Wunsch, S., Kreutz, R., Rothermund, L., Paul, M., Schmidt, H. H. H. W., 2001. Upregulation of the vascular NAD (P) H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 1456-1464.

Witte, M. E., Bø, L., Rodenburg, R. J., Belien, J. A., Musters, R., Hazes, T., Wintjes, L. T., Smeitink, J. A., Geurts, J. J. G., De Vries, H. E., 2009. Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 219, 193-204.

Wolfe, D. M., Lee, J. h., Kumar, A., Lee, S., Orenstein, S. J., Nixon, R. A., 2013. Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. *European Journal of Neuroscience* 37, 1949-1961.

Wolinsky, J. S., Narayana, P. A., O'Connor, P., Coyle, P. K., Ford, C., Johnson, K., Miller, A., Pardo, L., Kadosh, S., Ladkani, D., 2007. Glatiramer acetate in primary progressive multiple sclerosis: results of a multinational, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of neurology* 61, 14-24.

Wong, D., Prameya, R., Dorovini-Zis, K., 2007. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *Journal of neuroimmunology* 184, 136-148.

Wood, W. G., Li, L., Müller, W. E., Eckert, G. P., 2014. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *Journal of neurochemistry* 129, 559-572.

Xue-Shan, Z., Juan, P., Qi, W., Zhong, R., Li-Hong, P., Zhi-Han, T., Zhi-Sheng, J., Gui-Xue, W., Lu-Shan, L., 2016. Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 456, 107-114, doi:10.1016/j.cca.2016.02.024.

Yamanaka, K., Urano, Y., Takabe, W., Saito, Y., Noguchi, N., 2015. Induction of apoptosis and necroptosis by 24 (S)-hydroxycholesterol is dependent on activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1. *Cell death & disease* 5, e990.

Yehuda, R., 2002. Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder. *Psychiatric Clinics of North America*.

Yoshida, Y., Niki, E., 2006. Bio- markers of lipid peroxidation in vivo: Hydroxyoctadecadienoic acid and hydroxycholesterol. *Biofactors* 27, 195-202.

Youdim, K. A., Martin, A., Joseph, J. A., 2000. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience* 18, 383-399.

Young, G., Conquer, J., 2005. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reproduction Nutrition Development* 45, 1-28.

Yu, R. K., Ueno, K., Glaser, G. H., Tourtellotte, W. W., 1982. Lipid and protein alterations of spinal cord and cord myelin of multiple sclerosis. *Journal of neurochemistry* 39, 464-477.

Yuan, X. M., Li, W., Brunk, U. T., Dalen, H., Chang, Y. H., Sevanian, A., 2000. Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 208-218.

Zahm, J. M., Baconnais, S., Monier, S., Bonnet, N., Bessède, G., Gambert, P., Puchelle, E., Lizard, G., 2003. 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 Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 52, 57-69.

Zambonin, J. L., Zhao, C., Ohno, N., Campbell, G. R., Engeham, S., Ziabreva, I., Schwarz, N., Lee, S. E., Frischer, J. M., Turnbull, D. M., 2011. Increased mitochondrial content in

remyelinated axons: implications for multiple sclerosis. *Brain* 134, 1901-1913.

Zarrouk, A., Debbabi, M., Bezine, M., Karym, E. M., Badreddine, A., Rouaud, O., Moreau, T., Cherkaoui-Malki, M., El Ayeb, M., Nasser, B., 2018. Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 15, 303-312.

Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N., Lizard, G. 2014. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing research reviews* 18, 148-162.

Zarrouk, A., Nury, T., Samadi, M., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N. M., Lizard, G., Mackrill, J. J., 2015. Effects of cholesterol oxides on cell death induction and calcium increase in human neuronal cells (SK-N-BE) and evaluation of the protective effects of docosahexaenoic acid (DHA; C22: 6 n-3). *Steroids* 99, 238-247.

Zarrouk, A., Riedinger, J.-M., Ahmed, S. H., Hammami, S., Chaabane, W., Debbabi, M., Ben Ammou, S., Rouaud, O., Frih, M., Lizard, G., 2015. Fatty acid profiles in demented patients: identification of hexacosanoic acid (C26: 0) as a blood lipid biomarker of dementia. *Journal of Alzheimer's Disease* 44, 1349-1359.

Zarrouk, A., Salem, Y. B., Hafsa, J., Sghaier, R., Charfeddine, B., Limem, K., Hammami, M., Majdoub, H., 2018. 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death, oxidative stress, and fatty acid metabolism dysfunctions attenuated with sea urchin egg oil. *Biochimie*.

Zarrouk, A., Vejux, A., Nury, T., El Hajj, H. I., Haddad, M., Cherkaoui-Malki, M., Riedinger, J.-M., Hammami, M., Lizard, G., 2012. 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). *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012.

Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N., Lizard, G., 2014. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing research reviews* 18, 148-162.

Zarrouk, A., Salem, Y. B., Hafsa, J., Sghaier, R., Charfeddine, B., Limem, K., Hammami, M., Majdoub, H., 2018. 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death, oxidative stress, and fatty acid metabolism dysfunctions attenuated with sea urchin egg oil. *Biochimie*.

Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., Madeo, F., 2012. FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell metabolism* 15, 279-291.

Zempleni, J., Wijeratne, S. S. K., Hassan, Y. I., 2009. Biotin. *Biofactors* 35, 36-46.

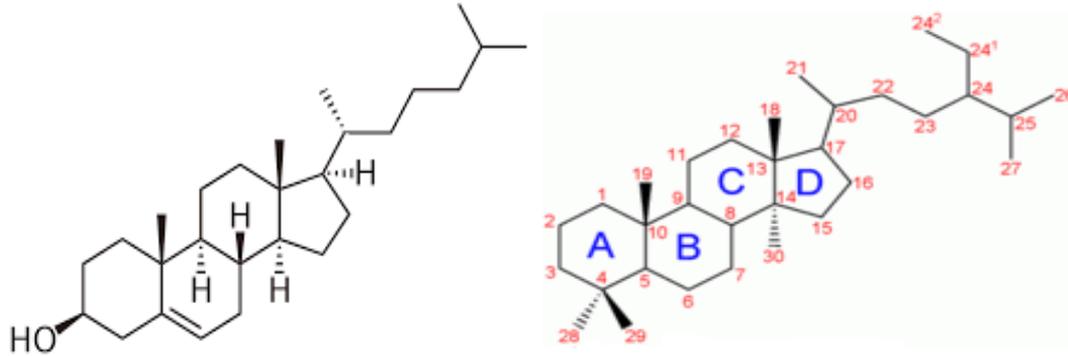
Zendedel, A., Beyers, C., Kipp, M., 2013. Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection. *Journal of molecular neuroscience* 51, 567-572.

- Zettl, U. K., Kuhlmann, T., Brück, W., 1998. Bcl-2 expressing T lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and applied neurobiology* 24, 202-208.
- Zhang, G.-X., Yu, S., Gran, B., Li, J., Calida, D., Ventura, E., Chen, X., Rostami, A., 2004. T cell and antibody responses in remitting-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in (C57BL/6× SJL) F1 mice. *Journal of neuroimmunology* 148, 1-10.
- Zhang, J., Liu, Q., 2015. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein & cell* 6, 254-264.
- Zhang, L., Yuan, S., Cheng, G., Guo, B., 2011. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PloS one* 6, e28432.
- Zhang, Q., Yuan, L., Zhang, Q., Gao, Y., Liu, G., Xiu, M., Wei, X., Wang, Z., Liu, D., 2015. Resveratrol attenuates hypoxia-induced neurotoxicity through inhibiting microglial activation. *International immunopharmacology* 28, 578-587.
- Zhao, S., Zhao, J., Zhang, T., Guo, C., 2016. Increased apoptosis in the platelets of patients with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Clinical neurology and neurosurgery* 143, 46-50.
- Zhornitsky, S., McKay, K. A., Metz, L. M., Teunissen, C. E., Rangachari, M., 2016. Cholesterol and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes. *Multiple sclerosis and related disorders* 5, 53-65.
- Zhou, X., He, X., Ren, Y., 2014. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural regeneration research* 9, 1787.
- Zhu, J., Chu, C. T., 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 20, S325-S334.
- Ziedén, B., Kaminskas, A., Kristenson, M., Kucinskienė, Z., Vessby, B., Olsson, A. G., Diczfalusy, U., 1999. Increased plasma 7β-hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 967-971.
- Zoghbi, H. Y., Orr, H. T., 2000. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual review of neuroscience* 23, 217-247.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., Sollott, S. J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* 94, 909-950.

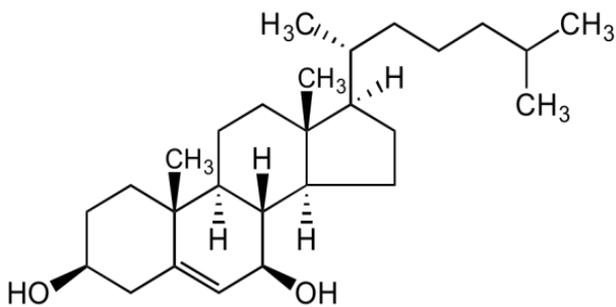
ANNEXES

Structure du cholestérol, du 7 β -hydroxycholestérol, du diméthyle fumarate, du monométhyle fumarate et de la biotine

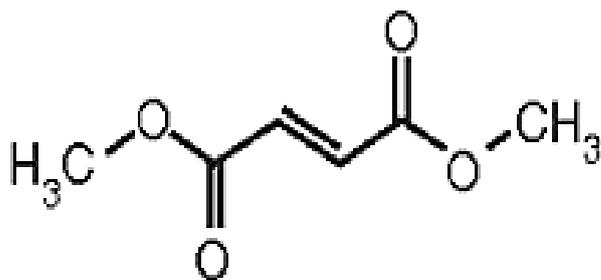
Structure du cholestérol



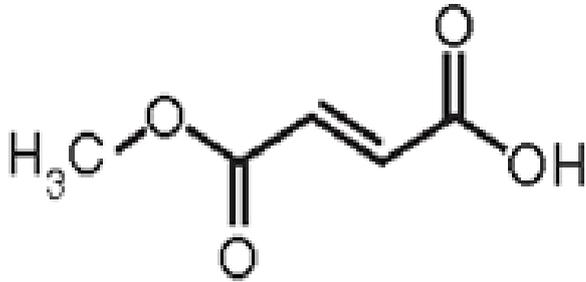
Structure du 7 β -hydroxycholestérol



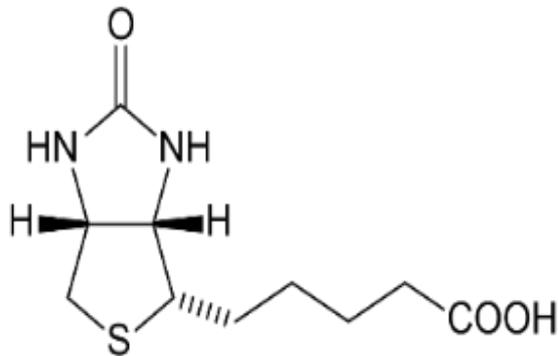
Structure du diméthyle fumarate



Structure du monométhyle fumarate



Structure de la biotine



PUBLICATIONS
ACCEPTÉES ET PUBLIÉES
SE RAPPORTANT A LA THESE



Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7β-hydroxycholesterol

Randa Sghaier^{a,b,c,d}, Thomas Nury^a, Valerio Leoni^e, Claudio Caccia^f, Jean-Paul Pais De Barros^g, Ameer Cherif^d, Anne Vejux^a, Thibault Moreau^{a,h}, Khalifa Limem^b, Mohammad Samadiⁱ, John J. Mackrill^j, Ahmed Slaheddine Masmoudi^d, Gérard Lizard^{a,*}, Amira Zarrouk^{b,c,**,1}

^a Univ. Bourgogne Franche-Comté, Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism' EA 7270 / Inserm, Dijon, France

^b Univ. Sousse, Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tunisia

^c Univ. Monastir, Faculty of Medicine, LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition - Functional Food & Vascular Health', Monastir

^d Univ. Manouba, Laboratory of Biotechnology and Valorisation of Bio-Géo Ressources (LR11ES31), Higher Institute of Biotechnology, Sidi Thabet, Tunisia

^e Laboratory of Clinical Chemistry, Hospital of Varese, ASST-Settelaghi, Varese, Italy

^f Unit of Medical Genetics and Neurogenetics, IRCCS Carlo Besta, Milano, Italy

^g Univ. Bourgogne, Lipidomic platform, Dijon, France

^h Univ. Hospital, Department of Neurology, Dijon, France

ⁱ LCPMC-A2, ICPM, Dept of Chemistry, Univ. Lorraine, Metz Technopôle, Metz, France

^j Department of Physiology, Biosciences Institute, University College Cork, Cork, Ireland

ARTICLE INFO

Keywords:

Dimethyl fumarate
Monomethyl fumarate
7β-hydroxycholesterol
158N cells
Oxidative stress
Mitochondria
Peroxisome
Oxiaoptophagy
Apoptosis
Autophagy
Lipid profile

ABSTRACT

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases and favor lipid peroxidation, leading to increased levels of 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC) which induces oxiaoptophagy (OXidative stress, APOPTosis, autoPHAGY). The cytoprotective effects of dimethylfumarate (DMF), used in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis and of monomethylfumarate (MMF), its main metabolite, were evaluated on murine oligodendrocytes 158 N exposed to 7β-OHC (50 μM, 24 h) with or without DMF or MMF (25 μM). The activity of 7β-OHC in the presence or absence DMF or MMF was evaluated on several parameters: cell adhesion; plasma membrane integrity measured with propidium iodide (PI), trypan blue and fluoresceine diacetate (FDA) assays; LDH activity; antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)); generation of lipid peroxidation products (malondialdehyde (MDA), conjugated dienes (CDs)) and protein oxidation products (carbonylated proteins (CPs)); reactive oxygen species (ROS) overproduction conducted with DHE and DHR123. The effect on mitochondria was determined with complementary criteria: measurement of succinate dehydrogenase activity, evaluation of mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) production using DiOC₆(3) and MitoSOX, respectively; quantification of mitochondrial mass with Mitotracker Red, and of cardiolipins and organic acids. The effects on mitochondrial and peroxisomal ultrastructure were determined by transmission electron microscopy. Intracellular sterol and fatty acid profiles were determined. Apoptosis and autophagy were characterized by staining with Hoechst 33,342, Giemsa and acridine orange, and with antibodies raised against caspase-3 and LC3. DMF and MMF attenuate 7β-OHC-induced cytotoxicity: cell growth inhibition; decreased cell viability; mitochondrial dysfunction (decrease of succinate dehydrogenase activity, loss of $\Delta\Psi_m$, increase of mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ production, alteration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle, and cardiolipins content); oxidative stress induction (ROS overproduction, alteration of GPx, CAT, and SOD activities, increased levels of MDA, CDs, and CPs); changes in fatty acid and cholesterol metabolism; and cell death induction (caspase-3 cleavage, activation

* Corresponding author.

** Corresponding author at: Univ. Monastir, Faculty of Medicine, LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition, Functional Food & Vascular Health', Monastir, & Univ. Sousse, Faculty of Medicine, Sousse, Tunisia.

E-mail addresses: gerard.lizard@u-bourgogne.fr (G. Lizard), zarroukamira@gmail.com (A. Zarrouk).

¹ These authors equally contributed to the design and the supervision of the study.

of LC3-I in LC3-II). Ultrastructural alterations of mitochondria and peroxisomes were prevented. These results demonstrate that DMF and MMF prevent major dysfunctions associated with neurodegenerative diseases: oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis and autophagy.

1. Introduction

Oxidative stress is characterized by an imbalance between excessive production of reactive oxygen species (ROS) and the capacity of antioxidant defenses to attenuate damage caused by free radicals [1]. Oxidative stress is amplified in a variety of neurodegenerative, chronic inflammatory, vascular and neurodegenerative diseases. Thus, several studies have carefully characterized the relationships between oxidative stress and demyelinating and non demyelinating neurodegenerative diseases [2,3]. Oxidative injury can be involved in brain lesions via the induction of protein and lipid oxidation [4], or mitochondrial dysfunction [5]. In the presence of oxidative stress, the high content of cholesterol in the brain makes it vulnerable to oxidation, which favors the generation of deleterious compounds, named oxysterols (cholesterol oxide products), in the central nerve system (CNS) [6]. Some of these oxysterols (mainly those oxidized on C7, such as 7-ketocholesterol (7KC) and 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC), mostly generated by the autoxidation of cholesterol [7]) are known to amplify oxidative stress and mitochondrial damage which contributes to cell death [8]. In humans, 7KC and 7 β -OHC levels were increased in the plasma, cerebrospinal fluid (CSF) or postmortem brain tissues of patients with neurodegenerative diseases, including multiple sclerosis (MS) [9], Parkinson's disease [10], Huntington's disease [11] or Alzheimer's disease (AD) [12]. A β peptide, a toxic peptide characteristic of AD, was shown to participate in the production of 7 β -OHC [13]. It is also known that 7KC can be converted to 7 β -OHC [14] by 11 β -hydroxyxteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) [15]. In humans, the 11 β -HSD1 is also able to catalyse the conversion of 7 β -OHC into 7KC [14]. As 7 β -OHC can be formed from 7KC and vice versa, the deleterious effects of both are closely related. It is therefore important to consider the activities of 7KC and 7 β -OHC since these two cytotoxic oxysterols are involved in neurodegeneration [3]. Currently, it has been demonstrated in different cell types from various species [16–19], that 7 β -OHC induces a more or less pronounced apoptotic mode of cell death associated with oxidative stress. Later, a complex cell death process defined as oxiaoptophagy ((OXIdative stress, APOPTosis, autoPHAGY)) was described on microglial cells and oligodendrocytes [8,20]. This particular type of cell death involving oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and induction of apoptosis and autophagy, which are hallmarks of neurodegenerative diseases, was observed in 7 β -OHC-treated murine oligodendrocytes 158 N [8]. The cellular model used in the present study (murine oligodendrocytes 158 N treated with 7 β -OHC) is therefore an interesting tool for identifying molecules targeting major cell alterations (oxidative stress and mitochondrial dysfunction leading to cell death) associated with demyelination, since oligodendrocytes are myelin synthesizing cells.

To prevent demyelination, different molecules have been tested for their neuroprotective capacities such as dimethyl fumarate (DMF), the active component of Tecfidera (Biogen) also named BG-12 [21]. DMF is a fumaric acid ester which has immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant properties [22–24]. This small drug has been approved as an oral therapeutic agent for the treatment of patients with relapsing-remitting MS [25,26]. Many studies have provided that the pharmacological effect of DMF is due to its bioactive metabolite, monomethyl fumarate (MMF) [21,27]. This metabolite has beneficial effects on neuroinflammation, neurodegeneration and oxidative stress [23,28]. It is supposed that DMF and MMF act by the activation of Nrf2 (nuclear factor E2-related factor2) pathway, through the induction of antioxidant protein expression [22]. Under physiological conditions, Nrf2 is sequestered in the cytoplasm through its interaction with the repressor

protein 'kelch-like ECH-associated protein 1' (Keap1). Treatment with compounds, like DMF, results in the conformational modifications of cysteine residues on Keap1 [28], which allows activation and nuclear translocation of Nrf2 to promote protective genes such as heme-oxygenase-1 [22] and NADPH-quinone oxidoreductase-1 [28].

In the present study, we evaluated the cytoprotective effects of DMF and MMF on 7 β -OHC-treated murine oligodendrocytes 158 N. We asked whether DMF and MMF were able to prevent or reduce 7 β -OHC-induced cytotoxicity (oxidative stress, mitochondrial dysfunction, modification of lipid profile, apoptosis and autophagy) accompanying demyelination in MS. In addition, as 158 N cells express major myelin proteins, proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP) [29], which are major compounds of myelin (a proteolipidic complex which wraps around the axons and is essential for the transmission of nerve impulse) [30], the effects of 7 β -OHC in the presence or absence DMF and MMF on PLP and MBP expression were also evaluated.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and treatments

Murine oligodendrocyte cells (158 N) [29] were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Amboise, France) containing 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Dutscher, Brumath, France) and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin) (Dutscher). Cells were incubated in a humidified atmosphere (5% CO₂, 95% air) at 37 °C and passaged twice a week.

The stock solutions of 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was prepared at 800 μ g/mL (2 mM) as previously described [19] and stored at 4 °C. Dimethyl fumarate (DMF) (ref: 242926, Sigma-Aldrich) and monomethyl fumarate (MMF) (ref: 651,419; Sigma-Aldrich) stock solutions, were prepared at 50 mM in DMSO (Sigma-Aldrich). α -Tocopherol (the major component of Vitamin E; ref: T3251, Sigma-Aldrich) solution was prepared at 80 mM as previously described [19].

In the different experimental conditions, murine oligodendrocytes 158 N were seeded either in Petri dishes (30.000 cells/cm², 100 mm diameter), or in six-well plates (2.4 \times 10⁵ cells per well). After 24 h of culture, and for an additional 24 h period of time, DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) or α -tocopherol (400 μ M) (used as a positive control for cytoprotection) were introduced in the culture medium 2 h before the addition of 7 β -OHC (50 μ M). The choice of the concentrations of 7 β -OHC (50 μ M) as well as of DMF (25 μ M) and MMF (25 μ M) was based on a study by Ragot et al. [19] and on the dose-effect relationship of 7 β -OHC (1, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 μ M) (Supplementary Fig. 1) and of DMF or MMF in the presence or absence of 7 β -OHC (Supplementary Fig. 2). With 7 β -OHC, the concentration of 50 μ M corresponds to the 50% inhibiting concentration on 158 N cells (Supplementary Fig. 1). In vitro, it is important to underline that only a part of oxysterols (1–35% depending on the cell type considered) accumulates in the cells [3,31]. It has been established that the median level of 7 β -OHC was 1.11 μ g/mL (2.8 μ M) and 1.43 μ g/mL (3.6 μ M) in the cerebrospinal fluid of normal subjects and of patients with multiple sclerosis, respectively [9]. Few data are available on the intracellular level of oxysterols in nerve cells. However, when the oxysterols such as 7 β -OHC are used in vitro at μ M concentrations (50 μ M in the present study), the estimated intracellular levels of this compound are in the range of those found in the frontal and occipital cortex of patients with Alzheimer's disease [12]. Additional experiments were also performed to assess the effect of DMF and MMF in the recovery of 7 β -OHC (50 μ M)-induced

cell death. In these experiments, after 24 h of culture, 158 N cells were incubated with 7 β -OHC for 6 and 10 h before the addition of DMF or MMF, or α -tocopherol. The cells were further incubated with 7 β -OHC in combination with DMF, MMF or α -tocopherol for an additional 14 or 18 h.

2.2. Evaluation of cell morphology by phase contrast microscopy

After treatment of 158 N cells with or without 7 β -OHC (50 μ M) in the presence or absence of DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) or α -tocopherol (400 μ M), cell morphology, cell density and cell detachment (loss of cell adhesion) were evaluated by phase contrast microscopy using an inverted-phase contrast microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Jena, Germany). Images were obtained with a camera (AxioCam ICm 1, Zeiss).

2.3. Quantification of adherent cells with crystal violet staining

Adherent cells were estimated by staining with crystal violet (Sigma-Aldrich). After treatment of 158 N cells, adherent cells were stained with crystal violet for 5 min, rinsed three times with water. Crystal violet was then dissolved with 0.1% sodium citrate (Sigma-Aldrich) in 50% ethanol (Carlo-Erba, Val de Reuil, France) and the optical density per well was read at 570 nm with a microplate reader (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France).

2.4. Evaluation of cell viability with the fluorescein diacetate (FDA) assay

The FDA assay evaluates the ability of living cells to transform the FDA to fluorescein after cleavage by plasma membrane esterases [32]. After 24 h of treatment with or without 7 β -OHC (50 μ M) in the presence or absence of DMF or MMF (25 μ M), 158 N cells were incubated for 5 min at 37 °C with 50 μ M FDA (Sigma-Aldrich), and then lysed with 10 mM of Tris-HCl solution containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma-Aldrich). Fluorescence intensity of fluorescein (λ_{ex} Max: 485 nm, λ_{em} Max: 528 nm) was measured with a TECAN fluorescence microplate reader (Tecan Infinite M 200 Pro, Lyon, France).

2.5. Cell counting of viable cells with trypan blue

Adherent and non-adherent cells were collected by trypsinization and resuspended in culture medium. The total number of viable cells was determined with a Mallasez counting chamber under a light microscope in the presence of trypan blue (v/v), which stains dead cells in blue.

2.6. Evaluation of plasma membrane permeability and cell death by staining with propidium iodide

Propidium iodide (PI) was used to quantify plasma membrane permeability and cell death [33]. At the end of treatment with or without 7 β -OHC (50 μ M) in the presence or absence of DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) or α -tocopherol (400 μ M), 158 N cells (adherent and non-adherent cells) collected by trypsinization, were stained with 1 μ g/mL of PI (5 min at 37 °C) and then immediately analyzed with a Galaxy flow cytometer (Partec, Münster, Germany). Fluorescence was collected through a 590/10 bandpass filter on a Galaxy flow cytometer (Partec): 10,000 cells were acquired. Data were analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo (Tree Star Inc.) software.

2.7. Mitochondrial analysis

2.7.1. Measurement of mitochondrial succinate dehydrogenase activity with the MTT assay

Mitochondrial activity and/or cell proliferation were evaluated with an MTT based assay. Only metabolically active cells can transform MTT

into formazan by mitochondrial succinate dehydrogenase. MTT data was interpreted by comparison with results obtained by cell counting in the presence of trypan blue. The MTT assay was carried as described previously [34]. The absorbance was read at 570 nm with a microplate reader (TECAN Sunrise, Tecan, Lyon, France).

2.7.2. Measurement of mitochondrial transmembrane potential with DiOC6(3)

The mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) was assessed by flow cytometry with the cationic lipophilic dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide DiOC₆(3) (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). At the end of treatment, adherent and non-adherent cells were pooled, incubated with DiOC₆(3) (40 nM, 15 min, 37 °C) and then analyzed with a Galaxy flow cytometer (Partec) [19,35]. The loss of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) is indicated by a decreased of the green fluorescence collected through a 520 \pm 10 nm band pass filter. For each sample, 10,000 cells were acquired and data were analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo (Tree Star Inc.) software.

2.7.3. Measurement of mitochondrial mass with Mitotracker Red

Mitotracker Red (Thermo Fisher Scientific) was used to evaluate mitochondrial mass [36]. Mitotracker Red stock solution was prepared at 1 mM in DMSO. Adherent and non-adherent cells were pooled, washed with DMEM without FBS and then incubated for 30 min at 37 °C in a Mitotracker Red solution (100 nM), which was prepared in DMEM without FBS. The fluorescent signals were collected through a 580 \pm 20 nm band pass filter on a Galaxy flow cytometer (Partec). Data were analyzed with Flomax software (Partec).

2.7.4. Measurement of mitochondrial reactive oxygen species production with MitoSOX-Red

Mitochondrial production of superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) was quantified by flow cytometry after staining with MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific). This positively charged probe accumulates in the mitochondria [36] and exhibits an orange/red fluorescence (λ_{ex} Max = 510 ; λ_{em} Max = 580 nm). MitoSOX Red stock solution was prepared at 5 mM in PBS and used at 5 μ M in the cells. After cell treatments, adherent and non-adherent cells were pooled by trypsinization and incubated with MitoSOX Red for 15 min at 37 °C. The fluorescent signals were collected through a 580 \pm 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).

2.7.5. Measurement of mitochondrial cardiolipins levels

The characterisation and quantification of cardiolipins was conducted by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) on an Agilent 6460 QqQ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total lipid was extracted from cell pellet as described previously by Folch et al. [37], then dissolved in 100 μ L of chloroform/methanol/water mixture. About 1 to 8 μ L of extracted lipid were used for lipidomic analysis. Lipid standards and chemicals of the highest grade available were from Avanti Polar Lipids (Coger SAS, Paris, France) and Sigma-Aldrich, respectively. LC-MS/MS quality grade solvents were from Thermo Fisher Scientific. Extracted lipids for cardiolipin analysis were determined as described previously by Vial et al. [38].

2.8. Mass spectrometry analysis of sterols, fatty acids phospholipids and organic acids

Total lipid was extracted by the Folch's method [37], and fatty acids, sterols and organic acids were quantified as described previously [31,39,40]. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed on a Clarus 600D (Perkin Elmer, USA). The GC was equipped with an Elite column (30 m \times 0.32 mm id \times 0.25 mm film; Perkin Elmer) and injection was performed in splitless mode using

helium (1 mL/min) as carrier gas. The temperature program was as follows: initial temperature of 80 °C was held for 1 min, followed by a linear ramp of 10 °C/min to 220 °C, 20 °C/min to of 280 °C and 5 °C/min up to 290 °C, which was held for 10 min. The mass spectrometer operates in full mass scan or selected ion-monitoring mode. Peak integration was performed manually, and metabolites were quantified from selected-ion monitoring analyses against internal standards using standard curves for all the compounds [39,40]. For phospholipid analysis, total lipid was also extracted by the Folch's method [37]; phosphatidylcholine and sphingomyelin were quantified as described previously [19].

2.9. Evaluation of oxidative stress

2.9.1. Analysis of antioxidant enzymes activities: catalase, glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD)

Catalase (CAT) activity was determined by photometric measurement of H₂O₂ consumption at 240 nm. 158 N cells were trypsinized, washed with PBS, and lysed in 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, Indianapolis, IN, USA) for 30 min on ice. Cell lysates were collected after centrifugation at 12,000g for 20 min at 4 °C. The reaction was initiated by the addition of Tris–HCl (1 M, pH 7.4), and H₂O₂ (400 mM), and the amount of H₂O₂ remaining after 2 min was measured spectrophotometrically (240 nm), using a microplate reader (Tecan Infinite M 200 Pro).

Glutathione peroxidase (GPx) activity was quantified as previously described [41]. 158 N cells were lysed by sonication and centrifuged at 20,000g for 30 min at 4 °C. Cell lysates were incubated for 5 min at 25 °C with 0.1 mM reduced glutathione (GSH) and phosphate buffer saline (50 mM, pH 7.8). The reaction mixture was initiated by addition of H₂O₂ and stopped by the incubation with 1% trichloroacetic acid, for 30 min at 4 °C, and then centrifuged at 1000g for 10 min. The absorbance was measured at 412 nm (Lambda 25 Spectrophotometer, Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France).

Superoxide dismutase (SOD) activity was quantified using the method of Misra and Fridovich [42]. This colorimetric assay, evaluates the ability of SOD to inhibit the Cytochrome c-reduction, induced by superoxide anions produced by xanthine oxidase enzyme [34]. To this end, cell lysates were added to potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 7), and 50 μM xanthine (ref 69-89-6, Sigma-Aldrich). Then 0.01 U of xanthine oxidase (ref 9002-17-9, Sigma-Aldrich) and 5 μM of cytochrome c were added. Absorbance was measured at 550 nm at 20 min intervals for at least five reading. Antioxidant enzyme activities were expressed relative to the protein content determined with the Bradford method.

2.9.2. Measurement of thiol (SH group) levels

Measurement of thiols (SH group) was conducted according to the method of Flaure & Lafon [43]. Cellular lysates were mixed with 5-5'-DiThiols-(2-NitroBenzoic acid) (DTNB), and incubated in dark for 15 min. The absorbance was measured at 415 nm on a Lambda 25 Spectrophotometer (Perkin Elmer).

2.9.3. Measurement of reactive oxygen species (ROS) overproduction with dihydroethidium and dihydrorhodamine 123

ROS overproduction, including superoxide anion (O₂^{•-}), was quantified by flow cytometry after staining with dihydroethidium (DHE; Thermo Fisher Scientific) used at 2 μM. Once in the cell, DHE is rapidly oxidized and exhibits an **orange** fluorescence (λ_{EX} Max = 488 nm; λ_{EM} Max = 575 nm) [44]. ROS overproduction, including hydrogen peroxide (H₂O₂), was also detected with dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Cliniscience, Nanterre, France) used at 6 μM, which is oxidized to Rhodamine 123 (RH123) (λ_{EX} Max = 505 nm; λ_{EM} Max = 529 nm) [45]. After 24 h of treatment, adherent and non-

adherent cells were stained with DHE or DHR123 and incubated at 37 °C for 15 min. Fluorescent signals were collected with 590 ± 20 nm (DHE) and 520 ± 20 nm (DHR 123) band pass filters, respectively. Ten thousand cells were acquired from each sample. Data were analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo (Tree Star Inc.) software.

2.9.4. Measurement of lipid peroxidation products: conjugated dienes (CDs) and malondialdehyde (MDA)

Conjugated dienes (CDs) are the products of polyunsaturated fatty acid peroxidation. The level of CDs was determined with the method of Esterbauer et al. [46]. Malondialdehyde (MDA) is a lipid peroxidation product. It is an alkylating agent capable of reacting with biologic macromolecules. The level of MDA was evaluated as previously described [47]. The experimental procedures on 158 N cells were performed as described previously [31].

2.9.5. Measurement of carbonylated proteins (CPs) level

Similarly than lipids, proteins can also be oxidized. The measurement of carbonylated proteins (CPs) level was conducted as described by Oliver et al. [48]. This method, which is based on the reaction of 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) with CP groups to form protein hydrazones, was realized as previously described [31].

2.10. Cell death characterization

2.10.1. Evaluation of cell death by the measurement of lactate dehydrogenase activity

The culture medium of 158 N cells treated with or without 7β-OHC (50 μM) in combination with DMF (25 μM), MMF (25 μM) or α-tocopherol (400 μM) were collected, and centrifuged to eliminate non adherent cells. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was quantified using a commercial kit (#ab102526, Abcam, Paris, France). A microplate reader (TECAN Infinite M 200 Pro) was used to measure LDH activity at a wavelength of 450 nm in a kinetic mode at 25 °C for 30–60 min.

2.10.2. Characterization of cell death by the evaluation of nuclear morphology after staining with Giemsa or Hoechst 33342

Normal and apoptotic versus necrotic cells can be identified by nuclear morphology evaluated after staining with Giemsa and/or Hoechst 33,342 as described previously [33]. Apoptotic cells were characterized by condensed and/or fragmented nuclei whereas normal cells have regular and round nuclei. A total of 300 cells per sample were counted to determine the percentage of apoptotic cells.

2.10.3. Measurement of lysosomal destabilization with Acridine Orange

Acridine orange (AO) was used to evaluate lysosomal integrity [49] and or to quantify autophagic vesicular (acidic vesicular) formation [50–52]. AO stock solution was prepared at 1 mg/mL in DMSO and used at 1 μg/mL. After 15 min of incubation at 37 °C, cells were washed, and resuspended in PBS for flow cytometry analysis. The fluorescence of AO was collected using a 630 nm longpass filter and measured on a logarithmic scale. Ten thousand cells were acquired on a Galaxy flow cytometer (Partec). Data were analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo (Tree Star Inc.) software.

2.10.4. Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Adherent and floating cells were harvested and lysed for 30 min on ice 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) containing a complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). 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 Aldrich). Seventy micrograms of protein were diluted in a 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 SDS-PAGE gel, and transferred onto a nitrocellulose membrane (Thermo Fischer Scientific). Nonspecific binding sites were blocked by incubation with 5% milk powder in PBST (PBS, 0.1% Tween 20, pH 7.2) and the membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody diluted in 5% milk in PBST. For apoptosis and autophagy analysis, the antibodies used were directed against caspase-3 (Ozyme / Cell Signaling (# 9662) (for detection of the endogenous level of full length caspase-3 (35 kDa) and its large cleavage product (17 kDa)), and LC3-I/II (#L8918, Sigma Aldrich) (detecting LC3-I (18 kDa) and LC3-II (16 kDa)), respectively; all antibodies were rabbit polyclonal

antibodies; they were used at a final dilution of 1/1000. For myelin protein analysis (proteolipid protein (PLP); myelin basic protein (MBP)), PLP expression was determined with a rabbit polyclonal antibody (PLP; Novus, NB10074503) and MBP expression with a mouse monoclonal antibody (MBP; Millipore, MAB381). An antibody directed against β -actin (mouse monoclonal antibody (#A2228, Sigma Aldrich)) was used at a final concentration of 1/10,000. Membranes were washed three times for 5 min, with PBST and incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (for caspase-3, LC3-I/-II, and PLP) diluted at 1/5,000 in 1% milk powder in PBST or

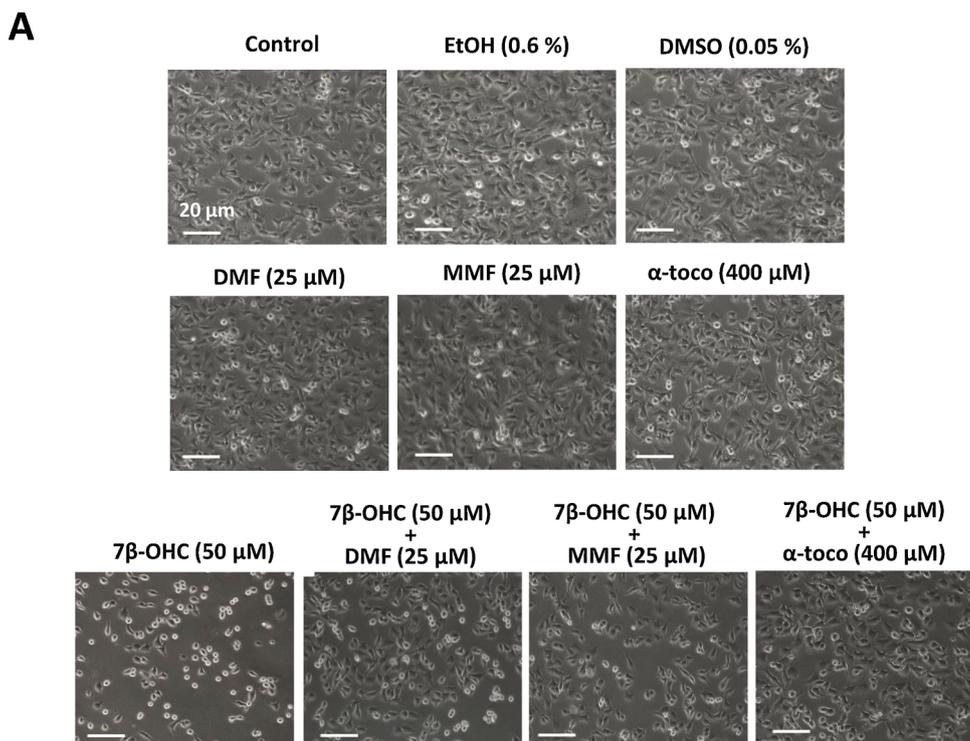
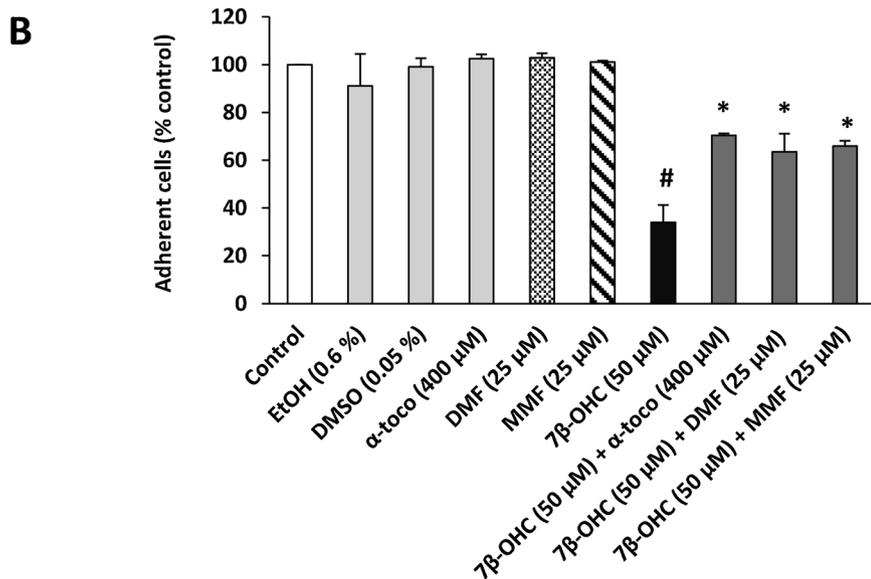


Fig. 1. Effect of 7 β -OHC, dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on cell growth and cell adhesion. 158 N cells were cultured for 24 h with or without 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC, 50 μ M) in the presence or absence of DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) or α -tocopherol (400 μ M). The effects on cell growth and cell adhesion were determined by phase contrast microscopy (A) and crystal violet staining (B). Data shown are mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate.

A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the differences between 7 β -OHC-treated cells and its vehicle (Ethanol (EtOH) 0.6%); # $P \leq 0.05$. Significance of the differences between 7 β -OHC-treated cells, (7 β -OHC + DMF), (7 β -OHC + MMF) or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; * $P \leq 0.05$. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).



anti-mouse antibody against MBP or β -actin, diluted at 1/5,000 in 1% milk powder in PBST. The membranes were then washed and antibody binding revealed using an enhanced chemiluminescence detection kit (Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific) and Chemidoc XRS+ (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Band intensity was determined with Image Lab software (Bio-Rad). The expression of caspase-3 (uncleaved and cleaved) and the ratio LC3-II / LC3-I were calculated with Image Lab software (Bio-Rad). The expression of caspase-3 and the level of cleaved caspase-3 were normalized versus β -actin, and expressed as normalized expression versus control (untreated cells). The ratio LC3-II / LC3-I was calculated for each assay.

2.10.5. Evaluation of the activation of PKA, PKC and MEK / ERK signalling pathways in 7 β -hydroxycholesterol-treated 158 N cells

To evaluate the signalling pathways activated during 7 β -OHC-induced cell death, different inhibitors were used. To this end, 158 N cells were seeded in 24 wells at 60,000 cells / well. After 24 h of culture, 158 N cells were cultured in the presence or absence of 7 β -OHC (50 μ M) with or without different inhibitors such as H89 (20 μ M, Sigma-Aldrich), U73122 (1 μ M, Sigma-Aldrich), chelerythrine (1 μ M, Sigma-Aldrich), and U0126 (20 μ M, Calbiochem, San Diego, CA, USA), which inhibit protein kinase A (PKA), phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC) and MEK, respectively. These inhibitors were chosen for the following reasons: cAMP level leading to PKA activation is increased during 7 β -OHC-induced cell death; a cytosolic Ca^{2+} increase contributing to PLC activation is observed during 7 β -OHC-induced cell

death; and 7 β -OHC-induced cell death is associated with inflammatory cytokines overproduction as well as enhanced expression of integrins via the activation of the nuclear factor κ B (NF- κ B) involving PKC and MEK-ERK signalling pathways [[16] [18]]. These compounds were introduced in culture medium 30 min before the 7 β -OHC. Stock solutions of these inhibitors were prepared as follow: the H89 stock solution was prepared in distilled water at 1 mM, while U0126 (0.1 mM), U73122 (0.1 mM) and chelerythrine (1 mM) stock solutions were prepared in DMSO. At the end of the treatments, an FDA assay was carried out as described previously.

2.11. Quantification of 11 β -hydroxyxteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) and 11 β -hydroxyxteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2) by RT-qPCR

11 β -HSD1 is an intracellular enzyme that catalyses interconversion of cortisone in cortisol [53]. 11 β -HSD1 also catalyses the conversion of 7KC to 7 β -OHC and reciprocally [54,55]. However, the conversion of 7 β -OHC to 7KC can also be catalyzed by 11 β -HSD2 [56]. Total mRNA from 158 N cells (and microglial BV-2 cells used as positive control [20]) were extracted and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total mRNA concentration was measured with TrayCell (Hellma, Paris, France). The purity of nucleic acids was controlled by the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm (ratios of 1.8–2.2 were considered satisfactory). One microgram of total mRNA was used for reverse transcription with the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) according to the following protocol: 5 min at 25 $^{\circ}$ C, 20 min at

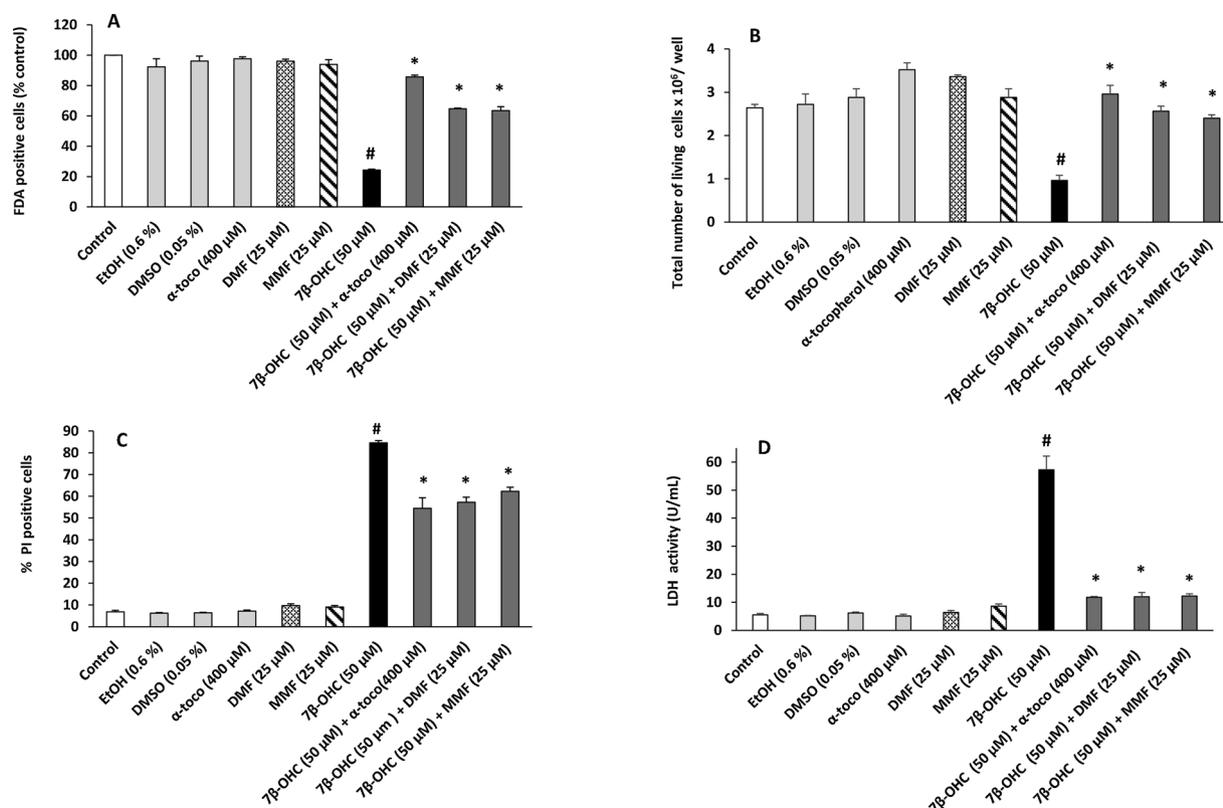


Fig. 2. Effect of 7 β -OHC, dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on cell viability and plasma membrane integrity. 158 N cells were cultured for 24 h with or without 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC, 50 μ M) in the presence or absence of DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) or α -tocopherol (400 μ M). The effect of 7 β -OHC (50 μ M) with or without DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) or α -tocopherol (400 μ M) was determined on cell viability and plasma membrane integrity with complementary criteria: plasma membrane integrity was measured with the FDA assay (A), plasma membrane permeability was measured after staining with propidium iodide (PI) (% of PI positive cells) (B), the impact on cell viability was evaluated by the counting of living cells after staining with trypan blue (dead cells are blue whereas living cells are not) (C) as well as by the measurement LDH activity in the culture medium (D). Data shown are mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the differences between 7 β -OHC-treated cells and its vehicle (Ethanol (EtOH) 0.6%); # $P \leq 0.05$. Significance of the differences between 7 β -OHC-treated cells and (7 β -OHC + DMF)-, (7 β -OHC + MMF)- or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; * $P \leq 0.05$. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

46 °C, 5 min at 95 °C. cDNA was amplified using the FG Power SYBR Green (Thermo Fischer Scientific). All PCR reactions were performed on an Applied Biosystem Step One plus QPCR machine (Life Science Technologies). The primer sequence of *11β-HSD1* was:

- *11β-HSD1*: forward 5'-actcagacctcgtgtctct-3' and reverse 5'-gcttgca-gagtagggagca-3'
- *11β-HSD2*: forward 5'-ggttgacactgggtttggc-3' and reverse 5'-agaa-cacggctgatgctctct-3'

Thermal cycling conditions were as follows: activation of DNA polymerase at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by a melting curve analysis to test for the absence of non-specific products. Gene expression was quantified using cycle to threshold (Ct) values and normalized by the 36B4 reference gene (forward 5'-gcgacctggaagtc-caacta-3' and reverse 5'-atctgcttggagccacat-3'). The quantitative expressions of *11β-HSD1* and *11β-HSD2* were determined as fold induction above the control.

2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statview Software (SAS Institut Inc, NC, USA) using a one way or a two way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's *t*-test. Data shown are the mean ± standard deviation (SD) of two or three independent experiments, usually conducted in triplicate. Data were considered statistically significant at a P-value of 0.05 or less.

3. Results

3.1. Effects of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on the adhesion and morphology of 158 N cells

158 N cells treated with 7β-OHC are a relevant model to evaluate the relationship between oxidative stress, apoptosis and autophagy (oxiaptophagy); to specify the role played by mitochondria, in this process; and to identify natural or synthetic molecules capable of preventing the toxic effects of 7β-OHC associated with major age-related and neurodegenerative diseases. To evaluate the cytoprotective activity

of DMF and MMF on 7β-OHC-treated 158 N cells, these cells were cultured for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM, 24 h) in the presence or absence of DMF and MMF, used at 25 μM. α-tocopherol (400 μM) was chosen as positive cytoprotective control. The effects of DMF and MMF were evaluated compared to untreated cells (control) and vehicle-treated cells (ethanol 0.6% or DMSO 0.05%).

Based on the observations performed by phase contrast microscopy, morphological changes were identified under treatment with 7β-OHC: a pronounced increase of the number of round and floating cells, indicating of loss of cell adhesion and an induction of cell death, was observed; whereas only few non adherent cells were present in control and vehicle-treated cells (Fig. 1A). Of note, when 7β-OHC was associated with DMF, MMF or α-tocopherol, the loss of cell adhesion was prevented and an important decreases of the number of non adherent cells was observed. (Fig. 1A).

The impact of DMF and MMF on cell adhesion was confirmed by the crystal violet assay. Under treatment with 7β-OHC and compared to control and vehicle-treated cells, a significant decrease of adherent cells was revealed (Fig. 1B). When 7β-OHC was associated with DMF and MMF the percentage of adherent cells was significantly increased: DMF and MMF increased by 30–32% the percentage of adherent cells, respectively. This effect is comparable to those observed with α-tocopherol (Fig. 1B).

3.2. Effects of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on plasma membrane integrity and cell viability

The impact of DMF and MMF on 7β-OHC-induced loss of plasma membrane integrity and on cell death induction was determined on 158 N cells. To this end, 158 N cells were stained either with fluoresceine diacetate (FDA), propidium iodide (PI) or trypan blue, and in addition LDH was measured in the culture medium.

After staining with FDA, a significant decrease of FDA positive cells (FDA + cells) was observed in 7β-OHC-treated cells compared to the corresponding vehicle and to the control (Fig. 2A). With the trypan blue assay, a significant decrease of the total number of living cells was simultaneously observed with 7β-OHC. Compared to 7β-OHC, co-treatment with DMF or MMF induced a significant increase of almost 40% of (FDA + cells) as well as an increase of the total number of living cells evaluated after staining with trypan blue. More pronounced

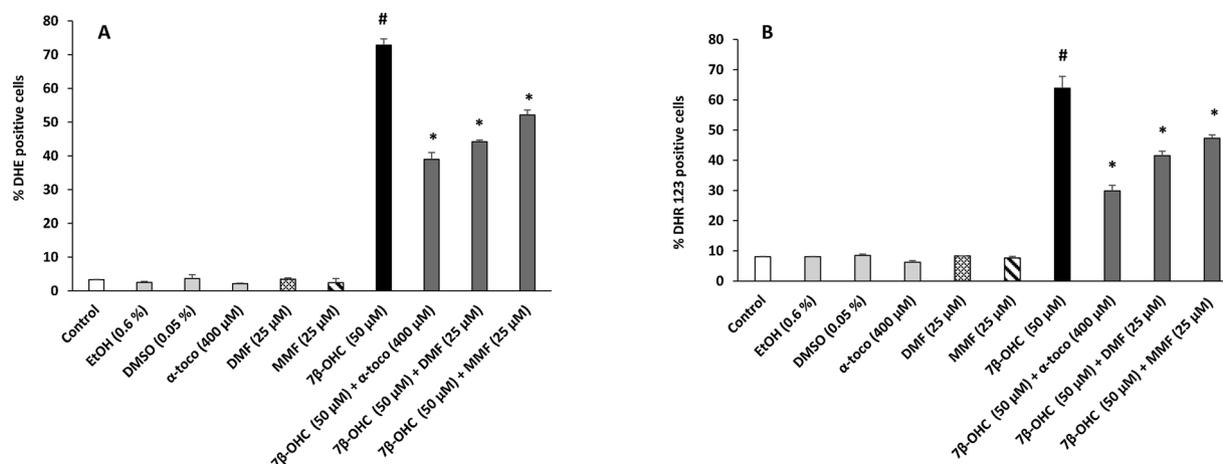


Fig. 3. Effect of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on 7β-hydroxycholesterol-induced reactive oxygen species (ROS) overproduction. 158 N cells were cultured for 24 h with or without 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC; 50 μM) in the presence or absence of DMF (25 μM), MMF (25 μM), or α-tocopherol (400 μM). ROS overproduction was measured by flow cytometry; ROS overproduction, including superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), was evaluated with DHE (% DHE positive cells) (A), and with DHR123, which takes into account hydrogen peroxide (H_2O_2) overproduction (% DHR 123 positive cells) (B). Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the difference between vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%) and 7β-OHC-treated cells; # $p \leq 0.05$ or less. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells and (7β-OHC + DMF)-, (7β-OHC + MMF)- or (7β-OHC + α-tocopherol)-treated cells; * $P \leq 0.05$. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

cytoprotective effects were seen with α -tocopherol (Fig. 2A and B).

After staining with PI, in the presence of 7β -OHC, more than 70% of propidium iodide positive cells (PI +) were observed, indicating an increased permeability of the plasma membrane to PI which stains cells with damaged plasma membranes, often corresponding to dead cells (Fig. 2C). The increase of permeability to PI was strongly attenuated by DMF and MMF (Fig. 2C).

In addition, the quantification of LDH activity in the culture medium, which is a criteria of cell death, showed an increased LDH activity in 7β -OHC-treated cells (Fig. 2D). This increase was strongly attenuated by DMF and MMF; in the culture medium of (7β -OHC + DMF) or (7β -OHC + MMF), the LDH activity was only slightly higher than in control and vehicle-treated cells (Fig. 2D).

Of note, the ability of DMF and MMF to prevent the decrease of FDA + cells and of living cells, as well as the increase of PI + cells was similar to that observed with α -tocopherol (Fig. 2).

3.3. Effects of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on 7β -hydroxycholesterol-induced oxidative stress

To determine the ability of DMF and MMF to prevent 7β -OHC-induced oxidative stress, we studied the impact of these fumarate esters on the production of reactive oxygen species (ROS: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2), antioxidant enzyme (SOD, CAT, GPx) activities, and macromolecule oxidation products (MDA, carbonylated proteins) as well as on the level of SH-groups and conjugated dienes (CDs).

The measurement of ROS production was evaluated by flow cytometry after staining with DHE and DHR123. The highest percentage of DHE and DHR123 positive cells was observed when 158 N cells were exposed to 7β -OHC compared to control and vehicle-treated cells. This

increase was significantly inhibited when 7β -OHC was associated with DMF and MMF (Fig. 3). The most important attenuation of 7β -OHC-induced ROS overproduction was observed with α -tocopherol used as positive control anti-oxidant molecule (Fig. 3).

Under treatment with 7β -OHC, a significant increase of GPx, SOD, and CAT activities was observed compared to control and vehicle-treated cells (Fig. 4A–C). Compared to 7β -OHC-treated cells, GPx, SOD and CAT activities were significantly increased when 7β -OHC was associated with DMF or MMF, and the most important increase was observed with DMF (Fig. 4A–C). In the presence of α -tocopherol, the effects were similar to those of DMF and MMF. On the other hand, a significant decrease in the level of SH-groups was observed in 7β -OHC-treated cells compared to control and vehicle-treated cells (Fig. 4D). Of note, the level of SH-groups was almost normalized, and in the range of that measured in control and vehicle-treated cells, when 7β -OHC was associated with DMF, MMF and α -tocopherol (Fig. 4D). With biochemical colorimetric methods of analysis, allowing evaluation of lipid and protein oxidation products, a significant increase of CDs, MDA, and carbonylated proteins levels (CPs) which are biomarkers of lipid and protein oxidation, was observed when 158 N cells were exposed to 7β -OHC compared to control and vehicle-treated cells (Fig. 5A–C). Interestingly, this increase was significantly attenuated when 7β -OHC was associated with DMF and MMF (Fig. 5A–C). Similar effects than DMF and MMF were found in the presence of α -tocopherol (Fig. 5).

3.4. Effects of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on 7β -hydroxycholesterol-induced mitochondrial damage and peroxisomal changes

As mitochondrial damage is induced by 7β -OHC in 158 N cells, the impact of DMF and MMF at the mitochondrial level was studied. To this

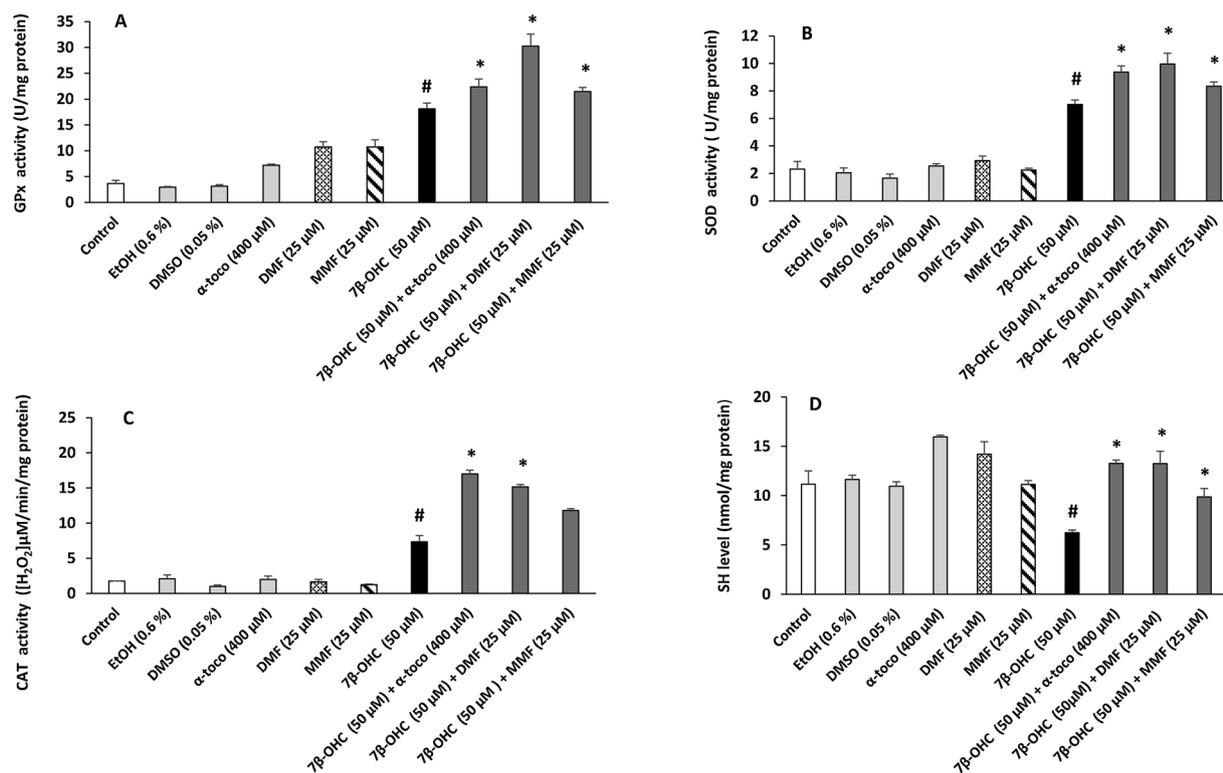


Fig. 4. Effect of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on 7β -hydroxycholesterol-induced oxidative stress. 158 N cells were cultured for 24 h with or without 7β -hydroxycholesterol (7β -OHC, 50 μ M) in the presence or absence of DMF (25 μ M), MMF (25 μ M) or α -tocopherol (400 μ M). The effects on antioxidant enzyme activities were determined by colorimetric assays with the measurement of glutathione peroxidase (GPx) activity (A) superoxide dismutase (SOD) activity (B) and catalase (CAT) activity (C) as well as by the measurement of thiol-SH group (D). Data shown are mean \pm SD of three independent experiments conducted in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the differences between 7β -OHC-treated cells and its vehicle (Ethanol (EtOH) 0.6%); # $P \leq 0.05$ or less. Significance of the differences between 7β -OHC-treated cells, (7β -OHC + DMF), (7β -OHC + MMF) or (7β -OHC + α -toco)-treated cells; * $P \leq 0.05$ or less. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

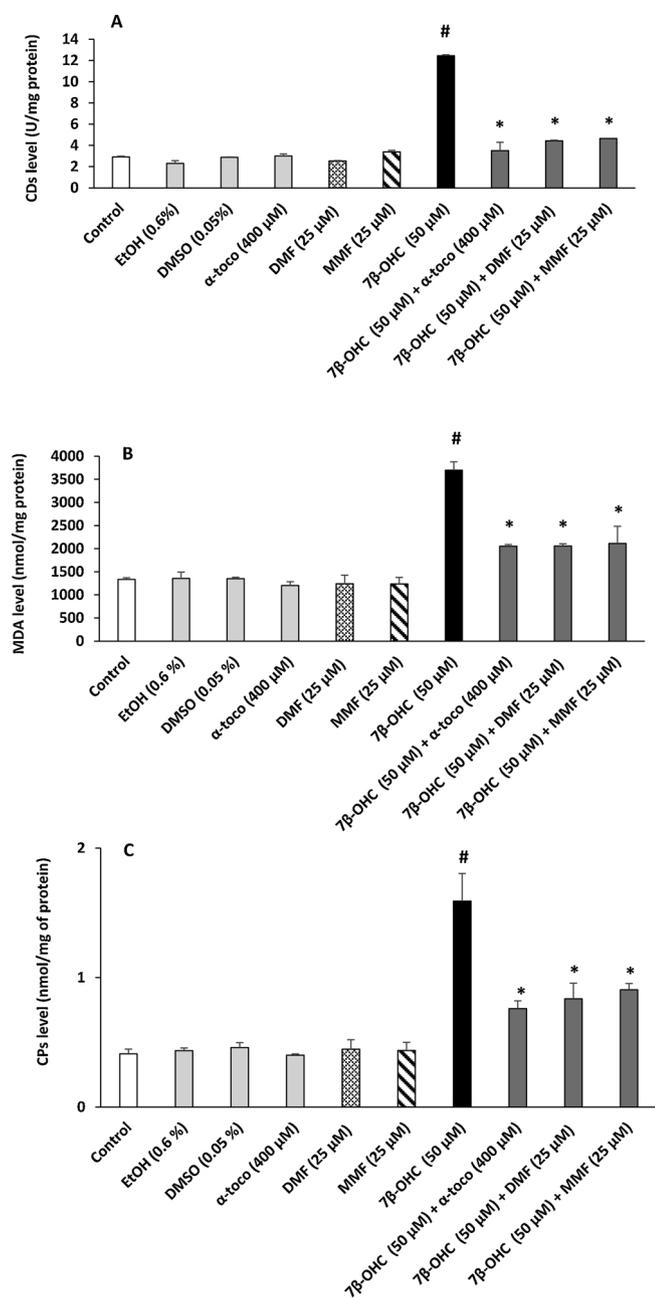


Fig. 5. Effect of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on 7β-hydroxycholesterol-induced lipid peroxidation and carbonylated protein formation. 158 N cells were cultured for 24 h with or without 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC, 50 μM) in the presence or absence of DMF (25 μM), MMF (25 μM) or α-tocopherol (400 μM). The effects on lipid peroxidation product formation were evaluated by the measurement of CDs (A), and MDA (B) levels. The impact on protein oxidation was evaluated by the measurement of carbonylated protein (CPs) levels (C). Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells and its vehicle (Ethanol (EtOH) 0.6%); # $P \leq 0.05$ or less. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells, (7β-OHC + DMF)-, (7β-OHC + MMF) or (7β-OHC + α-toco)-treated cells; * $P \leq 0.05$ or less. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

end, succinate dehydrogenase activity, transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$), mitochondrial mass, superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) production, and cardiolipins levels were evaluated.

The MTT assay, used to measure succinate dehydrogenase activity,

showed that the ratio [(% MTT positive cells in the assay) / (% MTT positive cells in the control)] was significantly reduced with 7β-OHC compared to control and ethanol-treated cells (Fig. 6A). When 7β-OHC was associated with DMF and MMF this ratio was significantly increased. A similar effect was observed with α-tocopherol. These data showed that DMF and its main metabolite MMF prevent the decrease of succinate dehydrogenase activity which participates in both the TCA cycle and the electron transport chain at the mitochondrial level. These data lead us to examine the effect of DMF and MMF on 7β-OHC-induced loss of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) on 158 N cells by staining with DiOC₆(3). A high value (33%) of DiOC₆(3) negative cells, indicating a decrease in $\Delta\Psi_m$ (cells with depolarized mitochondria) was detected under treatment with 7β-OHC (Fig. 6B). The percentage of DiOC₆(3) negative cells was strongly reduced when 158 N cells were co-treated with DMF, MMF or α-tocopherol (Fig. 6B). Another fluorochrome (MitoTracker Red) was used to evaluate the mitochondrial mass. Upon staining with Mitotracker Red, an increase in the mean fluorescence intensity (MFI) of this dye was observed when the cells were treated with 7β-OHC compared to control and vehicle-treated cells (Fig. 6C). This increase was significantly inhibited by DMF and MMF, as well as by α-tocopherol (Fig. 6C).

Due to the important role played by cardiolipins, which are essential mitochondrial phospholipids for electron transport, oxidative phosphorylation and energy production [57,58], it was important to determine the effect of 7β-OHC on the cardiolipins content. No difference in cardiolipins content was observed between untreated cells (control) and vehicle-treated cells (Fig. 6D). The highest levels of cardiolipins was found with DMF and MMF (Fig. 6D). Total cardiolipins content was significantly decreased in 7β-OHC-treated cells compared to control and vehicles-treated cells (Fig. 6D), When 7β-OHC was associated with DMF and MMF, this decrease was counteracted and the cardiolipin values observed were in the range of that observed in control and vehicle-treated cells (Fig. 6D). The same observation was made with α-tocopherol (Fig. 6D).

In addition, flow cytometric analyses were performed with MitoSOX allowing the measurement of $O_2^{\bullet-}$ production at the mitochondrial level (MitoSOX positive cells). In cells incubated with 7β-OHC compared control and to vehicle-treated cells an overproduction of $O_2^{\bullet-}$ was observed. This overproduction of $O_2^{\bullet-}$ was counteracted by DMF, MMF and α-tocopherol (Fig. 6E).

As mitochondria and peroxisome are tightly connected organelles [59], the effects of 7β-OHC on the peroxisome was evaluated by transmission electron microscopy (Fig. 7). Whereas round peroxisomes were mainly observed in control cells, several peroxisomes with irregular shapes, which were often larger or smaller than in the control, were detected in 7β-OHC-treated cells (Fig. 7). Several mitochondria, which were smaller than in control cells, were also frequently observed in 7β-OHC-treated cells (Fig. 7). Of note, these modifications of the peroxisomal and mitochondrial morphologies were prevented when 7β-OHC was associated with DMF (Fig. 7).

Altogether, our data demonstrate that 7β-OHC induced several types of mitochondrial damage, and that DMF and MMF have strong cytoprotective effects at the mitochondrial level.

3.5. Impact of 7β-hydroxycholesterol, dimethyl fumarate, and monomethyl fumarate on cell metabolism

3.5.1. Effects of 7β-hydroxycholesterol, dimethyl fumarate, and monomethyl fumarate on glycolysis and TCA cycle

TCA cycle, also known as Krebs cycle, is the metabolic pathway used to release stored energy through the oxidation of acetyl-CoA, to provide the reducing agent NADH and precursors of certain amino acids. This cycle takes place in the matrix of the mitochondria. Thus, we considered pertinent to understand the impact of 7β-OHC, DMF and MMF on 7β-OHC associated with DMF or MMF on the TCA cycle. Lactate dehydrogenase (LDH) converts two pyruvates into 2 lactate molecules,

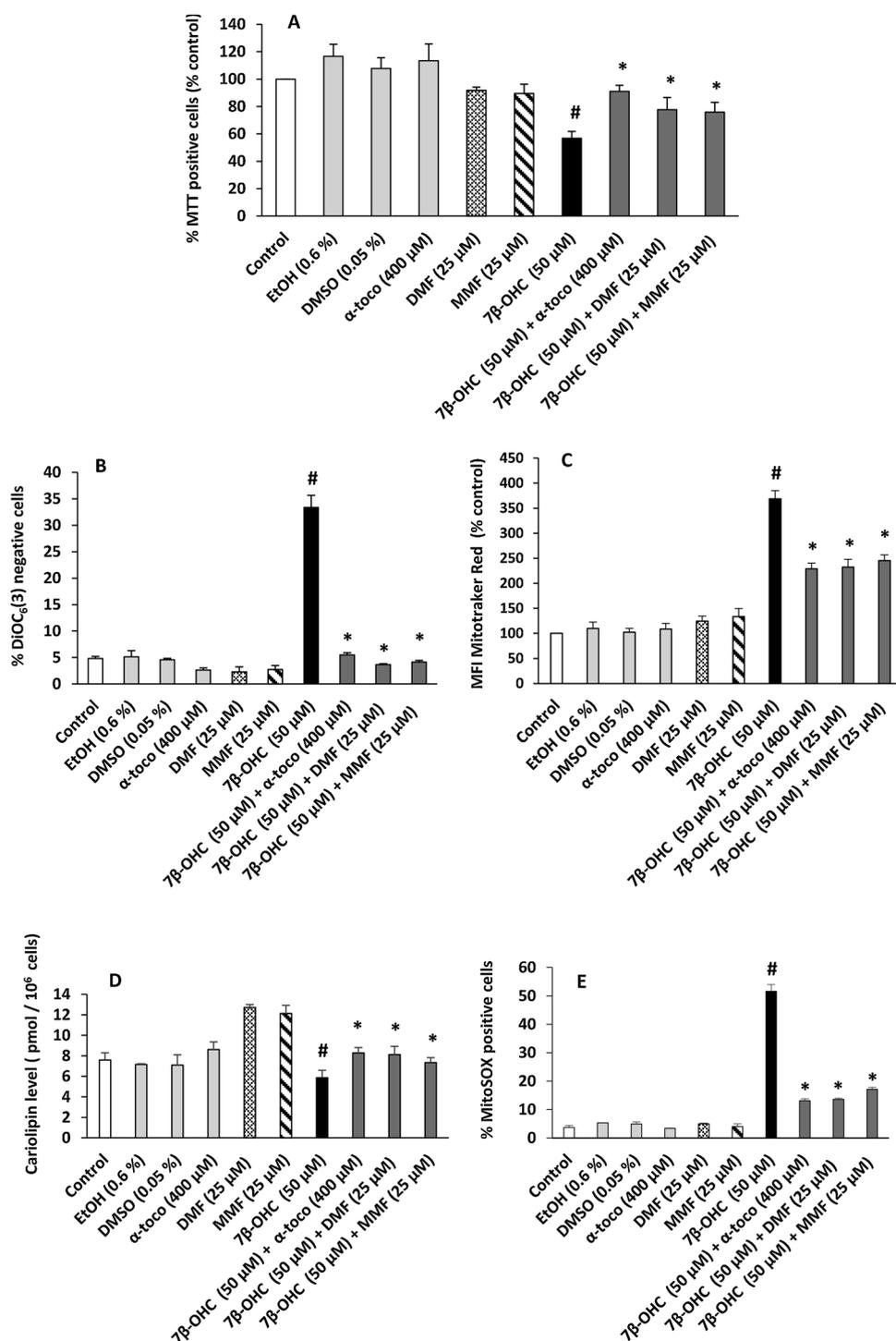


Fig. 6. Evaluation of the effect of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on 7β-hydroxycholesterol-induced mitochondrial damage. 158N cells were cultured for 24 h with or without 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC, 50 μM) in the presence or absence of DMF (25 μM), MMF (25 μM) or α-tocopherol (400 μM). Under these conditions, the effects on succinate dehydrogenase activity were evaluated with the MTT test (A). The transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) was measured by flow cytometry after staining with DiOC₆(3) (B). The mitochondrial mass was determined by flow cytometry after staining with MitoTracker Red (C). Cardiolipin levels were determined by GC-MS (D) and mitochondrial superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) production was evaluated by flow cytometry after staining with MitoSOX (E). Data shown are mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells and its vehicle (Ethanol (EtOH) 0.6%); # $P \leq 0.05$ or less. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells, (7β-OHC + DMF), (7β-OHC + MMF)- or (7β-OHC + α-toco)-treated cells; * $P \leq 0.05$ or less. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

using NADH as a coenzyme so that the cell can continue to perform glycolysis by regenerating NAD^+ . The effect of 7β-OHC, DMF, MMF and 7β-OHC associated with DMF or MMF on these metabolic pathways was also evaluated. When exposed to 7β-OHC, a significant increase in lactic acid (lactate) levels was observed (220.59 ± 2.50 ng/million cells) compared to vehicle - treated cells (EtOH 0.6%: 122.64 ± 3.53 ng/million cells); this increase in lactic acid was significantly reduced, under treatment with DMF and MMF in the presence of 7β-OHC (Table 1). However, a marked and significant decreases in pyruvic acid (pyruvate), succinic acid (succinate), fumaric acid (fumarate), malic acid (malate) and citric acid (citrate) levels were observed in 7β-OHC-treated 158N cells compared to vehicle; this decrease

was attenuated when the cells were simultaneously treated with 7β-OHC and DMF or MMF (Table 1).

3.5.2. Effects of 7β-hydroxycholesterol, dimethyl fumarate, and monomethyl fumarate on cholesterol metabolism

In the presence of 7β-OHC, the cholesterol level was significantly decreased compared to vehicle-treated cells (Table 2). This reduction of the cholesterol level was still observed when the cells were simultaneously treated with 7β-OHC and MMF (Table 2). Compared to 7β-OHC-treated cells, the cholesterol level was significantly increased, when the cells were co-treated with 7β-OHC and DMF (Table 2). When cholesterol precursors were measured after treatment with 7β-OHC,

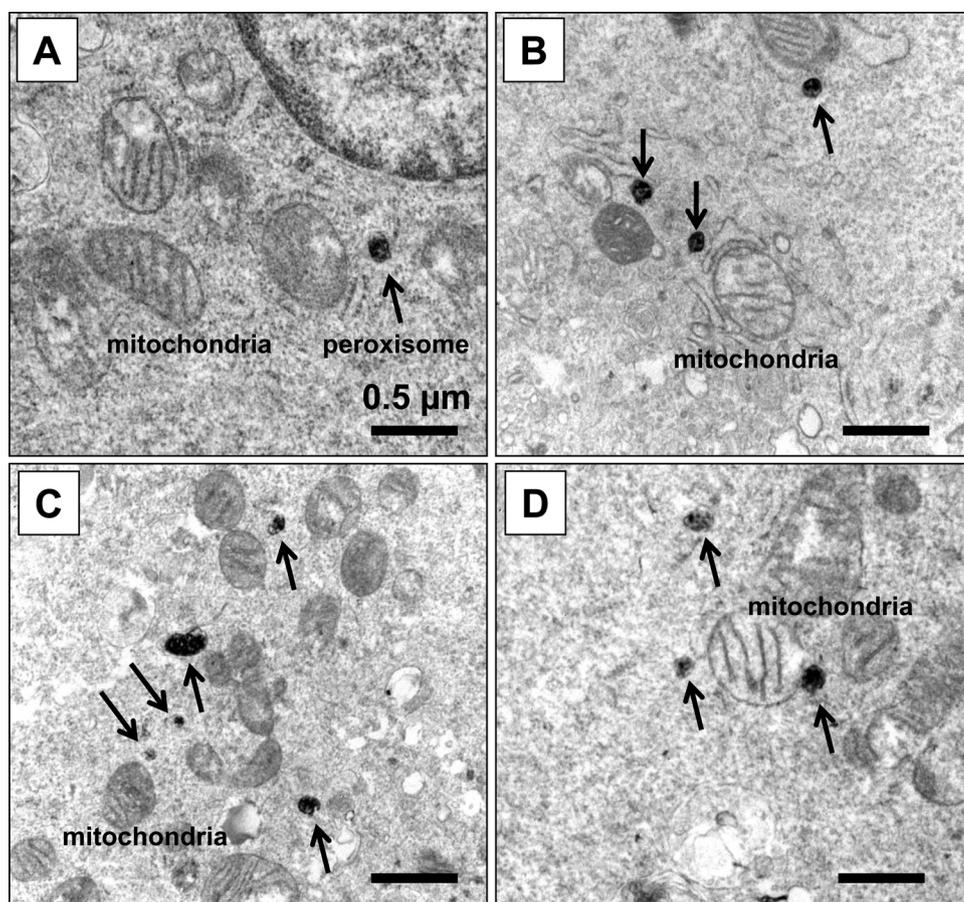


Fig. 7. Ultrastructural characterization by transmission electron microscopy of mitochondria and peroxisomes in 158N murine oligodendrocytes incubated with or without 7 β -hydroxycholesterol in the presence or absence of dimethyl fumarate (DMF). 158N cells were cultured for 24 h with or without 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC, 50 μ M) in the presence or absence of DMF (25 μ M). Ultrastructural aspects of mitochondria and peroxisomes in untreated (control) (A), DMF (B), 7 β -OHC (C), and (7 β -OHC + DMF) (D)-treated 158N cells. In the presence of 7 β -OHC, several peroxisomes and mitochondria smaller than in the control were observed (C); these differences were no longer observed when 7 β -OHC was associated with DMF (D). One experiment was performed.

Table 1

Profile of organic acids in 158N cells exposed to 7 β -hydroxycholesterol with or without dimethyl fumarate (DMF) or monomethyl fumarate (MMF).

	Lactic acid	Pyruvic acid	Succinic acid	Fumaric acid	Malic acid	Citric acid
Control	126.98 \pm 7.99	15.27 \pm 0.36	7.55 \pm 0.11	1.33 \pm 0.04	3.69 \pm 0.10	4.79 \pm 0.20
EtOH (0.6%)	122.64 \pm 3.53	14.13 \pm 0.50	6.82 \pm 0.05	1.22 \pm 0.06	2.54 \pm 0.08	3.84 \pm 0.11
DMSO (0.05%)	125.90 \pm 12.62	13.43 \pm 0.78	6.88 \pm 0.11	1.30 \pm 0.03	2.36 \pm 0.03	4.60 \pm 0.06
DMF (25 μM)	97.30 \pm 1.51	16.43 \pm 1.48	6.97 \pm 0.73	2.66 \pm 0.21	3.88 \pm 0.22	5.89 \pm 0.16
MMF (25 μM)	104.84 \pm 3.45	15.46 \pm 0.01	7.18 \pm 0.11	2.72 \pm 0.05	4.93 \pm 0.17	6.34 \pm 0.04
7β-OHC (50 μM)	220.59 \pm 2.50 #	8.11 \pm 0.06 #	5.46 \pm 0.01 #	0.93 \pm 0.02 #	1.75 \pm 0.08 #	2.80 \pm 0.25 #
7β-OHC (50 μM) + DMF (25 μM)	147.63 \pm 6.46*	15.64 \pm 0.87*	7.41 \pm 0.58*	1.35 \pm 0.16*	4.67 \pm 0.11*	3.60 \pm 0.05*
7β-OHC (50 μM) + MMF (25 μM)	120.84 \pm 4.03*	12.55 \pm 1.35*	11.48 \pm 0.45*	1.78 \pm 0.00*	3.59 \pm 0.08*	4.07 \pm 0.08*

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significant difference between vehicle (EtOH 0.6%) and 7 β -OHC-treated cells is indicated by #; *P* < 0.05; significant difference between 7 β -OHC and (7 β -OHC + DMF) or (7 β -OHC + MMF) is indicated by *; *P* < 0.05.

No significant differences are observed between Control, EtOH and DMSO. 7 β -hydroxycholesterol: 7 β -OHC.

Sghaier R et al.

significant reduced levels of lathosterol, desmosterol, and lanosterol were observed compared to control and vehicle (EtOH 0.6%)-treated cells (Table 2). While lanosterol level was normalized with DMF and MMF, a most important decrease of other cholesterol precursors levels was detected (Table 2). In addition, cholesterol auto-oxidation products (triol, ketocholesterol (7KC) and 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC)) were measured in the same conditions. In 158N cells treated with 7 β -OHC, important levels of this oxysterol were found supporting an accumulation and/or an interaction of this compounds with the cells (Table 2). After 24 h of incubation with 7 β -OHC, the levels of this oxysterol present in the cells (when 158N cells were only cultured in the presence of 7 β -OHC) represents 1% of the quantity of 7 β -OHC introduced in the culture medium (Table 2). This accumulation is lower than those reported with 7KC and 27-hydroxycholesterol which

represents 10–20% of the quantity of oxysterols initially introduced in the culture medium [3]. It is noteworthy that in the plasma of X-ALD patients, the concentration of 7 β -OHC can reach 2.5 μ M [20]. In the presence of 7 β -OHC, in agreement with the ability of 7 β -OHC to stimulate the oxidative stress, higher levels of triol and 7KC were also observed compared to control cells and vehicle-treated cells; this increase was significantly reduced when 7 β -OHC was associated with DMF or MMF (Table 2). Despite the levels of triol and 7KC being significantly reduced, when 7 β -OHC was cultured in the presence of DMF or MMF, the levels of 7 β -OHC remained increased, and were even higher than in cells only treated with 7 β -OHC (Table 2). Therefore, DMF and MMF inhibit the signalling pathways leading to 7 β -OHC-induced cytotoxicity without preventing the cellular accumulation of this oxysterol. In 158N cells, the Ct value of the gene HSD11B1 encoding

Table 2

Profiles of cholesterol, cholesterol precursors (lathosterol, desmosterol, lanosterol) and oxysterols (triol, 7-ketocholesterol, 7 β -hydroxycholesterol) in 158 N cells exposed to 7 β -hydroxycholesterol with or without dimethyl fumarate (DMF) or monomethyl fumarate (MMF).

	Cholesterol	Cholesterol precursors			Oxysterols		
		Lathosterol	Desmosterol	Lanosterol	Triol	7KC	7 β -OHC
Control	2.84 \pm 0.01	14.80 \pm 0.15	12.93 \pm 0.37	0.63 \pm 0.00	0.17 \pm 0.01	0.56 \pm 0.02	0.62 \pm 0.00
EtOH (0.6%)	2.86 \pm 0.02	14.08 \pm 0.02	12.08 \pm 0.13	0.58 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	0.59 \pm 0.00	0.66 \pm 0.04
DMSO (0.05%)	2.64 \pm 0.03	13.64 \pm 0.36	10.01 \pm 0.42	0.45 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	0.42 \pm 0.06	0.56 \pm 0.02
DMF (25 μ M)	2.72 \pm 0.11	14.93 \pm 0.19	9.58 \pm 0.26	0.65 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02	0.51 \pm 0.00	0.62 \pm 0.07
MMF (25 μ M)	2.83 \pm 0.10	17.10 \pm 0.94	10.07 \pm 0.50	0.69 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.60 \pm 0.09	2.94 \pm 0.07
7 β -OHC (50 μ M)	2.17 \pm 0.13 #	8.53 \pm 0.17 #	6.46 \pm 0.07 #	0.23 \pm 0.01 #	1.89 \pm 0.16 #	10.88 \pm 0.34 #	246.70 \pm 0.59 #
7 β -OHC (50 μ M) + DMF (25 μ M)	2.56 \pm 0.05 *	5.33 \pm 0.14 *	6.20 \pm 0.07*	0.66 \pm 0.03 *	0.86 \pm 0.01 *	5.72 \pm 0.39 *	470.12 \pm 9.95 *
7 β -OHC (50 μ M) + MMF (25 μ M)	2.16 \pm 0.12	6.72 \pm 0.34 *	5.08 \pm 0.21 *	0.32 \pm 0.00*	0.88 \pm 0.29 *	9.33 \pm 0.47 *	426.67 \pm 6.19 *

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significant difference between vehicle (EtOH 0.6%) and 7 β -OHC-treated cells is indicated by #; *P* < 0.05; significant difference between 7 β -OHC and (7 β -OHC + DMF) or (7 β -OHC + MMF) is indicated by *; *P* < 0.05. No significant differences are observed between Control, EtOH and DMSO.

β -hydroxycholesterol: 7 β -OHC.

Sghaier R et al.

for the enzyme 11 β -HSD1 (Ct_(HSD11B1) = 36.5 \pm 1.0) was high whereas the Ct value of the reference gene 36B4 was low (Ct_(36B4) = 18.4 \pm 0.1) supporting a good expression of 36B4 in 158 N cells (Supplementary Fig. 3). In 158 N cells, the gene HSD11B1 encoding for the enzyme 11 β -HSD1 can be considered as non expressed since multiple peaks were observed on the melt curve demonstrating a non specific amplification (Supplementary Fig. 3). However, on microglial BV-2 cells, used as positive control, the Ct value of the gene HSD11B1 encoding for 11 β -HSD1 was lower (Ct_(HSD11B1) = 30.2 \pm 0.6) than in 158 N cells (Ct_(HSD11B1) = 36.5 \pm 1.0); as a melt curve with homogeneous peaks was observed, this supports that BV-2 express the gene of 11 β -HSD1 and that the primer sequences used are appropriated (Supplementary Fig. 3). According to these data, our results do not support a conversion of 7KC in 7 β -OHC, and reciprocally via 11 β -HSD1, in 158 N cells. Since 7 β -OHC can be converted to 7KC by the enzyme 11 β -HSD2, the expression of the HSD11B2 gene encoding this enzyme was quantified on both 158 N (Ct = 26.0 \pm 0.6) and BV-2 (Ct = 29.3 \pm 0.3) (Supplementary Fig. 4). The Ct values and the appearance of the melt curves are in favor of an expression of the HSD11B2 gene in these cells. This suggests that in 158 N cells, 7 β -OHC could be converted to 7KC, especially when the cells are co-treated with 7 β -OHC associated with DMF or MMF. The expression of the HSD11B2 gene, which is decreased in the presence of 7 β -OHC, evokes that of the control when the cells are cultured in the presence of 7 β -OHC associated with DMF or MMF (Supplementary Fig. 4).

3.5.3. Effects of 7 β -hydroxycholesterol, dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on the cellular fatty acid profile

In order to identify the effects of 7 β -OHC, DMF, MMF, and 7 β -OHC with or without DMF and MMF on fatty acid metabolism, fatty acid profiles were determined.

As shown in Table 3, 7 β -OHC induced a significant decrease in the total long chain saturated fatty acids (Σ SFA (C < 22)) compared to vehicle-treated cells. A significant decrease in myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), and arachidic acid (C20:0) levels was observed in 7 β -OHC-treated 158 N cells compared to the vehicle-treated cells. However, under treatment with 7 β -OHC, the total very long chain saturated fatty acid (Σ VLC SFA C \geq 22) level was 3 times higher than in the vehicle treated cells. Thus, behenic acid (C22:0), tetracosanoic acid (C24:0), and cerotic acid (C26:0) levels were significantly enhanced in 7 β -OHC-treated cells compared to vehicle. When 158 N cells were co-treated with MMF and 7 β -OHC, all SFA levels were in the range of untreated and vehicle-treated cells (Table 3). However, when 158 N cells were co-treated with DMF and 7 β -OHC, only C18:0, C22:0 and C26:0 levels were normalized (Table 3).

As shown in Table 4, 7 β -OHC also induced a significant decrease in the total mono-unsaturated fatty acid (Σ MUFA) compared to vehicle-treated cells. Thus, myristoleic acid (C14:1 n-5), sapienic acid (C16:1 n-10), palmitoleic acid (C16:1 n-7), eicosenoic acid (C20:1 n-9), and eicosenoic acid (C20:1 n-7) levels were significantly decreased in 158 N treated with 7 β -OHC compared to vehicle-treated cells; however, under the same conditions, very long chain monounsaturated fatty acids such as nervonic acid (C24:1 n-9) and hexacosanoic acid (C26:1 n-9) levels were enhanced (Table 4). MMF and DMF had almost similar effects on the MUFA profile when used 2 h prior the incubation with 7 β -OHC. In fact, all the MUFA levels came closer to those of the untreated cells or vehicle treated cells, with the exception of C16:1 n-10 or n-9 and C16:1 n-7, of which levels were higher even than control and vehicle treated cells. Interestingly when added alone, these molecules (DMF and MMF) and in particular MMF were able to significantly enhance levels of several MUFA compared to the corresponding vehicle.

As shown in Table 5, 7 β -OHC induced a significant decrease of all polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels compared to vehicle-treated cells; thus, total PUFA content was reduced by about half in the cells. When DMF and MMF were used alone on 158 N cells, linoleic acid (C18:2 n-6), arachidonic acid (AA; C20:4 n-6), and docosahexanoic acid (DHA; C22:6 n-3) were enhanced, compared to corresponding to the vehicle. Co-treatment of 7 β -OHC with DMF and MMF induced a correction of all PUFA levels which are in the range of vehicle treated cells (Table 5), with the exception of (C20:4 n-6) and eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5 n-3), which remained lower than in vehicle- and 7 β -OHC-treated cells.

Furthermore, Δ 4-desaturase (C22:6 n-3/C22:5 n-3), Δ 8-desaturase (C20:3 n-6 /C20:2 n-6), Δ 9-desaturase (C18:1 n-9/ C18:0), and longase activity index (C22:5 n-3 /C20:5 n-3) activity index were significantly increased in 7 β -OHC-treated cells (Table 5). Compared to 7 β -OHC, these indices were significantly reduced when the cells were co-treated with 7 β -OHC associated with DMF and MMF. The elongase (C18:0/C16:0) activity index was higher in 7 β -OHC cells comparatively to (7 β -OHC + DMF); however, it was reduced in (7 β -OHC + MMF) compared to 7 β -OHC (Table 5).

Our results demonstrated the impact of 7 β -OHC on fatty acid metabolism, which could be at least in part, due to mitochondrial damage, since this organelle plays important roles in fatty acid anabolism and catabolism. Our data also demonstrate that DMF and MMF prevent fatty acid metabolism disorders in 7 β -OHC-treated cells.

3.5.4. Effects of 7 β -hydroxycholesterol, dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on sphingomyelin and phosphatidylcholine content

The effects of 7 β -OHC, DMF, MMF, and 7 β -OHC with or without

Table 3
Profile of saturated fatty acids in 158 N cells exposed to 7β-hydroxycholesterol with or without dimethyl fumarate (DMF) or monomethyl fumarate (MMF).

	Control	EtOH (0.6%)	DMSO (0.05%)	DMF (25 μM)	MMF (25 μM)	7β-OHC (50 μM)	7β-OHC (50 μM) + DMF (25 μM)	7β-OHC (50 μM) + MMF (25 μM)
C14:0	109.48 ± 0.30	101.56 ± 0.86	79.45 ± 0.46	98.99 ± 3.83 ¥	99.55 ± 5.57 ¥	81.82 ± 0.36 #	49.48 ± 4.56 *	85.74 ± 5.30
C16:0	2360.32 ± 25.67	2300.14 ± 40.89	2247.38 ± 8.37	1934.86 ± 20.36 ¥	2320.20 ± 45.94 ¥	1727.54 ± 29.59 #	1650.60 ± 14.00 *	2553.74 ± 23.91 *
C18:0	1240.25 ± 21.80	1169.50 ± 22.09	941.92 ± 10.14	875.63 ± 22.65 ¥	1338.75 ± 7.60 ¥	722.54 ± 16.83 #	805.03 ± 6.67 *	829.81 ± 2.14 *
C20:0	29.40 ± 2.49	24.36 ± 1.17	25.19 ± 1.26	20.04 ± 0.64 ¥	19.90 ± 0.05 ¥	10.83 ± 1.14 #	8.61 ± 1.03 *	13.59 ± 0.25 *
C22:0	4.61 ± 0.54	4.49 ± 0.18	4.69 ± 0.01	4.38 ± 0.12 ¥	4.79 ± 0.53	8.19 ± 0.26 #	5.97 ± 0.06 *	6.68 ± 0.49 *
C24:0	8.32 ± 0.31	8.27 ± 0.18	7.68 ± 0.03	8.61 ± 0.36 ¥	11.10 ± 3.24 ¥	24.58 ± 0.84 #	7.52 ± 0.70 *	10.22 ± 0.58 *
C26:0	1.47 ± 0.13	1.51 ± 0.28	1.56 ± 0.04	3.78 ± 0.24 ¥	2.54 ± 0.07 ¥	11.85 ± 0.91 #	5.79 ± 0.45 *	7.96 ± 0.34 *
ΣSFA (C < 22)	3739.44 ± 44.69	3595.56 ± 16.77	3293.94 ± 0.05	2929.52 ± 2.18 ¥	3778.41 ± 59.16 ¥	2542.72 ± 14.26 #	2513.71 ± 26.26	3482.88 ± 31.60 *
ΣVLCSFA C ≥ 22)	14.40 ± 0.98	14.27 ± 0.08	13.93 ± 0.07	16.78 ± 0.71 ¥	18.42 ± 3.85 ¥	44.62 ± 2.01 #	19.28 ± 1.09 *	24.87 ± 1.42 *
Σtotal SFA	3753.84 ± 43.70	3609.83 ± 16.69	3307.87 ± 0.02	2946.30 ± 1.47 ¥	3796.83 ± 63.00 ¥	2587.34 ± 12.25 #	2533.00 ± 27.35 *	3507.75 ± 30.18 *

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean ± SD of three independent experiments. A two way ANOVA followed by a Student's t-test was realized. Significant difference between vehicle (EtOH 0.6%) and 7β-OHC-treated cells is indicated by #; P < 0.05; significant difference between 7β-OHC and (7β-OHC + DMF) or (7β-OHC + MMF) is indicated by *; P < 0.05; significant difference between vehicle (DMSO 0.05%) and DMF or MMF treated cells is indicated by ¥; P < 0.05. No significant differences are observed between Control, EtOH and DMSO.

Σ SFA: Sum of saturated fatty acids; Σ VLCSFA: Sum of very long chain saturated fatty acids; 7β-OHC: 7β-hydroxycholesterol.

Sghaier R et al.

Table 4
Profile of mono-unsaturated fatty acids profile in 158 N cells exposed to 7β-hydroxycholesterol with or without dimethyl fumarate (DMF) and monomethyl fumarate (MMF).

	Control	EtOH (0.6%)	DMSO (0.05%)	DMF (25 μM)	MMF (25 μM)	7β-OHC (50 μM)	7β-OHC (50 μM) + DMF (25 μM)	7β-OHC (50 μM) + MMF (25 μM)
C14:1 n-5	2.19 ± 0.00	2.10 ± 0.02	1.53 ± 0.22	2.22 ± 0.16 ¥	3.29 ± 0.16 ¥	1.61 ± 0.09 #	1.82 ± 0.05 *	1.71 ± 0.20
C16:1 n-10 or n-9	231.31 ± 6.96	230.16 ± 9.14	175.46 ± 3.55	176.83 ± 13.98	241.36 ± 6.80 ¥	207.41 ± 6.36 #	274.92 ± 6.32 *	276.70 ± 14.62 *
C16:1 n-7	454.04 ± 26.71	420.16 ± 28.80	352.91 ± 10.09	400.29 ± 4.27 ¥	553.16 ± 11.81 ¥	313.62 ± 11.98 #	373.66 ± 2.06 *	545.29 ± 4.92 *
C18:1 n-9	2239.11 ± 16.15	2035.46 ± 48.32	1812.39 ± 30.35	2053.93 ± 47.61 ¥	2487.96 ± 8.81 ¥	1970.72 ± 36.33	1746.52 ± 0.25 *	1759.29 ± 0.74 *
C18:1 n-7	502.24 ± 8.92	464.92 ± 46.02	448.74 ± 28.15	546.50 ± 18.31 ¥	718.05 ± 51.47 ¥	403.71 ± 2.75 #	452.47 ± 31.14 *	439.80 ± 1.16 *
C20:1 n-9	62.63 ± 3.25	54.37 ± 0.23	56.61 ± 2.99	91.13 ± 8.80 ¥	84.90 ± 4.67 ¥	16.82 ± 0.11 #	55.57 ± 0.17 *	55.03 ± 1.27 *
C20:1 n-7	32.03 ± 0.04	34.63 ± 0.47	35.26 ± 0.16	24.77 ± 2.21 ¥	27.13 ± 0.48 ¥	5.65 ± 1.00 #	12.83 ± 0.45 *	14.74 ± 0.40 *
C22:1 n-9	2.37 ± 0.05	2.34 ± 0.04	2.00 ± 0.06	2.96 ± 0.14 ¥	2.85 ± 0.25 ¥	2.29 ± 0.16	3.06 ± 0.20 *	2.25 ± 0.11
C24:1 n-9	12.58 ± 0.53	13.01 ± 0.01	14.61 ± 0.51	22.37 ± 0.58 ¥	24.19 ± 1.78 ¥	32.71 ± 0.96 #	23.52 ± 1.44 *	23.99 ± 2.85 *
C26:1 n-9	0.59 ± 0.03	0.62 ± 0.00	0.57 ± 0.04	1.25 ± 0.05 ¥	1.32 ± 0.05 ¥	2.27 ± 0.08 #	1.30 ± 0.02 *	1.64 ± 0.03 *
ΣMUFA	3539.09 ± 47.48	3257.77 ± 17.64	2900.09 ± 13.39	3322.26 ± 78.18 ¥	4144.22 ± 55.05 ¥	2956.82 ± 13.18 #	2945.67 ± 20.57	3120.44 ± 22.97 *

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean ± SD of 3 independent experiments. A two way ANOVA followed by a Student's t-test was realized. Significant difference between vehicle (EtOH 0.6%) and 7β-OHC-treated cells is indicated by #; P < 0.05; significant difference between 7β-OHC and (7β-OHC + DMF) or (7β-OHC + MMF) is indicated by *; P < 0.05; significant difference between vehicle (DMSO 0.05%) and DMF or MMF treated cells is indicated by ¥; P < 0.05. No significant differences are observed between Control, EtOH and DMSO. ΣMUFA: Sum of mono-saturated fatty acids; 7β-OHC: 7β-hydroxycholesterol.

Sghaier R et al.

Table 5
Profile of polyunsaturated fatty acids in 158 N cells exposed to 7β-hydroxycholesterol with or without dimethyl fumarate (DMF) or monomethyl fumarate (MMF).

	Control	EtOH (0.6%)	DMSO (0.05%)	DMF (25 μM)	MMF (25 μM)	7β-OHC (50 μM)	7β-OHC (50 μM) + DMF (25 μM)	7β-OHC (50 μM) + MMF (25 μM)
C18:2 n-6	32.66 ± 2.10	28.06 ± 0.94	29.72 ± 0.41	36.30 ± 1.14 ¥	36.77 ± 3.82 ¥	23.14 ± 1.48 #	26.58 ± 1.44 *	26.33 ± 1.95
C20:4 n-6 (AA)	314.84 ± 6.38	277.13 ± 2.48	269.37 ± 1.78	338.36 ± 44.67 ¥	317.85 ± 15.25 ¥	203.91 ± 2.73 #	185.39 ± 5.99 *	195.29 ± 13.48
C20:5 n-3 (EPA)	450.26 ± 2.05	400.48 ± 22.37	451.25 ± 13.07	200.83 ± 5.67 ¥	203.16 ± 10.21 ¥	127.58 ± 0.95 #	100.79 ± 8.65 *	114.83 ± 5.05 *
C20:3 n-6	87.23 ± 7.07	84.27 ± 2.34	67.61 ± 0.67	81.62 ± 2.39 ¥	89.69 ± 1.34 ¥	65.15 ± 2.24 #	81.93 ± 2.81 *	72.33 ± 3.41 *
C20:2 n-6	52.96 ± 2.27	47.51 ± 0.10	51.64 ± 1.70	32.50 ± 0.25 ¥	36.01 ± 4.04 ¥	15.72 ± 2.19 #	17.71 ± 1.38 *	34.50 ± 1.08 *
C22:6 n-3 (DHA)	95.82 ± 2.21	82.47 ± 0.90	79.76 ± 1.66	98.43 ± 5.62 ¥	97.45 ± 4.70 ¥	70.85 ± 0.86 #	70.65 ± 0.46	76.97 ± 3.81 *
C22:5 n-3 (DPA)	92.21 ± 1.70	90.63 ± 3.51	79.05 ± 1.42	93.39 ± 5.68 ¥	89.42 ± 2.41 ¥	63.52 ± 0.87 #	76.81 ± 0.17 *	75.06 ± 0.15 *
ΣPUFA	1588.33 ± 14.33	1373.67 ± 29.60	1512.94 ± 4.59	1318.22 ± 34.65 ¥	870.35 ± 39.09 ¥	872.40 ± 22.61 #	562.57 ± 0.47 *	628.02 ± 1.89 *
ΣPUFA (n-3)	638.29 ± 5.97	573.58 ± 26.79	610.05 ± 9.99	392.65 ± 5.60 ¥	390.04 ± 17.32 ¥	261.95 ± 0.95 #	248.25 ± 8.02 *	266.85 ± 8.71
ΣPUFA (n-6)	487.70 ± 5.07	436.96 ± 1.18	418.35 ± 1.16	488.78 ± 43.66 ¥	480.31 ± 21.77 ¥	307.91 ± 4.25 #	311.61 ± 6.01	328.45 ± 17.76
ΣPUFA n-3/ΣPUFA n-6	1.31 ± 0.00	1.31 ± 0.06	1.46 ± 0.03	0.81 ± 0.06 ¥	0.81 ± 0.00 ¥	0.85 ± 0.01 #	0.80 ± 0.04	0.82 ± 0.07
Δ 4 : C22:6 n-3/C22 :5 n-3	1.04 ± 0.00	0.91 ± 0.03	1.01 ± 0.00	1.06 ± 0.12	1.09 ± 0.02 ¥	1.12 ± 0.03 #	0.92 ± 0.05 *	1.03 ± 0.05 *
Δ 5 : C20:4 n-6 /C20:3 n-6	3.64 ± 0.37	3.29 ± 0.12	3.98 ± 0.01	4.16 ± 0.67	3.55 ± 0.22 ¥	3.13 ± 0.07	2.27 ± 0.15 *	2.70 ± 0.06 *
Δ 8 : C20:3 n-6 /C20 :2 n-6	1.64 ± 0.06	1.77 ± 0.05	1.31 ± 0.06	2.51 ± 0.09 ¥	2.53 ± 0.32 ¥	4.25 ± 0.73 #	4.67 ± 0.52	2.10 ± 0.16 *
Δ 9 : C16:1 n-7 / C16:0	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.00	0.21 ± 0.00 ¥	0.24 ± 0.00 ¥	0.18 ± 0.00	0.23 ± 0.00 *	0.21 ± 0.00 *
Δ 9 : C18:1 n-9 / c18:0	1.81 ± 0.02	1.74 ± 0.07	1.92 ± 0.05	2.35 ± 0.01 ¥	1.86 ± 0.02	2.73 ± 0.01 #	2.17 ± 0.02 *	2.12 ± 0.01 *
Elongase: 22:5 n-3 /C20:5 n-3	0.20 ± 0.00	0.23 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.47 ± 0.04 ¥	0.44 ± 0.01 ¥	0.50 ± 0.00 #	0.77 ± 0.07 *	0.65 ± 0.03 *
Elongase : C18:0/C16:0	0.53 ± 0.00	0.51 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.45 ± 0.02 ¥	0.58 ± 0.01 ¥	0.42 ± 0.02 #	0.49 ± 0.00 *	0.32 ± 0.00 *

Concentrations are expressed as ng/million cells. Results are expressed as mean ± SD of three independent experiments. A two way ANOVA followed by a Student's t-test was realized. Significant difference between vehicle (EtOH 0.6%) and 7β-OHC-treated cells is indicated by #; P < 0.05; significant difference between DMF or MMF treated cells is indicated by ¥; P < 0.05; significant difference between vehicle (DMSO 0.05%) and DMF or MMF treated cells is indicated by #; P < 0.05; No significant differences are observed between Control, EtOH and DMSO. ΣPUFA: sum of polyunsaturated fatty acids; Δ 4: delta 4 desaturase; Δ 5: delta 5 desaturase; Δ 8: delta 8 desaturase; Δ 9: delta 9 desaturase; 7β-hydroxycholesterol: 7β-OHC.

DMF orMMF on the cell content in sphingomyelin (SM) and phosphatidylcholine (PC) were determined by GC/MS. In the presence of 7β-OHC, significant decreases in SM and PC were observed comparatively to control (untreated cells), vehicle-treated cells (EtOH 0.6% or DMSO 0.05%), α-tocopherol, DMF and MMF (Fig. 8). Whereas α-tocopherol either failed to, or had a minor effect in preventing the 7β-OHC-induced decrease of SM and PC, respectively, DMF was more efficient than MMF at attenuating the decrease of SM and PC under treatment with 7β-OHC (Fig. 8).

3.6. Effects of 7β-hydroxycholesterol with or without dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on apoptosis and autophagy

The oxidative stress induced by 7β-OHC in 158 N cells was associated with characteristic features of apoptosis and autophagy, in agreement with previous studies showing that 7β-OHC triggers an oxiaoptophagic mode of cell death on 158 N cells [8] (Fig. 9). Apoptosis is morphologically characterized by the presence of cells with condensed and/or fragmented nuclei (Fig. 9A) and by an induction of cleaved caspase-3 (Fig. 10). The occurrence of autophagy is supported by an enhancement of the percentage of acridine orange (AO)-positive cells (Fig. 9B), which could correspond to the presence of cells with large and/or numerous autophagic vesicles, as well as by an activation of LC3-I into LC3-II leading to an enhancement of the [(LC3-II) / (LC3-I)] ratio (Fig. 10). Of note, DMF and MMF were able to counteract 7β-OHC-induced apoptosis and autophagy. Thus, in (7β-OHC + DMF)- and (7β-OHC + MMF)-treated cells, the percentage of apoptotic cells was strongly and significantly decreased, and the cleavage of caspase-3 was also reduced; in addition, the percentage of AO positive cells was also strongly decreased and the activation of LC3-I into LC3-II was diminished (Fig. 10). As little is known on the signalling pathway leading to 7β-OHC-induced cell death, various inhibitors were used: H89 (20 μM), U73122 (1 μM), chelerythrine (1 μM), and U0126 (20 μM), which inhibit protein kinase A (PKA), phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC) and MEK, respectively. Undetectable or slight inhibition of cell death evaluated with the FDA assay was observed when 7β-OHC was associated with U73122 and H89, respectively (Fig. 11). However, 7β-OHC-induced cell death was markedly reduced in the presence of chelerythrine and U0126 (Fig. 11) supporting an involvement of PKC and MEK in the deleterious effects of 7β-OHC in 158 N cells.

3.7. Effect of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on the recovery of 7β-hydroxycholesterol-induced cell death

We also studied the effect of DMF (25 μM) and MMF (25 μM) on 7β-OHC (50 μM)-induced cell death when DMF and MMF were added after 7β-OHC. With the FDA assay, the ability of α-tocopherol (400 μM) to prevent 7β-OHC-induced cell death was the most efficient when it was introduced in the culture medium 6 h after 7β-OHC; whereas significant, the cytoprotection found when α-tocopherol was introduced 10 h after 7β-OHC, was very slight (Supplementary Fig. 5). Based on these data, the effects of DMF and MMF were evaluated when they were added 6 h after 7β-OHC;of note, under these conditions, data obtained by cell counting with trypan blue, and nuclear staining with Hoechst, 33342 show that DMF and MMF prevent 7β-OHC-induced cell death and apoptosis (Fig. 12). Therefore, DMF and MMF also have cytoprotective effects on 7β-OHC-induced cell death when they are added after this oxysterol.

3.8. Analysis of myelin proteins expression (PLP, MBP) in 7β-hydroxycholesterol-treated murine oligodendrocytes 158 N without or with dimethyl fumarate and monomethyl fumarate

Myelin proteins such as proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP) correspond to 50 and 30% of myelin proteins, respectively [30], and are expressed by 158 N cells [29]. Therefore, we

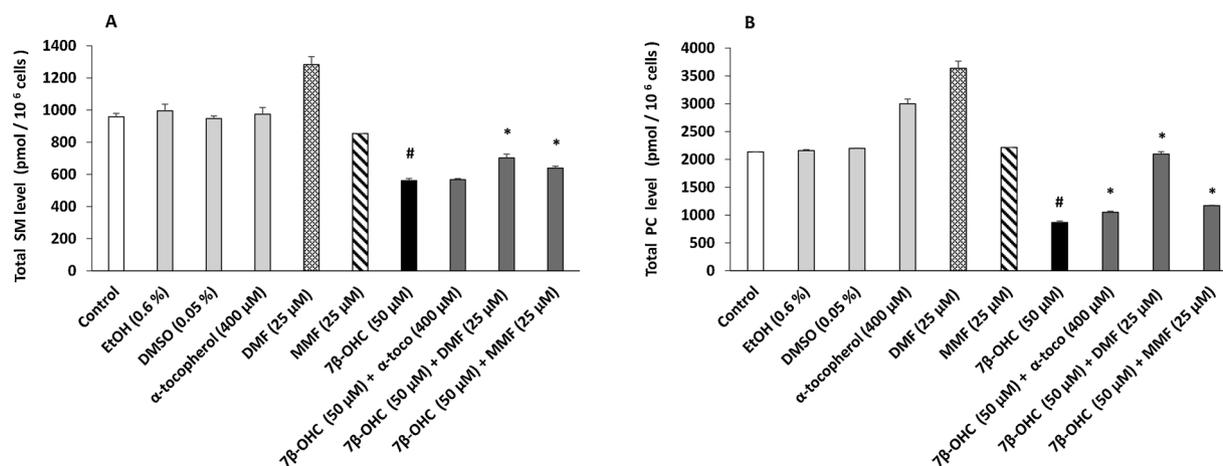


Fig. 8. Phospholipid (sphingomyelin, phosphatidylcholine) content in 158 N cells exposed to 7β-hydroxycholesterol with or without dimethyl fumarate or monomethyl fumarate. 158 N cells were cultured for 24 h with or without 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC, 50 μM) in the presence or absence of DMF (25 μM), MMF (25 μM) or α-tocopherol (400 μM). Under these conditions, the quantity of sphingomyelin (SM) and phosphatidylcholine (PC) per 10⁶ cells was determined by GC/MS. Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells and its vehicle (Ethanol (EtOH) 0.6%); # *P* ≤ 0.05 or less. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells, (7β-OHC + DMF)-, (7β-OHC + MMF)- or (7β-OHC + α-toco)-treated cells; * *P* ≤ 0.05 or less. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

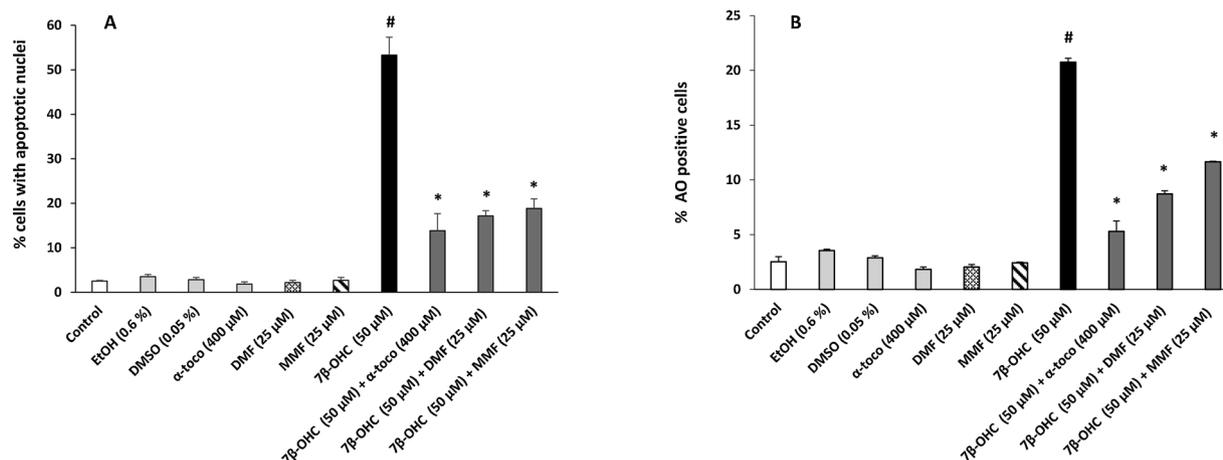


Fig. 9. Effect of dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on 7β-hydroxycholesterol-induced morphological nuclear changes characteristic of apoptosis and lysosomal modifications evocating autophagy. 158 N cells were cultured for 24 h with or without 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC, 50 μM) in the presence or absence of DMF (25 μM), MMF (25 μM) or α-tocopherol (400 μM). Under these conditions, the quantification of the percentage of apoptotic cells was evaluated by nuclear morphologic criteria after staining with Giemsa and Hoechst 33,342; apoptotic cells are characterized by condensed and/or fragmented nuclei whereas normal cells have round and regular nuclei (A). The impact of 7β-OHC (50 μM) with or without DMF (25 μM), MMF (25 μM) or α-tocopherol (400 μM) on the lysosome, which is involved in the autophagic process, was determined by flow cytometry after staining with acridine orange (AO); under these conditions, the percentage of AO positive cells was quantified (B). Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells and its vehicle (Ethanol (EtOH) 0.6%); # *P* ≤ 0.05 or less. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells, (7β-OHC + DMF)-, (7β-OHC + MMF)- or (7β-OHC + α-toco)-treated cells; * *P* ≤ 0.05 or less. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (Ethanol 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

determined whether PLP and MBP expression was affected by 7β-OHC (50 μM), and the impact of DMF (25 μM), MMF (25 μM) and α-tocopherol (400 μM); used as cytoprotective agent) on these proteins.

Compared to control cells, PLP expression was either similar or slightly lower in vehicles-treated cells (Supplementary Fig. 6); it was similar in, α-tocopherol-, DMF- and MMF-treated cells (Supplementary Fig. 6). However, PLP expression was higher in 7β-OHC-, (7β-OHC + α-tocopherol)-, and (7β-OHC + MMF)-treated cells (Supplementary Fig. 6). In the mouse, MBP is present under 2 major (around 18.5 and 14 kDa) and two minor (around 21.5 and 17 kDa) forms [60]. In 158 N cells, the 21 kDa (minor form) and 18 kDa (major form) were easily detected (Supplementary Fig. 6). Compared to control cells, MBP expression was enhanced by DMF (Supplementary Fig. 6). MBP expression was also higher in 7β-OHC-, (7β-OHC + α-tocopherol), (7β-

OHC + DMF), and (7β-OHC + MMF)-treated cells (Supplementary Fig. 6). Thus, an increase in the expression of PLP and MBP is observed with 7β-OHC; the increase in PLP is not corrected by α-tocopherol, and DMF but normalized with MMF; the increase in MBP observed with 7β-OHC is slightly and non significantly accentuated in the presence of α-tocopherol (Supplementary Fig. 6). DMF is more efficient than MMF to reduce the overexpression of PLP, mainly the 18 kDa (Supplementary Fig. 6).

4. Discussion

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are involved in numerous neurodegenerative diseases [61]. These dysfunctions favor lipid peroxidation leading to increased levels of 7-ketocholesterol (7KC)

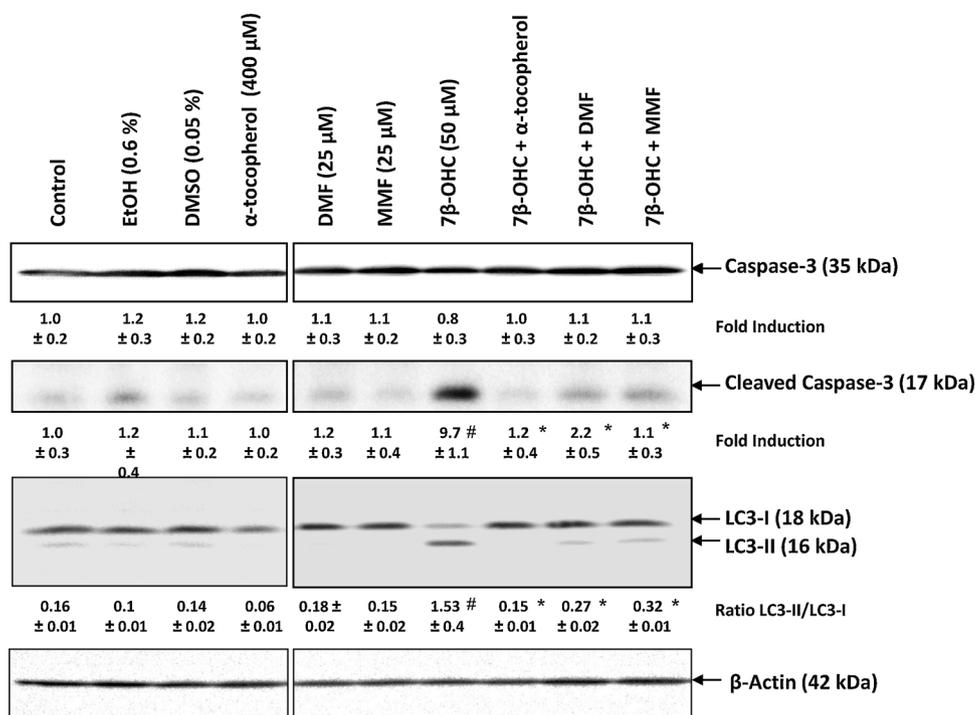


Fig. 10. Western blotting analysis of the effects dimethyl fumarate and monomethyl fumarate on 7β-hydroxycholesterol-induced apoptosis and autophagy on 158 N murine oligodendrocytes. 158 N cells were cultured for 24 h with or without 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC, 50 μM) in the presence or absence of DMF (25 μM), MMF (25 μM) or α-tocopherol (400 μM). Apoptosis and autophagy were characterized by Western blotting with appropriate antibodies raised against un-cleaved and cleaved caspase-3 and LC3-I / LC3-II, respectively. Autophagy is characterized by an enhanced (LC3-II / LC3-I) ratio. Data shown are characteristic of at least three independent experiments. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells and its vehicle (Ethanol (EtOH, 0.6%); # $P \leq 0.05$ or less. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells, (7β-OHC + DMF)-, (7β-OHC + MMF)- or (7β-OHC + α-toco)-treated cells; * $P \leq 0.05$ or less. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

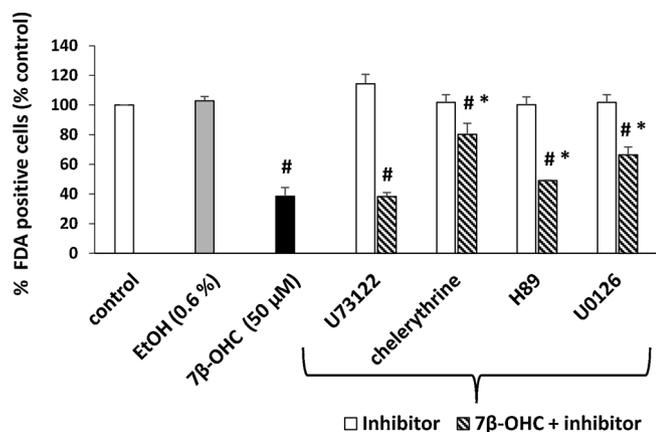


Fig. 11. Evaluation of protein kinase A (PKA), phospholipase C (PLC)/protein kinase C (PKC) and MEK / ERK signalling pathways in 7β-OHC-induced cell death on 158 N cells. Murine oligodendrocyte 158 N cells previously cultured for 24 h were further cultured for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of different inhibitors, H89, U0126, U73122 and chelerythrine, introduced 30 min before the addition of 7β-OHC. Data shown are mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. No significant difference was observed between control (untreated cells), vehicle (ethanol (EtOH): 0.6%)-treated cells and inhibitors (H89, U0126, U73122 or chelerythrine)-treated cells. Significance of the differences between 7β-OHC-treated cells and vehicle (EtOH 0.6%); # $P \leq 0.05$ or less. Significant of the differences between 7β-OHC-treated cells and (7β-OHC + (H89, U0126, U73122, or chelerythrine))-treated cells: * $P \leq 0.05$.

and 7β-OHC [7,19]. These oxysterols are found at significantly elevated levels in the brain, CSF and / or plasma of patients with AD [3], MS [9] as well as in patients with X-linked adrenoleukodystrophy [20]. These modifications could play a critical role in the evolution of neurodegenerative diseases since these oxysterols are able to modify numerous cellular functions [3]. Indeed, it has been reported that 7β-OHC as well as 7KC, known as indicators of oxidative stress [62], contribute to disruption of Redox homeostasis and are potent inducers of inflammation and cell death in different cell types of the CNS [3,16]. This

simultaneous induction of cell death associated with oxidative stress, and presenting apoptotic and autophagic criteria, has been described in oligodendrocytes and microglial cells treated with 7KC, 7β-OHC and 24S-hydroxycholesterol, and was defined as oxiaoptophagy [8]. To prevent neurodegenerative diseases associated with these molecules, it is therefore important to better know their signalling pathways to develop therapeutic strategies to oppose their deleterious effects. Currently, the ability of several molecules to attenuate oxysterols-induced oxiaoptophagy was mainly studied on oligodendrocytes 158 N and the most powerful compound identified at the moment is α-tocopherol [8,17,19,39]. In the present study, DMF and its main metabolite, MMF, have been chosen to counteract 7β-OHC-induced oxidative stress, mitochondrial damage and cell death given their ability to prevent oxidative stress via upregulation of anti-oxidative mechanisms [63]. DMF, marketed under the name of Tecfidera (Biogen), is used to treat the relapsing-remitting form of MS. In this study, 158 N murine cells were used since they present several characteristics of differentiated oligodendrocytes, which are myelin producing cells in the CNS and consequently essential for an efficient transmission of the nervous impulse. In addition, 158 N cells express major myelin proteins (PLP, MBP) [29]. Therefore, the effects of 7β-OHC with or without DMF and MMF on PLP and MBP expression were also evaluated. Our data show important cytoprotective effects of DMF and MMF on 7β-OHC-treated 158 N cells, and demonstrate the ability of DMF and MMF to prevent 7β-OHC-induced oxiaoptophagy.

In 158 N cells, 7β-OHC exhibits cytotoxic effects. An increased percentage of floating round cells and a decreased of adherent cells associated with a loss of membrane integrity were revealed, suggesting an alteration of membrane constituents associated with cell death. These alterations could be explained by Redox disequilibrium induced by 7β-OHC, which could affect the different cellular compartments as a consequence of lipid peroxidation. Indeed, an overproduction of ROS and of mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ associated with an enhancement of antioxidant enzyme activities (SOD, catalase, GPx), as well as lipid and protein oxidized derivatives were revealed under treatment with 7β-OHC. The enhanced activity of SOD evokes the data obtained by Yuan et al., who showed that human macrophages exposed to 7KC have increased levels of MnSOD mRNA [50]. The increased levels of GPx,

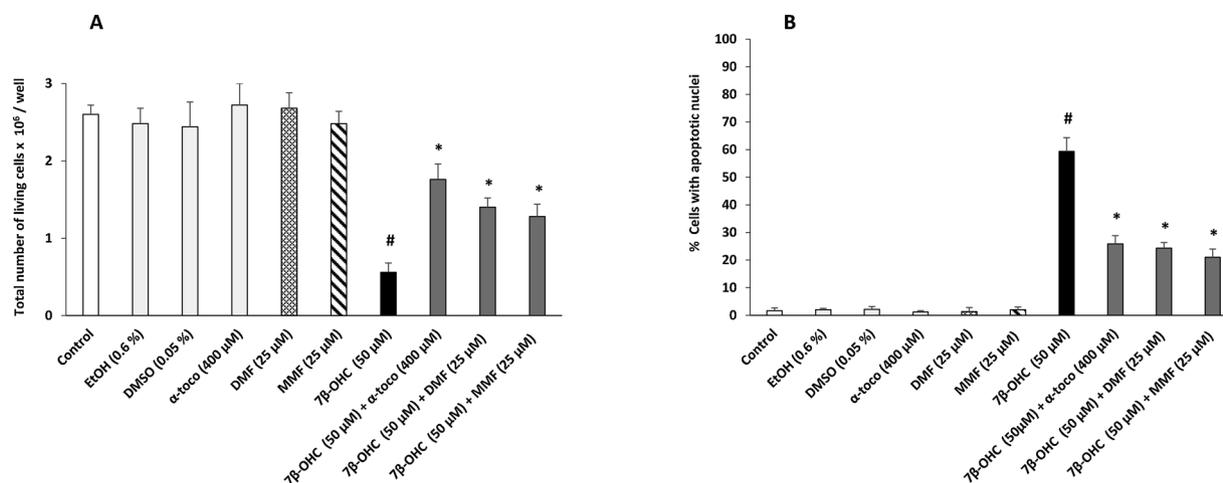


Fig. 12. Effects of dimethyl fumarate and mono methyl fumarate on the recovery of 7β-hydroxycholesterol-induced cell death. In these experiments, after 24 h of culture, 158 N cells were incubated with 7β-OHC (50 μM) for 6 h before the addition of DMF (25 μM), MMF (25 μM), or α-tocopherol (400 μM). The cells were subsequently incubated with 7β-OHC (50 μM) associated with DMF, MMF or α-tocopherol for an 18 h additional period of time. **A:** total number of living cells evaluated after staining with trypan blue; **B:** percentage of cells with apoptotic nuclei determined after staining with Hoechst 33,342. Data shown are mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. A two way ANOVA followed by a Student's *t*-test was realized. Significant differences between 7β-OHC-treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH, 0.6%): # *P* ≤ 0.05. Significant differences between 7β-OHC-treated cells and (7β-OHC + DMF)-, (7β-OHC + MMF)- or (7β-OHC + α-tocopherol)-treated cells; * *P* ≤ 0.05. No significant differences were observed between control (untreated cells), vehicle (EtOH 0.6%), and vehicle (DMSO 0.05%).

catalase, and SOD activities, were considered as a cellular reaction involved in the defense against the free radicals. The overproduction of ROS could favor the increase of SOD, catalase and GPx activities in a cascade of events to reduce oxidative stress. The disruption of Redox equilibrium observed under treatment with 7β-OHC, in agreement with previous studies [8,19,34,64], is also associated with an increase of lipid and protein oxidation (MDA, CDs and CPs) which could be used as biomarkers of oxidative stress in diseases associated with increased levels of this oxysterol.

In 158 N cells exposed to 7β-OHC, as observed under treatment with 7KC [39], the overproduction of ROS was associated with a loss of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$). Thus, we were interested in the characterization of mitochondrial functions in the presence of 7β-OHC. In agreement with previous studies, we found that 7β-OHC is an inducer of cell death associated with mitochondrial dysfunction, including morphological, functional and metabolic mitochondrial alterations [8]. This includes: a loss of succinate dehydrogenase activity, a loss of $\Delta\Psi_m$, an increase of mitochondrial mass, and an overproduction of $O_2^{\bullet-}$ at the mitochondria level. These findings are in accordance with studies conducted on various cell types from different species [16,17]. The increase of mitochondrial mass could be an adaptive response of the mitochondria to prevent the loss of transmembrane mitochondrial potential and preserve mitochondrial metabolism [65]. It has been reported that an increase of mitochondrial mass was correlated to the hyperactivity of the mitochondrial complex IV in the axons of patients with MS [66,67]. As it is known, the main mitochondrial function is to control respiratory chain in order to produce energy in the form of ATP via TCA cycle which is primordial for numerous cellular functions such as carbohydrates, proteins and lipids metabolism [68]. Here, we remarked an enhancement of cellular lactate (lactic acid), associated with a decrease of pyruvate level in the presence of 7β-OHC. This suggests a defect of carbohydrate metabolism and in particular of glycolysis. The accumulation of lactic acid could result from pyruvate conversion to regenerate NAD^+ used to restore glycolysis. Since pyruvate is the precursor of acetyl-CoA, the decreased amount of pyruvate could be at the origin of TCA cycle impairment. The alteration of the TCA cycle is supported by the reduced concentrations of some organic acids of the TCA cycle, citrate, fumarate, succinate, and malate in the presence of 7β-OHC. TCA cycle impairment can lead to oxidative phosphorylation alteration, and consequently to

mitochondrial failure [39]. On the other hand, 7β-OHC induces a decrease in the cardiolipin levels. Similar observations were made in 158 N exposed to 7KC [69]. Cardiolipins are mitochondrial phospholipids synthesized and located in the inner mitochondrial membrane, and are involved in various mitochondrial functions and in bioenergetics [58]. The loss of cardiolipins content in mitochondria may also reflect biochemical modifications of mitochondrial membrane. It is suggested that the observed decrease of cardiolipins content could be consequence of their increased hydrolysis by endogenous phospholipases, and/or by a decreased de novo synthesis resulting from impaired function of the enzymes involved in their synthesis, or by a decreased bioavailability of cardiolipins precursors. During cell death, release of cardiolipins outside the mitochondria and outside the cells is also possible. These data underline the major role of 7β-OHC in mitochondrial dysfunction.

Given the important role of lipids, including cholesterol in myelin structure and brain health [70], it was important to evaluate the impact of 7β-OHC on cholesterol metabolism via the quantification of some of its precursors and derivatives. Under treatment with 7β-OHC, reduced levels of total cholesterol and its precursors, lathosterol, lanosterol, and desmosterol were observed, arguing in favor a defect on cholesterol synthesis. Our results support previous findings reported on different cellular lines treated with 24(S)-hydroxycholesterol or 7KC: these studies have shown that cholesterol synthesis alteration was associated with other events such as mitochondrial damage and cell death [39]. As our study reveals oxidative stress along with severe mitochondrial dysfunctions, under treatment with 7β-OHC, this could explain even in part, the cellular accumulation of 7KC formed by an oxidation of cholesterol induced by ROS overproduction.

Our results support the idea that the alteration of cholesterol synthesis, lead to cholesterol homeostasis disturbance, which in oxidative stress conditions might be associated with increased levels of some oxysterols. In addition, it has been reported that oxysterols can disturb lipid homeostasis through the activation of transcription factors. They can act on sterol responsive element binding proteins (SREBPs), which activate several genes involved in cholesterol, triglycerides, phospholipids, and fatty acid synthesis [71]. In addition, fatty acids, which are components of phospholipids, are essential constituents in the structure and functions of myelin sheath [72]. Thus, it was important to evaluate both the fatty acid profile and the phospholipid content (sphingomyelin, phosphatidylcholine) when 158 N cells were

exposed to 7 β -OHC. In this condition, a reduction of saturated fatty acids as myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0), structural elements of membrane phospholipids, as well as of phosphatidylcholine and sphingomyelin were observed. In addition, an accumulation of total and very long chain saturated fatty acids (VLCSFAs) has been remarked under treatment with 7 β -OHC, which points towards peroxisomal defect, since β -oxidation of VLCSFAs leading to their degradation takes place in the peroxisome [73]. Thus, as reported with 7KC, the treatment with 7 β -OHC also induces peroxisomal dysfunction [69]. Furthermore, it has been demonstrated that the VLCSFAs are able to induce cell death, mitochondrial impairment, and oxidative stress in nerve cells [74], which could aggravate the cytotoxic effect of 7 β -OHC. Moreover, MUFA and PUFA levels were also reduced, which is in accordance with other studies, conducted on 158 N cells in the presence of 7 β -OHC [34]. It is also well established that MUFA and PUFA are indispensable for neuronal membrane fluidity [75], and have neuroprotective, anti-inflammatory, and antioxidant properties [76,77].

According to previous findings on different cell lines, 7 β -OHC was considered as a strongly cytotoxic oxysterol. So, we intended to characterize 7 β -OHC-induced cell death. Our data show that 7 β -OHC-induced cell death triggers caspase-3 activation associated with fragmented and/or condensed nuclei. This supports that 7 β -OHC induces an apoptotic mode of cell death. Moreover, our data confirm that 7 β -OHC also triggers autophagy. Indeed, a higher percentage of cells with altered lysosomes was observed. These data underline that 7 β -OHC-induced cell death is characterized by lysosomal dysfunction [78] which could favor mitochondrial alteration [79]. Furthermore, a conversion of LC3-I to LC3-II, and an increase of (LC3-II / LC3-I) ratio, which are characteristics of autophagy, were detected demonstrating that 7 β -OHC simultaneously triggers apoptosis and autophagy, and induces an oxiaoptophagic process [64]. Altogether, our data highlight the major role played by 7 β -OHC in mitochondrial dysfunction, oxidative stress induction, cellular metabolism alteration and cell death induction which are common features observed during neurodegeneration. In addition, our study brings new information on the signalling pathway induced during 7 β -OHC-induced cell death and supports the hypothesis of an activation of the PKC / p38 / MEK signalling pathway [18].

When 158 N cells were simultaneously treated with DMF or MMF and 7 β -OHC, our data demonstrate that DMF, a therapeutic agent (prescribed under the name of Tecfidera used for the treatment of relapsing remitting MS), as well as MMF, which is its major metabolite, known to have antioxidant and neuroprotective activities are able to prevent 7 β -OHC-induced cytotoxicity [22,23]. Under these conditions, we observed an attenuation of cell detachment and a preservation of plasma membrane integrity. It has also been shown that DMF induces an increase of antioxidant molecules such as glutathione (GSH), carnitine, and ascorbic acid above basal levels [24]. These molecules, especially ascorbic acid, are able to maintain membrane integrity in a pro-oxidative environment by preventing lipid peroxidation [80]. In our study, the ability of DMF to increase the levels of SH-groups suggests that this compound might favor this mechanism. It may act through the activation of Nrf2 pathway [81]. Thus, it was of interest to evaluate the part taken by DMF and its major metabolite MMF on Redox status. We therefore determine the ability of DMF and MMF to inhibit the overproduction of ROS, to increase the antioxidant enzyme activities (SOD, catalase, GPx), to increase SH-groups level, and to reduce lipid peroxidation and protein oxidation products. Overall, the cytotoxic effects induced by 7 β -OHC on 158 N cells were strongly attenuated by DMF and MMF. In line with these findings, on human oligodendrocytes (MO3.13 cells), it has been reported that DMF prevent H₂O₂ overproduction-induced cell death, and enhances antioxidant molecule levels [24]. In the presence of 7 β -OHC, treatment with DMF and MMF favors the recovery of mitochondrial function through the restoration of succinate dehydrogenase activity, and mitochondrial transmembrane potential. Furthermore, DMF and MMF are able to

counteract mitochondrial O₂^{•-} overproduction, supporting a role of DMF and MMF on the control of cellular Redox potential [82]. In addition, DMF and MMF were able to attenuate the increase of mitochondrial mass corresponding either to an increase of the number of mitochondria and/or of their size [34]. Moreover, DMF and MMF normalize cardiolipins levels. Since a loss of cardiolipins content or alterations in the composition of these molecules have been associated with mitochondrial dysfunction, the restoration of their content argues in favor of the ability of DMF and MMF to prevent and restore mitochondrial dysfunction. This conclusion is reinforced by the ability of DMF and MMF to prevent TCA cycle alterations. These results underline that DMF and MMF influence the activities of mitochondrial enzymes including those of the TCA cycle. Pyruvate levels were also increased associated with a reduction of lactate after pretreatment with DMF or MMF: this argues in favor a recovery on carbohydrate metabolism and especially glycolysis.

It is also well known that the myelin sheath is composed of approximately 70–80% of lipids [72]. The synthesis and incorporation of phospholipids, sphingolipids, and cholesterol are critical for its development and maintenance. Based on data demonstrating neuroprotection of DMF, we postulated that this molecule and its metabolite (MMF) might increase the synthesis of lipids, which are major components of myelin sheath. Of note, DMF and MMF were able to prevent 7 β -OHC-induced modification of cholesterol synthesis through the restoration of the content of cholesterol precursors. The formation of oxidized cholesterol derivatives (mainly 7KC) resulting chiefly from cholesterol autoxidation was also reduced in the presence of DMF or MMF. However, DMF and MMF were unable to prevent the intracellular accumulation of 7 β -OHC. As the expression of the gene HSD11B1 encoding for the enzyme 11 β -HSD1 is considered unlikely, a conversion of 7 β -OHC to 7KC by this enzyme, is excluded. On the other hand, as the gene HSD11B2 encoding for the enzyme 11 β -HSD2 catalyzing the conversion of 7 β -OHC to 7KC is expressed, this may explain the persistent presence of 7KC despite the powerful antioxidant effects of DMF and MMF. In addition, we report the ability of DMF and MMF to normalize the fatty acid profile. The reduction of VLCSFAs levels observed when 7 β -OHC was associated with DMF and MMF support that DMF and MMF not only tend to normalize mitochondrial activity, but also peroxisomal activity. Of note, DMF and MMF were also able to attenuate the decrease of phospholipids (sphingomyelin, phosphatidylcholine) which are important component of myelin. Indeed, whereas the molar ratio of cholesterol, phospholipids and glycosphingolipids in most membranes is in the order of 25%:65%:10%, the molar ratios in myelin are in the range of 40%:40%:20% [83]. As DMF and MMF contribute to restore a normal lipid profile, concerning myelin associated-lipids (cholesterol, phospholipids), it was important to determine how major myelin proteins such as proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP), which correspond to 50 and 30% of myelin proteins, respectively [30], and which are expressed by the 158 N cells [29], were affected by 7 β -OHC and what was the impact of DMF and MMF on these proteins. Noteworthy, the increased expression of PLP was normalized with MMF, and the increase expression of MBP observed with 7 β -OHC was more or less attenuated by DMF and MMF.

Finally, DMF and MMF are also able to counteract 7 β -OHC-induced apoptosis as well as autophagy. At the moment, on 158 N cells, similar cytoprotective effects were only observed with α -tocopherol, DHA, and biotin which allow attenuation of 7 β -OHC-induced oxiaoptophagy [8,31].

5. Conclusion

Our data obtained on oligodendrocytes 158 N demonstrate that 7 β -OHC induces ROS overproduction subsequently leading to increased antioxidant enzyme activity, and oxidation of cellular macromolecules. In addition, 7 β -OHC triggers important mitochondrial dysfunctions: decreases of $\Delta\psi_m$, increases of mitochondrial mass, decreased

cardiolipins content and alteration of the TCA cycle, which can influence the cellular metabolism, especially lipid metabolism. These different alterations contribute to cell death through oxiaoptophagy. The different events associated with oxiaoptophagy, revealed from data obtained in the present study and in previous studies, are summarized in Supplementary Fig. 7. Our data also show that DMF and MMF attenuate 7 β -OHC-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism alteration and cell death, which are hallmarks of neurodegenerative diseases. As 7 β -OHC is associated with neurodegeneration, the ability of DMF and MMF to counteract the toxicity of this oxysterol reinforces the interest of DMF for the treatment of neurodegenerative diseases as well as of other diseases associated with increased levels of 7 β -OHC [3,16].

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

This work was presented as a poster at the 8th ENOR Symposium "Oxysterols and Sterols: from Lipidomics to Food Sciences", September 20–21, 2018, University of Bologna, Bologna, Italy (<https://www.oxysterols.net/>). This work was supported by grants from: University of Burgundy (Dijon, France), University of Monastir (Monastir, Tunisia), and University of Manouba (Tunis, Tunisia). We acknowledge Dr Delphine Meffre (Inserm UMR 1124, Paris, France) for her valuable advice on the choice of anti-PLP and anti-MBP antibodies, and for the conditions of analysis of these proteins by Western blotting.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2019.105432>.

References

- [1] D.J. Betteridge, What is oxidative stress? *Metabolism* 49 (2 Suppl. 1) (2000) 3–8.
- [2] L.M. Sayre, G. Perry, M.A. Smith, Oxidative stress and neurotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2007) 172–188.
- [3] A. Zarrouk, A. Vejux, J. Mackrill, Y. O'Callaghan, M. Hammami, N. O'Brien, G. Lizard, Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes, *Ageing Res. Rev.* 18 (2014) 148–162.
- [4] M.T. Fischer, R. Sharma, J.L. Lim, L. Haider, J.M. Frischer, J. Drexhage, D. Mahad, M. Bradl, J. van Horssen, H. Lassmann, NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury, *Brain* 135 (2012) 886–899.
- [5] G.R. Campbell, D.J. Mahad, Mitochondria as crucial players in demyelinated axons: lessons from neuropathology and experimental demyelination, *Autoimmune Dis.* 2011 (2011).
- [6] A. Zarrouk, M. Debbabi, M. Bezine, E.M. Karym, A. Badreddine, O. Rouaud, T. Moreau, M. Cherkaoui-Malki, M. El Ayebe, B. Nasser, Lipid biomarkers in Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* 15 (2018) 303–312.
- [7] L. Iuliano, Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms, *Chem. Phys. Lipids* 164 (2011) 457–468.
- [8] T. Nury, A. Zarrouk, J.J. Mackrill, M. Samadi, P. Durand, J.-M. Riedinger, M. Doria, A. Vejux, E. Limagne, D. Delmas, Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 β -hydroxycholesterol-, or 24 (S)-hydroxycholesterol: Protective effects of α -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22: 6 n-3), *Steroids* 99 (2015) 194–203.
- [9] V. Leoni, D. Lütjohann, T. Masterman, Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 191–195.
- [10] M. Doria, L. Maugeat, T. Moreau, G. Lizard, A. Vejux, Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease, *Free Radic. Biol. Med.* 101 (2016) 393–400.
- [11] F. Kreilaus, A.S. Spiro, C.A. McLean, B. Garner, A.M. Jenner, Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 42 (2016) 535–546.
- [12] G. Testa, E. Staurengi, C. Zerbinati, S. Gargiulo, L. Iuliano, G. Giaccone, F. Fantò, G. Poli, G. Leonarduzzi, P. Gamba, Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: their involvement in neuroinflammation, *Redox Biol.* 10 (2016) 24–33.
- [13] T.J. Nelson, D.L. Alkon, Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and β -amyloid peptide, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7377–7387.
- [14] H. Larsson, Y. Böttiger, L. Iuliano, U. Diczfalusy, In vivo interconversion of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 695–701.
- [15] A. Odermatt, P. Klusonova, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1: regeneration of active glucocorticoids is only part of the story, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 151 (2015) 85–92.
- [16] A. Vejux, G. Lizard, 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.* 30 (2009) 153–170.
- [17] A. Zarrouk, T. Nury, M. Samadi, Y. O'Callaghan, M. Hammami, N.M. O'Brien, G. Lizard, J.J. Mackrill, Effects of cholesterol oxides on cell death induction and calcium increase in human neuronal cells (SK-N-BE) and evaluation of the protective effects of docosahexaenoic acid (DHA; C22: 6 n-3), *Steroids* 99 (2015) 238–247.
- [18] L. Clarion, M. Schindler, J. de Weille, K. Lomède, A. Laroche-Clary, E. Uro-Coste, J. Robert, M. Mersel, N. Bakalara, 7 β -Hydroxycholesterol-induced energy stress leads to sequential opposing signaling responses and to death of C6 glioblastoma cells, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 37–46.
- [19] K. Ragot, J.J. Mackrill, A. Zarrouk, T. Nury, V. Aires, A. Jacquin, A. Athias, J.-P.P. de Barros, A. Vejux, J.-M. Riedinger, Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes, *Biochem. Pharmacol.* 86 (2013) 67–79.
- [20] T. Nury, A. Zarrouk, K. Ragot, M. Debbabi, J.-M. Riedinger, A. Vejux, P. Aubourg, G. Lizard, 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169 (2017) 123–136.
- [21] D. Werdenberg, R. Joshi, S. Wolffram, H.P. Merkle, P. Langguth, Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters, *Biopharm. Drug Dispos.* 24 (2003) 259–273.
- [22] S.X. Lin, L. Lisi, C.D. Russo, P.E. Polak, A. Sharp, G. Weinberg, S. Kalinin, D.L. Feinstein, The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1, *ASN Neuro* 3 (2011) AN20100033.
- [23] R.H. Scannevin, S. Chollate, M.-Y. Jung, M. Shackett, H. Patel, P. Bista, W. Zeng, S. Ryan, M. Yamamoto, M. Lukashev, Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341 (2012) 274–284.
- [24] H. Huang, A. Tarabozetti, L.P. Shriver, Dimethyl fumarate modulates antioxidant and lipid metabolism in oligodendrocytes, *Redox Biol.* 5 (2015) 169–175.
- [25] E. Havrdova, M. Hutchinson, N.C. Kurukulasuriya, K. Raghupathi, M.T. Sweetser, K.T. Dawson, R. Gold, Oral BG-12 (dimethyl fumarate) for relapsing–remitting multiple sclerosis: a review of DEFINE and CONFIRM: evaluation of: gold R, Kappos L, Arnold D, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J med* 2012; 367: 1098–107; and Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J med* 2012; 367: 1087–97, *Expert Opin. Pharmacother.* 14 (2013) 2145–2156.
- [26] Z. Xu, F. Zhang, F. Sun, K. Gu, S. Dong, D. He, Dimethyl fumarate for multiple sclerosis, *Cochrane Data Base Syst Rev* 4 (2015) CDO 11076.
- [27] G.O. Gillard, B. Collette, J. Anderson, J. Chao, R.H. Scannevin, D.J. Huss, J.D. Fontenot, DMF, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner, *J. Neuroimmunol.* 283 (2015) 74–85.
- [28] R.A. Linker, D.-H. Lee, S. Ryan, A.M. van Dam, R. Conrad, P. Bista, W. Zeng, X. Hronowsky, A. Buko, S. Chollate, Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway, *Brain* 134 (2011) 678–692.
- [29] M. Baarine, K. Ragot, E.C. Genin, H. El Hajj, D. Tromprier, P. Andreoletti, M.S. Ghandour, F. Menetrier, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary, G. Lizard, 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.* 111 (1) (2009) 119–131.
- [30] N. Baumann, D. Pham-Dinh, Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system, *Physiol. Rev.* 81 (2) (2001) 871–927.
- [31] R. Sghaier, A. Zarrouk, T. Nury, B. Ilham, N. O'Brien, J.J. Mackrill, A. Vejux, M. Samadi, B. Nasser, C. Caccia, V. Leoni, T. Moreau, M. Cherkaoui-Malki, A. Salhedine Masmoudi, G. Lizard, Biotin attenuation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism alteration and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death in 158 N murine oligodendrocytes, *Free Radic. Res.* 1 (2019) 535–561.
- [32] K.H. Jones, J.A. Senft, An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide, *J. Histochem. Cytochem.* 33 (1985) 77–79.
- [33] G. Lizard, S. Fournel, L. Genestier, N. Dhedin, C. Chaput, M. Flacher, M. Mutin, G. Panay, J.P. Revillard, Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis, *Cytom. Part A* 21 (1995) 275–283.
- [34] A. Zarrouk, Y.B. Salem, J. Hafsa, R. Sghaier, B. Charfeddine, K. Limem, M. Hammami, H. Majdoub, 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death, oxidative stress, and fatty acid metabolism dysfunctions attenuated with sea urchin egg oil, *Biochimie* 153 (2018) 201–219.
- [35] A. Zarrouk, T. Nury, E.-M. Karym, A. Vejux, R. Sghaier, C. Gondcaille, P. Andreoletti, D. Tromprier, S. Savary, M. Cherkaoui-Malki, Attenuation of 7-ketocholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy by dimethyl fumarate on 158N murine oligodendrocytes, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169 (2017) 29–38.
- [36] 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).
- [37] J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [38] G. Vial, M.-A. Chauvin, N. Bendridi, A. Durand, E. Meugnier, A.-M. Madec, N. Bernoud-Hubac, J.-P.P. de Barros, É. Fontaine, C. Acquaviva, Imeqlimin normalizes glucose tolerance and insulin sensitivity and improves mitochondrial function in liver of a high-fat high-sucrose diet mice model, *Diabetes* 64 (6) (2015) 2254–2264.
- [39] V. Leoni, T. Nury, A. Vejux, A. Zarrouk, C. Caccia, M. Debbabi, A. Fromont, R. Sghaier, T. Moreau, G. Lizard, Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: impacts on the cellular profile of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169 (2017) 96–110.
- [40] V. Leoni, L. Strittmatter, G. Zorzi, F. Zibordi, S. Dusi, B. Garavaglia, P. Venco, C. Caccia, A.L. Souza, A. Deik, Metabolic consequences of mitochondrial coenzyme A deficiency in patients with PANK2 mutations, *Mol. Genet. Metab.* 105 (2012) 463–471.
- [41] L. Flohé, W.A. Günzler, [12] Assays of glutathione peroxidase, *Meth. Enzymol.* 105 (1984) 114–120.
- [42] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [43] P. Faure, J.-L. Lafond, Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation, *Analysis of free radicals in biological systems* (1995) 237–248 Springer.
- [44] G. Rothe, G. Valet, Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'-dichlorofluorescein, *J. Leukoc. Biol.* 47 (1990) 440–448.
- [45] G. Rothe, A. Oser, G. Valet, Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes, *Naturwissenschaften* 75 (1988) 354–355.
- [46] H. Esterbauer, G. Striegl, H. Puhl, M. Rotheneder, Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein, *Free Radic. Res. Commun.* 6 (1989) 67–75.
- [47] T. Yoshioka, K. Kawada, T. Shimada, M. Mori, Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135 (1979) 372–376.
- [48] C.N. Oliver, B.-W. Ahn, E.J. Moerman, S. Goldstein, E.R. Stadtman, Age-related changes in oxidized proteins, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 5488–5491.
- [49] M. Baarine, K. Ragot, A. Athias, T. Nury, Z. Kattan, E.C. Genin, P. Andreoletti, F. Ménétrier, J.-M. Riedinger, M. Bardou, 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* 33 (2012) 212–228.
- [50] X.M. Yuan, W. Li, U.T. Brunk, H. Dalen, Y.H. Chang, A. Sevanian, Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 208–218.
- [51] M. Olsson, I. Rundquist, U. Brunk, Flow cytofluorometry of lysosomal acridine orange uptake by living cultured cells effect of trypsinization and starvation, *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A* 95 (1987) 159–165.
- [52] A. Altmeyer, A.C. Jung, M. Ignat, S. Benzina, J.-M. Denis, J. Gueulette, G. Noel, D. Mutter, P. Bischoff, Pharmacological enhancement of autophagy induced in a hepatocellular carcinoma cell line by high-LET radiation, *Anticancer Res.* 30 (2010) 303–310.
- [53] A.H. Kilgour, S. Semple, I. Marshall, P. Andrews, R. Andrew, B.R. Walker, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the brain does not contribute to systemic interconversion of cortisol and cortisone in healthy men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2) (2015) 483–489, <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3277>.
- [54] M. Wamil, R. Andrew, K.E. Chapman, J. Street, N.M. Morton, J.R. Seckl, 7-oxysterols modulate glucocorticoid activity in adipocytes through competition for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type, *Endocrinology* 149 (12) (2008) 5909–5918, <https://doi.org/10.1210/en.2008-0420>.
- [55] T. Mitić, S. Shave, N. Semjonous, I. McNaie, D.F. Cobice, G.G. Lavery, S.P. Webster, P.W. Hadoke, B.R. Walker, R. Andrew, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the balance between 7-keto- and 7-hydroxy-oxysterols in vivo, *Biochem. Pharmacol.* 86 (1) (2013) 146–153, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.002>.
- [56] W.J. Griffiths, Y. Wang, Oxysterol research: a brief review, *Biochem. Soc. Trans.* 47 (2) (2019) 517–526.
- [57] A. Birk, W. Chao, C. Bracken, J. Warren, H. Szeto, Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 2017–2028.
- [58] G. Paradies, V. Paradies, V. De Benedictis, F.M. Ruggiero, G. Petrosillo, Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1837 (2014) 408–417.
- [59] M. Schrader, J. Costello, L.F. Godinho, M. Islinger, Peroxisome-mitochondria interplay and disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 38 (2015) 681–702.
- [60] A.T. Campagnoni, B. Sorg, H.J. Roth, K. Kronquist, S.L. Newman, K. Kitamura, C. Campagnoni, B. Crandall, Expression of myelin protein genes in the developing brain, *J. Physiol. Paris* 82 (4) (1987) 229–238.
- [61] M. Di Carlo, D. Giacomazza, P. Picone, D. Nuzzo, P.L. San Biagio, Are oxidative stress and mitochondrial dysfunction the key players in the neurodegenerative diseases? *Free Radic. Res.* 46 (2012) 1327–1338.
- [62] B. Ziedén, A. Kaminskas, M. Kristenson, Z. Kucinskiene, B. Vessby, A.G. Olsson, U. Diczfalusy, Increased plasma 7 β -hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 967–971.
- [63] R.J. Fox, M. Kita, S.L. Cohan, L.J. Henson, J. Zambrano, R.H. Scannevin, J. O'Gorman, M. Novas, K.T. Dawson, J.T. Phillips, BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety, *Curr. Med. Res. Opin.* 30 (2014) 251–262.
- [64] T. Nury, M. Samadi, A. Zarrouk, J.M. Riedinger, G. Lizard, Improved synthesis and in vitro evaluation of the cytotoxic profile of oxysterols oxidized at C4 (4 α - and 4 β -hydroxycholesterol) and C7 (7-ketocholesterol, 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol) on cells of the central nervous system, *Eur. J. Med. Chem.* 70 (2013) 558–567.
- [65] J.M. Zahm, S. Baconnais, S. Monier, N. Bonnet, G. Bessède, P. Gambert, E. Puchelle, G. Lizard, 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 Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 52 (2003) 57–69.
- [66] D.J. Mahad, I. Ziabreva, G. Campbell, N. Lax, K. White, P.S. Hanson, H. Lassmann, D.M. Turnbull, Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis, *Brain* 132 (2009) 1161–1174.
- [67] M.E. Witte, L. Bø, R.J. Rodenburg, J.A. Belien, R. Musters, T. Hazes, L.T. Wintjes, J.A. Smeitink, J.J.G. Geurts, H.E. De Vries, Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions, *J. Pathol.* 219 (2009) 193–204.
- [68] F. Pierrel, P.A. Cobine, D.R. Winge, Metal Ion availability in mitochondria, *Biomaterials* 20 (2007) 675.
- [69] T. Nury, R. Sghaier, A. Zarrouk, F. Ménétrier, T. Uzun, V. Leoni, C. Caccia, W. Meddeb, A. Namsi, K. Sassi, Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol: attenuation by α -tocopherol, *Biochimie* 153 (2018) 151–202.
- [70] J. Diestschy, S. Turley, Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 1375–1397.
- [71] J.D. Horton, J.L. Goldstein, M.S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1125–1131.
- [72] P. Morell, R.H. Quarles, Characteristic composition of myelin, *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* 6 (1999).
- [73] R.J.A. Wanders, H.R. Waterham, Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 295–332.
- [74] I. Hapala, E. Marza, T. Ferreira, Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation, *Biol. Cell* 103 (2011) 271–285.
- [75] A.P. Simopoulos, Essential fatty acids in health and chronic disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999) 560s–569s.
- [76] C. Colette, C. Percheron, N. Pares-Herbutte, F. Michel, T.C. Pham, L. Brillant, B. Descomps, L. Monnier, Exchanging carbohydrates for monounsaturated fats in energy-restricted diets: effects on metabolic profile and other cardiovascular risk factors, *Int. J. Obes.* 27 (2003) 648.
- [77] S.C. Dyall, Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA, *Front. Aging Neurosci.* 7 (2015).
- [78] L. Malvitte, T. Montange, A. Vejux, C. Joffre, A. Bron, C. Creuzot-Garcher, G. Lizard, Activation of a Caspase-3-Independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization in cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to 7 β -Hydroxycholesterol, *Curr. Eye Res.* 33 (2008) 769–781.
- [79] C.E. Chwieralski, T. Welte, F. Bühling, Cathepsin-regulated apoptosis, *Apoptosis* 11 (2006) 143–149.
- [80] G.R. Buettner, The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate, *Arch. Biochem. Biophys.* 300 (1993) 535–543.
- [81] T. Nguyen, P. Nioi, C.B. Pickett, The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13291–13295.
- [82] A. Suneetha, Role of dimethyl fumarate in oxidative stress of multiple sclerosis: a review, *J. Chromatogr. B* 1019 (2016) 15–20.
- [83] J.S. O'Brien, Stability of the myelin membrane, *Science* 147 (1965) 1099–1107.

Biotin attenuation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism alteration and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death in 158N murine oligodendrocytes

Randa Sghaier, Amira Zarrouk, Thomas Nury, Ilham Badreddine, Nora O'Brien, John J. Mackrill, Anne Vejux, Mohammad Samadi, Boubker Nasser, Claudio Caccia, Valerio Leoni, Thibault Moreau, Mustapha Cherkaoui-Malki, Ahmed Salhedine Masmoudi & Gérard Lizard

To cite this article: Randa Sghaier, Amira Zarrouk, Thomas Nury, Ilham Badreddine, Nora O'Brien, John J. Mackrill, Anne Vejux, Mohammad Samadi, Boubker Nasser, Claudio Caccia, Valerio Leoni, Thibault Moreau, Mustapha Cherkaoui-Malki, Ahmed Salhedine Masmoudi & Gérard Lizard (2019) Biotin attenuation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism alteration and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death in 158N murine oligodendrocytes, Free Radical Research, 53:5, 535-561, DOI: [10.1080/10715762.2019.1612891](https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1612891)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1612891>



© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



[View supplementary material](#)



Accepted author version posted online: 01 May 2019.
Published online: 13 Jun 2019.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 167



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



Citing articles: 3 [View citing articles](#)

Biotin attenuation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism alteration and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death in 158N murine oligodendrocytes

Randa Sghaier^{a,b,c,d}, Amira Zarrouk^{b,c,e,f,*}, Thomas Nury^a, Ilham Badreddine^{a,g,h}, Nora O'Brien^e, John J. Mackrill^f, Anne Vejux^a, Mohammad Samadiⁱ, Boubker Nasser^h, Claudio Caccia^j, Valerio Leoni^k, Thibault Moreau^{a,l}, Mustapha Cherkaoui-Malki^a , Ahmed Salhedine Masmoudi^d and Gérard Lizard^{a,*} 

^aUniversity Bourgogne Franche-Comté/Inserm, Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism', Dijon, France; ^bLaboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University Sousse, Sousse, Tunisia; ^cFaculty of Medicine, Laboratory - NAFS "Nutrition – Functional Food & Vascular Health", Monastir & University Sousse, Sousse, Tunisia; ^dLaboratory of Biotechnology and Valorisation of Bio-Géo Ressources, University Manouba, Higher Institute of Biotechnology, Sidi Thabet, Tunisia; ^eSchool of Food and Nutritional Sciences, University College Cork, Cork, Ireland; ^fDepartment of Physiology, Biosciences Institute, University College Cork, Cork, Ireland; ^gUniversity Ibn Zohr, Lab. 'Valorisation des Ressources Naturelles et Environnement', Taroudant, Morocco; ^hLaboratory Neuroscience and Biochemistry, University Hassan 1er, Settat, Morocco; ⁱDepartment of Chemistry, University Lorraine, Metz Technopôle, Metz, France; ^jLaboratory of Medical Genetics and Neurogenetics, Foundation IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy; ^kLaboratory of Clinical Chemistry, Hospital of Varese, ASST-Settelaghi, Milan, Italy; ^lDepartment of Neurology, University Hospital, Dijon, France

ABSTRACT

Mitochondrial dysfunction and oxidative stress are involved in neurodegenerative diseases associated with an enhancement of lipid peroxidation products such as 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC). It is, therefore, important to study the ability of 7 β -OHC to trigger mitochondrial defects, oxidative stress, metabolic dysfunctions and cell death, which are hallmarks of neurodegeneration, and to identify cytoprotective molecules. The effects of biotin were evaluated on 158N murine oligodendrocytes, which are myelin synthesizing cells, exposed to 7 β -OHC (50 μ M) with or without biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (positive control of cytoprotection). The effects of biotin on 7 β -OHC activities were determined using different criteria: cell adhesion; plasma membrane integrity; redox status. The impact on mitochondria was characterized by the measurement of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi$ m), reactive oxygen species (ROS) overproduction, mitochondrial mass, quantification of cardiolipins and organic acids. Sterols and fatty acids were also quantified. Cell death (apoptosis, autophagy) was characterized by the enumeration of apoptotic cells, caspase-3 activation, identification of autophagic vesicles, and activation of LC3-I into LC3-II. Biotin attenuates 7 β -OHC-induced cytotoxicity: loss of cell adhesion was reduced; antioxidant activities were normalized. ROS overproduction, protein and lipid oxidation products were decreased. Biotin partially restores mitochondrial functions: attenuation of the loss of $\Delta\Psi$ m; reduced levels of mitochondrial O₂^{•-} overproduction; normalization of cardiolipins and organic acid levels. Biotin also normalizes cholesterol and fatty acid synthesis, and prevents apoptosis and autophagy (oxiaptophagy). Our data support that biotin, which prevents oligodendrocytes damages, could be useful in the treatment of neurodegeneration and demyelination.

ARTICLE HISTORY

Received 19 December 2018
Revised 3 April 2019
Accepted 22 April 2019

KEYWORDS

158N oligodendrocytes; 7 β -hydroxycholesterol; apoptosis; autophagy; biotin; lipid metabolism; mitochondria; oxidative stress; oxiaptophagy

Introduction

Oxysterols are oxidized derivatives of cholesterol which can accumulate in the plasma membrane and inside the cell [1]. They have at least one additional oxygen functionality in the chemical structure of cholesterol, either in the ring region or in the side chain [1].

Oxysterols are formed by either spontaneous auto-oxidation of cholesterol, by enzymatic reactions involving cytochrome P450 enzymes, hydroxylases and dehydrogenases, or by both processes [1]. Thus, 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC) can be produced either by auto-oxidation of cholesterol on B hydrocarbon at C7, via

CONTACT Gérard Lizard  gerard.lizard@u-bourgogne.fr  Faculté des Sciences Gabriel, Laboratoire Bio-PeroxiL (EA7270), 6, Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

*These authors equally contributed to the design and management of this study.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

free radicals [1], or by enzymatic synthesis from 7-oxo-cholesterol (also named 7-ketocholesterol (7 kC)), which is catalyzed by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (HSD11B1) [2]. Several studies have highlighted the harmful effects of some oxysterols, particularly in age-related diseases [3]. It is well established that 7 β -OHC is associated with familial combined hyperlipidemia [4]. Moreover, it has been reported that 7 β -OHC is one of the most abundant oxysterols contributing to severe cardiovascular diseases [5], and also to the progression of coronary atherosclerotic plaques and atherosclerosis [6,7]. 7 β -OHC was also found at high levels in the plasma of patients with Smith–Lemli–Opitz syndrome, which is due to a defect in the cholesterol synthesizing enzyme 7-dehydrocholesterol reductase [8], as well as in Niemann–Pick disease type C, which is caused by a lipid trafficking disorder [9].

It is noteworthy that the brain is rich in cholesterol [10], which makes it vulnerable to ROS and to the formation of oxysterols as 7 β -OHC. In Parkinson's disease (PD) abnormally high levels of 7 β -OHC were localized to the visual cortex [11]. In Huntington's disease (HD) increased levels of 7 β -OHC were found in the putamen [12]. In Alzheimer's disease (AD), which is characterized by the accumulation of β -amyloid, produced from the amyloid precursor protein (APP) via a proteolysis reaction, both amyloid- β and APP contribute to the enhancement of the neurotoxic effects of 7 β -OHC [13]. In AD, both 7 β -OHC and 7 kC are abundant [14]. There is now evidence of a progressive myelin breakdown in AD, resulting from oligodendrocyte dysfunction [15]. Myelin is a proteolipidic complex which wraps around the axons and is essential for the transmission of nerve impulse [16]; its composition is \approx 70% lipid and 30% protein including proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP) [17]. Oligodendrocytes, which are myelin-producing cells, are vulnerable to β -amyloid and iron accumulation, considered as risk factors of AD [18]. In addition, 7 kC and 7 β -OHC are associated with demyelinating neurodegenerative diseases such as X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) and multiple sclerosis (MS) [19]. In X-ALD, oxidative stress is one of the most important biomarkers of this disease; it can contribute to cholesterol auto-oxidation leading to the formation of oxysterols such as 7 kC and 7 β -OHC, which may favour the development and the progression of the disease [19]. In MS, which is a neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS) characterized by damage to myelin and nerves destruction [20], the plasma level of 7 kC is increased compared to that of normal individuals. It has also been reported that 7 kC can be converted to 7 β -OHC by HSD11B1 [2]. This

isoenzyme was described in glial (oligodendrocytes, astrocytes) and neuronal cells [21]. In humans, HSD11B1 catalyzes both the conversion of 7 β -OHC to 7 kC and the reciprocal reaction [22]. It is important to underline that these two oxysterols are tightly interdependent and that the biological effects of one of them do not exclude the involvement of the other. Since 7 β -OHC is often associated with diseases which enhanced 7 kC levels, it is thus possible that 7 β -OHC might contribute to the pathology of MS.

Currently, it is supposed that all neurodegenerative diseases have a similar pathoetiology involving oxidative stress, mitochondrial damage, inflammation and/or cell death processes, and it can be hypothesized, based on experimental data, that some oxysterols such as 7 β -OHC can contribute to neurodegeneration [23,24]. As there is considerable evidence supporting a role for 7 β -OHC in demyelinating diseases, it is important to characterize its biological activities. It has been shown that 7 β -OHC triggers an apoptotic mode of cell death in human U937 monocytic cells [25], C6 rat glioma cells [26], human retinal pigment epithelial cells [27], and in 158N murine oligodendrocytes [24]. In 158N cells, 7 β -OHC induces a mode of cell death by oxiapoptophagy, characterized by the induction of oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction leading to a mode of cell death with both apoptotic and autophagic characteristics [24]. Oxiapoptophagy was also observed in 7 kC and 24S-hydroxycholesterol-treated 158N cells [24,28]. Thus, based on its side effects, 7 β -OHC might contribute to demyelinating processes via oligodendrocyte dysfunction.

To oppose the deleterious effect of 7 β -OHC, different strategies can be proposed, they can consist of either (i) degrading 7 β -OHC and/or (ii) inactivating it via sulfonation or esterification with specific enzymes and/or (iii) inhibiting its signalling pathways leading to side effects with natural or synthetic molecules [29]. At the moment, α -tocopherol (the major component of vitamin E) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) are the only molecules that can attenuate the noxious effects of 7 β -OHC [24,30]. Biotin is present in human plasma at 0.25 nM and in the cerebrospinal fluid (CSF) at 0.06 nM [31]. Furthermore, it is used at high doses (300 mg/day/orally; MD1003, MedDay Pharmaceuticals, Paris, France) for the treatment of progressive MS [32]. Under treatment with MD1003, the plasma level of biotin reaches 1.5 μ M 3 hours after oral administration and rapidly decreases, but no information is available on the corresponding levels of biotin in the CSF. However, if we consider that biotin level is 4–5 times lower in the CSF than in the plasma, the maximum biotin content in

the CSF could reach around 300–400 nM with MD1003. Currently, biotin is considered as a promising drug, through its biological activities, and ongoing clinical trials [33]. It has been established that biotin (vitamin B8/vitamin H) acts as a coenzyme for five carboxylases involved in the TCA cycle and the metabolism of fatty acids: acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 (ACC1, ACC2), pyruvate carboxylase (PC), propionyl-CoA carboxylase (PCC) and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) [34]. Indeed, biotin is covalently bound to ϵ -amino group of a specific lysine residue on apocarboxylase. The biotinylation of carboxylases is catalyzed by holo-carboxylase synthetase and requires ATP [35] promoting different carboxylation reactions, which are involved in fatty acid synthesis, glucose metabolism and amino acid catabolism [34]. In addition, biotin regulates the expression of various genes. In a human T cell line (Jurkat cells), biotin regulates the activity of the transcription factor NF- κ B [36]. Biotin is also involved in the control of the expression of asialoglycoprotein receptor and insulin receptor in human hepatoblastoma cells [37]. In the murine macrophage cell line (J774.1) biotin downregulates TNF- α production [38]. Biotin, which is often used as a dietary supplement, also has therapeutic effects for various chronic dermatitis diseases [39] and it decreases hypercholesterolemia [40]. Moreover, it is an efficient treatment for the orphan neurological disease, biotin-thiamine-responsive basal ganglia disease [41]. High doses of biotin (MD1003) used as treatment for X-ALD and MS [33,42], have led to the suggestion that biotin might promote myelin formation in oligodendrocytes and increase the production of brain energy [33] which are considered as an attractive strategy for the treatment of MS in its progressive form [43].

As biotin plays a crucial role in brain chemistry [44], and given its ability to prevent mitochondrial damage [33], we asked whether it was able to prevent 7 β -OHC-induced side effects leading to oligodendrocyte damage, which can contribute to demyelination.

Material and methods

Cell culture and treatments

Murine oligodendrocyte 158N cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Lonza, Amboise, France) containing 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Dutscher, Brumath, France) and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin) (Dutscher).

7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC) was provided by Mohammad Samadi (Metz, France) [45]; quality control was realized with ^1H and ^{13}C NMR spectra obtained

with a Bruker Avance 400 spectrometer; the purity was >99% (Supplementary Figure 1). Stock solutions of 7 β -OHC were prepared in absolute ethanol at 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2 mM), sonicated for 10 min and stored at 4 °C. Biotin (Sigma-Aldrich) stock solution was prepared at 0.5 mM in the culture medium, vortexed and then stored at –20 °C. Vitamin E (α -tocopherol, ref: T3251, Sigma-Aldrich) was prepared at 80 mM in absolute ethanol (used at 400 μM), as described previously [30]. Murine oligodendrocytes 158N were seeded either in six-well plates at 30,000 cells per cm^2 (240,000 cells per well of 6 wells plates) with 2 mL of DMEM, or in Petri dishes (10-cm diameter) at 30,000 cells/ cm^2 (2.35×10^6 cells per Petri dish) with 10 mL of DMEM, and then incubated in a humidified atmosphere (5% CO_2 , 95% air) at 37 °C. Cells were trypsinized (0.05% trypsin-0.02% EDTA solution) and passaged twice a week.

In all experiments, after 24 h of culture, 158N cells were incubated with 7 β -OHC (50 μM) for 24 h with or without biotin (1, 10, 100 and/or 1000 nM), or α -tocopherol (400 μM) as a positive control. Biotin and α -tocopherol were added 2 h before 7 β -OHC. Additional experiments were performed to assess the effect of biotin in the recovery of 7 β -OHC (50 μM)-induced cell death. In these experiments, after 24 h of culture, 158N cells were incubated with 7 β -OHC (50 μM) for 6 and 10 h before the addition of biotin (10 and 100 nM), or α -tocopherol (400 μM); the cells were subsequently incubated with 7 β -OHC associated with biotin or α -tocopherol for an 18 and 14 h additional period of time. The choice of the 7 β -OHC concentration (50 μM) is based on the previous study by Ragot et al. [30].

Analysis of cell morphology by phase contrast microscopy

After 24 h of treatment with or without 7 β -OHC (50 μM) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μM), cell morphology and cell density of 158N cells were determined by phase contrast microscopy using an inverted-phase contrast microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Jena, Germany). Digitalized images were obtained with an AxioCam ICm1 camera (Zeiss) with AxioVision software (Zeiss).

Analysis of cell adherence by crystal violet staining

The crystal violet assay was used to quantify adherent cells [46]. 158N cells were cultured with or without 7 β -OHC (50 μM) in the presence or absence of biotin (10 or 100 nM), or α -tocopherol (400 μM) for 24 h. At the end

of the treatment, adherent cells were washed, then stained with crystal violet (Sigma-Aldrich) for 5 min, and rinsed three times with distilled water. After drying, crystal violet was dissolved with 0.1% sodium citrate (Sigma-Aldrich) diluted in 50% ethanol (Carlo Erba, Val de Reuil, France), and the absorbance was read at 570 nm using a microplate reader (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France).

Evaluation of mitochondrial status

Evaluation of mitochondrial transmembrane potential with DiOC₆(3)

Variations in transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) were assessed by flow cytometry with the cationic lipophilic dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide DiOC₆(3) (Thermo Fisher Scientific, Montigny le Bretonneux, France) [30,47]. At the end of the treatment, adherent and nonadherent cells were pooled and stained with DiOC₆(3) (40 nM, 15 min, 37 °C). The loss of $\Delta\Psi_m$ is indicated by a decrease of green fluorescence intensity collected through a 520 ± 10 nm band pass filter. Ten thousand cells per sample were collected on a Galaxy flow cytometer (Partec, Münster, Germany), and data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA).

Evaluation of mitochondrial mass with MitoTracker Red

Mitochondrial mass was measured after staining with MitoTracker Red (Thermo Fischer Scientific). Adherent and nonadherent cells were pooled, washed with prewarmed DMEM (37 °C) without FBS and then incubated (30 min, 37 °C) with MitoTracker Red solution (100 nM), which was prepared in DMEM without FBS. At the end of incubation, cells were pelleted by centrifugation and resuspended in fresh prewarmed DMEM for analysis by flow cytometry. The fluorescent signals were collected through a 580/20 nm bandpass filter on a FACS Aria III flow cytometer (Becton, Dickinson, San-Jose, CA, USA). Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc).

Measurement of mitochondrial production of reactive oxygen species with MitoSOX

The mitochondrial production of O₂^{•-} was quantified by flow cytometry after staining with MitoSOX (Thermo Fisher Scientific), which accumulates in the mitochondria [48]. Once in the mitochondria, this probe is oxidized by O₂^{•-}, and exhibits orange/red fluorescence (λ_{Ex} Max = 510 nm; λ_{Em} Max = 580 nm). At the end of the treatment, adherent and nonadherent cells were

polled and incubated with MitoSOX (5 μM, 15 min, 37 °C). The fluorescent signals were collected through a 580 ± 20-nm band pass filter on a FACS Aria III flow cytometer (Becton, Dickinson). Ten thousand cells were acquired and data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc).

Characterization and analysis of cardiolipin levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The analysis and quantification of cardiolipins were realized by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on an Agilent 6460 QqQ mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total lipids were extracted as previously described by Folch et al. [49], then solubilized in 100 μL of chloroform/methanol/water. The isolation of mitochondria was not required for cardiolipins quantification, since these phospholipids are only present in this organelle. Around 10 μL of extracted lipids were used for lipidomic analysis as previously described by Vial et al. [50]. Lipid standards and chemicals of the highest grade available were from Avanti Polar Lipids (Coger SAS, Paris, France) and Sigma-Aldrich. LC-MS/MS quality grade solvents were from Thermo Fischer Scientific.

Analysis of organics acids, sterols and fatty acids by gas chromatography coupled with mass spectrometry

Organic acid, sterol and fatty acid profiles were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) as previously described [51]. Total cellular lipids were extracted by the Folch's method [49].

For analysis of organic acids, cellular homogenates were added to a screw-capped vial together with deuterium-labelled or structurally homologous internal standards, and butylated hydroxytoluene (BHT) and EDTA. Vials were sealed with a Teflon septum and their contents were rinsed with argon for 20 min to remove air. Alkaline hydrolysis was allowed to proceed at room temperature (20 °C) with magnetic stirring for 30 min in the presence of 0.5 M ethanolic potassium hydroxide solution.

Sterols were collected by liquid-liquid extraction in the presence of hexane. After termination of alkaline hydrolysis by adjusting pH to acidic conditions with HCl, all metabolites were extracted in sequential liquid to liquid extraction with hexane and ethyl acetate. The organic solvents were evaporated under a gentle stream of argon, and converted to trimethylsilyl ethers

with bistrimethylsilylfluoroacetamide (BSTFA) with trimethylchloro-silane (TMCS) 1% (Pierce/Thermo Fisher Scientific).

GC-MS analysis was performed on a Clarus 600-D spectrometer (Perkin Elmer, USA). The GC was equipped with an Elite column (30 m × 0.32 mm id × 0.25 mm film; Perkin Elmer, USA) and injection was performed in splitless mode using helium (1 mL/min) as carrier gas. The temperature program was as follows: initial temperature of 80 °C was held for 1 min, followed by a linear ramp of 10 °C/min to 220 °C, 20 °C/min to 280 °C and 5 °C/min up to 290 °C, which was held for 10 min. The mass spectrometer operates in full mass scan or selected ion-monitoring mode. Peak integration was performed manually, and metabolites were quantified from selected-ion monitoring analyses against internal standards using standard curves for the listed sterols [51,52].

Evaluation of redox status

Evaluation of antioxidant enzymes activities: glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined according to the method of Flohé and Günzler's [53]. At the end of the treatment, 158N cells were collected by trypsinization, and lysed by sonication. Cell lysates were incubated with 0.1 mM of reduced glutathione (GSH) and phosphate buffer saline (50 mM, pH 7.8). The reaction was initiated by addition of H₂O₂, and stopped by incubation with trichloroacetic acid (TCA 1%, 30 min, 4 °C), and then centrifuged at 1000 g for 10 min. The absorbance was read spectrophotometrically at 412 nm (Lambda 25 Spectrophotometer, PerkinElmer, Villebon Sur Yvette, France). GPx activity was expressed relative to the protein content, which was determined by the Bradford method [54].

Cellular superoxide dismutase (SOD) activity was quantified as described previously [55]. This method is based on the ability of SOD to reduce cytochrome c-oxidation, induced by superoxide anions. SOD activity was measured at 550 nm at 20-min intervals for at least five readings, and expressed relative to the protein content.

Catalase (CAT) activity was determined by measuring the consumption of H₂O₂ at 240 nm. At the end of treatment, cells were trypsinized, and incubated with 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,

Indianapolis, IN, USA) for 30 min on ice. Cells lysates were collected after centrifugation (12,000 g, 20 min, 4 °C). The reaction was initiated by the addition of Tris-HCl (1 M, pH 7.4), MilliQ H₂O and H₂O₂ (400 mM) (1:1:17) and the consumption of H₂O₂ (240 nm) was followed for 2 min, using a microplate reader (Tecan Infinite M200 Pro). Catalase activity was expressed relative to the protein content determined with the bicinchoninic acid (Thermo Fisher Scientific).

Measurement of the level of thiol groups

Thiol (SH) groups play a potent role in the protection against free radicals. SH group levels were measured as described by Flaure and Lafon [56]. At the end of the treatment, cellular lysates were mixed with 5-5' DiThiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated in the dark at room temperature for 15 min. The absorbance of the resulting product was read spectrophotometrically at 415 nm on a Lambda 25 Spectrophotometer (PerkinElmer).

Measurement of reactive oxygen species production

The overproduction of ROS was quantified by flow cytometry after staining with dihydroethidium (DHE; Thermo Fisher Scientific), which was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and used at 2 μM. DHE is a widely used sensitive O₂^{•-} probe; once in the cell, DHE oxidation yields at least two fluorescent products, 2-hydroxyethidium, and ethidium, which exhibits an orange/red fluorescence (λ_{Ex} Max = 488 nm; λ_{Em} Max = 575 nm) [57,58]. ROS overproduction was also quantified with a lipophilic fluorochrome: dihydrorhodamine 123 (DHR123, Sigma-Aldrich) used at 6 μM. DHR123 is mainly oxidized by the action of H₂O₂, on rhodamine 123 (λ_{Ex} Max = 505 nm; λ_{Em} Max = 529 nm) [48,59]. Fluorescent signals of DHE and DHR123 were collected with 590 and 520/20 nm bandpass filters, respectively. Ten thousand cells were acquired from each sample on a Galaxy (Partec) flow cytometer. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc).

Measurement of lipid peroxidation products: conjugated dienes and malondialdehyde

Lipid oxidation was determined by the measurement of lipid peroxidation products as conjugated dienes (CDs) and malondialdehyde (MDA). CDs were measured as previously described by Esterbauer et al. [60]. At the end of the treatment, cells were lysed by sonication and centrifuged (20,000 g, 30 min, 4 °C). Lipids were extracted with a chloroform-methanol (2:1) mixture.

Extracted lipids were dissolved in hexane and absorbance was measured at 243 nm.

The malondialdehyde (MDA) was evaluated as described by Yoshioka et al. [61]. Proteins were precipitated in the presence of trichloroacetic acid (TCA, 20%). Thiobarbituric acid (TBA, 0.67%) was then added, and the mixture was incubated for 30 min at 95 °C. Thereafter, 4 mL of n-butanol was added and the absorbance (optical density (OD)) was spectrophotometrically read at 530 nm. The total MDA concentrations were expressed in nmol/mg of protein by using the Beer-Lambert law:

$$[\text{MDA concentration}] = \text{OD}/(\varepsilon * L)$$

L = distance of the light travel through the solution = 1 cm (width of the cuvette)

$$\varepsilon_{\text{M}}(\text{MDA}) = 1.56 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Measurement of protein oxidation products: carbonylated proteins

Carbonylated proteins (CPs) were measured according to the method of Oliver et al. [62], which is based on the formation of hydrazones in proteins, due to the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) with CPs. Cell lysates were incubated with DNPH (10 mM in 2.5 N HCl) in the dark for 1 h under agitation every 15 min. At the end of the incubation, 20% of trichloroacetic acid (TCA) was added, and the tubes were centrifuged (1800 g, 5 min). The precipitates were washed twice with TCA (10%) and ethanol–ethyl acetate (V:V) solution, and then incubated with a guanidine hydrochloride solution (6M) for 10 min at 37 °C. The absorbance was measured at 370 nm using a Lambda 25 Spectrophotometer (PerkinElmer).

Evaluation and characterization of cell death

MTT assay

The MTT colorimetric assay was used to evaluate the ability of cells to reduce tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) to a blue formazan by succinate dehydrogenase, which is a mitochondrial enzyme. Only metabolically active cells can transform MTT into formazan. The MTT assay, which reflects cell viability (mitochondrial activity) and/or cell growth, was carried as described previously [63] on 158N cells cultured in 6-well plates and treated for 24 h with biotin (1, 10, 100 and/or 1000 nM), or α -tocopherol (400 μ M) in the presence or absence of 7 β -OHC (50 μ M). After 3 h of incubation with the MTT substrate (37 °C, 5% CO₂), the

absorbance was read at 570 nm with a microplate reader (Tecan, Sunrise, Tecan, Lyon, France). MTT data interpretation was realized by comparison with data obtained by cell counting in the presence of trypan blue.

Cell counting with trypan blue

After 24 h of treatment, with or without 7 β -OHC (50 μ M) in presence or absence of biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μ M), both adherent and nonadherent cells were collected by trypsinization. The total number of viable cells was counted with a Mallasez counting chamber in the presence of trypan blue (V/V) (Axiovert 40 CFL, Zeiss).

Identification of living cells by staining with fluorescein diacetate

Only living cells are able to transform the fluorescein diacetate (FDA) on fluorescein through esterase activity [64]. 158N cells were treated for 24 h with or without 7 β -OHC (50 μ M) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μ M). At the end of the treatment, 158N cells were incubated with FDA (50 μ M, 5 min, 37 °C), then lysed with 10 mM of Tris-HCl solution containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Fluorescence intensity (λ_{Ex} Max: 485 nm, λ_{Em} Max: 528 nm) was measured with a Tecan fluorescence microplate reader (Tecan Infinite M200 Pro, Lyon, France). Cell viability determined with FDA is expressed as % control: (fluorescence value in the assay)/(fluorescence value in the control).

Evaluation of cellular permeability and cell death by staining with propidium iodide

Propidium iodide (PI) was used to evaluate cell death and plasma membrane permeability, due to its ability to enter in cells with damaged and permeable plasma membranes, considered as dead cells [65,66]. Adherent and nonadherent cells were pooled, stained with 1 μ g/mL of PI (15 min, 37 °C) and analyzed with a Galaxy flow cytometer (Partec). Fluorescence was collected through a 590/10 bandpass filter and 10,000 cells were acquired. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc).

LDH measurement

158N cells were treated with or without 7 β -OHC (50 μ M) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μ M). At the end of the treatment, culture medium was collected and

centrifuged. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was quantified using a commercially available kit (#ab102526, Abcam, Paris, France) allowing to measurement of LDH activity at a wavelength of 450 nm in a kinetic mode at 25 °C for 30–60 min, using a microplate reader (Tecan Infinite M200 Pro).

Nuclei staining with Giemsa and Hoechst 33 342

Nuclear morphology was evaluated after staining with Giemsa and Hoechst 33 342. 158N cells were treated in the presence or absence of 7 β -OHC (50 μ M) with or without biotin (10 and 100 nM), or α -tocopherol (400 μ M). At the end of treatment, 40,000 cells were deposited onto glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1500 rpm) with a cytospin 2 (Shandon, Sheshire, UK), and then fixed 5 min with methanol. After staining with Giemsa for 6 min at room temperature, the preparations were washed, mounted with a Dako mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark), and stored at 4 °C until observation. Nuclear morphology was also determined after staining with Hoechst 33,342 (2 μ g/mL) [30]. For each sample, 300 cells were counted to determine, the percentage of apoptotic cells. Normal cells have regular and round nuclei whereas apoptotic cells have condensed and/or fragmented nuclei [65].

Measurement of lysosomal integrity with acridine orange

The integrity of lysosomes was quantified based on their acidity, by flow cytometry after staining with the lysosomotropic acidic probe (acridine orange (AO); λ_{Ex} Max: 500 nm; λ_{Em} Max: 526 nm) [67]. In acidic conditions, AO emits an orange/red fluorescence, when excited by a blue light [68]. 158N cells were treated with 7 β -OHC (50 μ M) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM), or α -tocopherol (400 μ M). At the end of the treatment, adherent and nonadherent cells were pooled and incubated with AO (5 μ g/mL) for 15 min at 37 °C, and then were analyzed on a Galaxy (Partec) flow cytometer. The orange fluorescence of AO was collected with a 590/20 nm bandpass filter, and measured on a logarithmic scale. Ten thousand cells were collected. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc).

Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting analysis

After 24 h of treatment, adherent and nonadherent cells were trypsinized and incubated for 30 min on ice in RIPA buffer containing a complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). After centrifugation (20 min, 10,000 g), the supernatant was collected

and the protein concentration was measured using bicinchoninic acid reagent (Thermo Fisher Scientific). Seventy micrograms of protein were diluted in a 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 SDS-PAGE gel, and transferred into a nitrocellulose membrane (Thermo Fischer Scientific). Nonspecific binding sites were blocked by incubation with 5% milk powder in PBST (PBS, 0.1% Tween 20, pH 7.2) and the membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody diluted in 5% milk in PBST. For apoptosis and autophagy analysis, the antibodies used were directed against caspase-3 (Ozyme/Cell Signaling #9662) (for detection of the endogenous level of full length caspase-3 (35 kDa) and its large cleavage product (17 kDa)), and LC3-I/II (#L8918, Sigma Aldrich) (detecting LC3-I (18 kDa) and LC3-II (16 kDa)), respectively; all antibodies were rabbit polyclonal antibodies; they were used at a final dilution of 1/1000. For myelin proteins analysis (PLP and MBP); PLP expression was determined with a rabbit polyclonal antibody (PLP; Novus, NB10074503) and MBP expression with a mouse monoclonal antibody (MBP; Millipore, MAB381). An antibody directed against β -actin (mouse monoclonal antibody (#A2228, Sigma Aldrich)) was used at a final concentration of 1/10,000. Membranes were washed three times for 5 min, with PBST and incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (for caspase-3, LC3-I/II, and PLP) diluted at 1/5000 in 1% milk powder in PBST or antimouse antibody against MBP or β -actin, diluted at 1/5000 in 1% milk powder in PBST. The membranes were then washed and antibody binding revealed using an enhanced chemiluminescence detection kit (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific) and Chemidoc XRS+ (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Band intensity was determined with Image Lab software (Bio-Rad).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the statistical Package for Social Sciences SPSS 21.0 with the nonparametric Mann–Whitney test. Data were considered statistically significant at a *p*-value of 0.05 or less.

Results

Evaluation of the effects of biotin on cell morphology and cell adhesion

Initially, we determined whether biotin was able to prevent 7 β -OHC-induced cytotoxicity. To this end, the concentration dependence of biotin on the cytotoxicity of

7 β -OHC was determined using the MTT assay: after 24 h of culture, 158N cells were incubated with 7 β -OHC (50 μ M) for 24 h with or without biotin (1, 10, 100 and 1000 nM); biotin was added 2 h before 7 β -OHC. Under these conditions, 7 β -OHC-induced cytotoxicity was only prevented with biotin at concentrations of 10, 100 and 1000 nM (Supplementary Figure 2). The cytoprotection was similar with these three concentrations. Therefore, further experiments were only performed using biotin at concentrations of 10 and 100 nM. So, the morphological study realized by phase microscopy was done on 158N cells treated with 7 β -OHC (50 μ M, 24 h) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM), or α -tocopherol (400 μ M), used as positive control. Marked effects of biotin on cell adhesion and cell growth were

apparent in images taken from the center of culture wells (Figure 1). With 7 β -OHC, there were increased numbers of floating cells and reduced number of adherent cells, indicating a loss of cell adherence. However, when 7 β -OHC was added with biotin (10 and 100 nM), the normal morphology and the cell adherence of 158N cells was restored and there was a marked decrease in the number of floating cells (non-adherent cells) (Figure 1(A)). Moreover, the impact of biotin on cell adhesion was further evaluated using the crystal violet assay. Under treatment with 7 β -OHC, there was a significant decrease in the percentage of adherent cells compared to vehicle-treated and control cells (Figure 1(B)). When 7 β -OHC was added with biotin, there was a significant increase in adherent cells

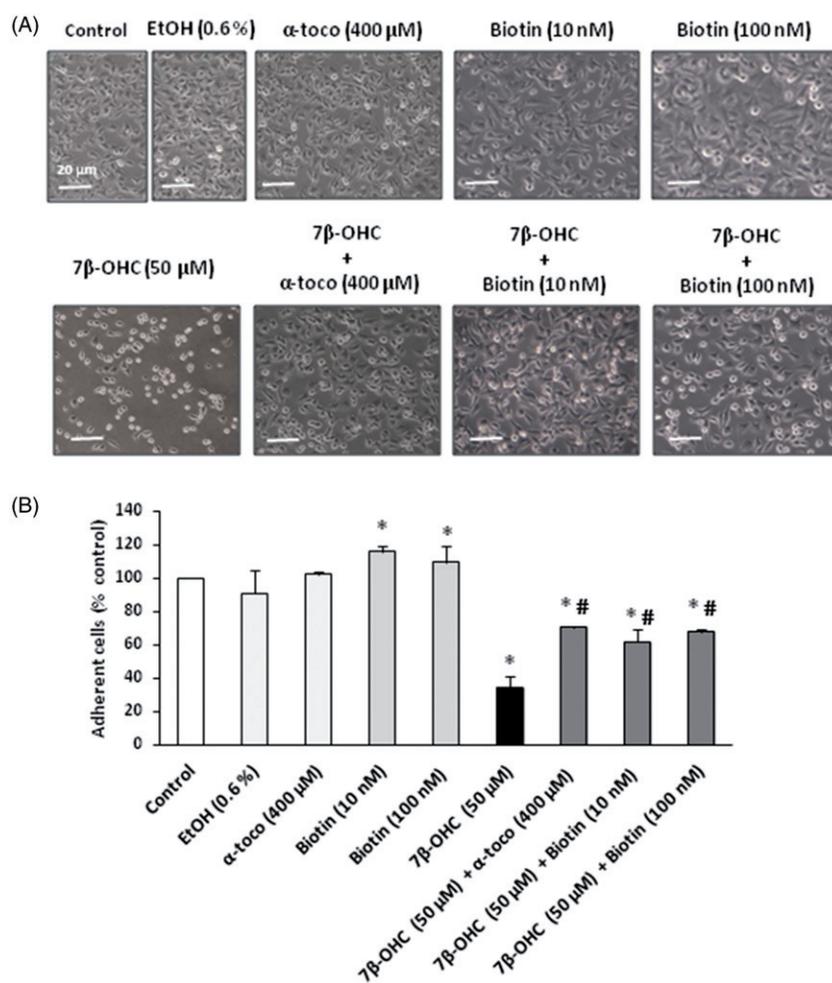


Figure 1. Effect of 7 β -hydroxycholesterol and biotin on cell growth and adherence. 158N cells were cultured for 24 h in the presence or absence of 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC, 50 μ M) with or without biotin (10, 100 nM), or α -tocopherol (400 μ M). The effects on cell growth and cell adherence were determined by phase contrast microscopy (A) and crystal violet staining (B). Data shown are mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%). The statistical significance of the differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%) was estimated using the Mann–Whitney test: * $p \leq 0.05$. Significance of the differences between 7 β -OHC-treated cells and (7 β -OHC + biotin (10 nM)), (7 β -OHC + biotin (100 nM)) or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; Mann–Whitney test: # $p \leq 0.05$.

compared to 7 β -OHC alone; these effects are comparable to those observed with α -tocopherol (Figure 1(A–B)).

Cytoprotective effects of biotin

To evaluate the impact of biotin on 7 β -OHC-induced loss of membrane integrity and cell death, 158N cells were cultured with or without 7 β -OHC in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM) and further stained either with MTT, trypan blue, fluorescein diacetate (FDA), or propidium iodide (PI).

The percentage of MTT positive cells (defined by the ratio % MTT positive cells in the assay/% MTT positive cells in the control) was significantly decreased with

7 β -OHC (50 μ M) compared to control and vehicle-treated cells (Figure 2(A)). When 7 β -OHC was added with biotin (10 and 100 nM), this ratio was significantly increased compared to 7 β -OHC alone; similar effects were observed with α -tocopherol (400 μ M). In addition, a significant decrease in the total number of living cells was shown under treatment with 7 β -OHC by counting the living cells in the presence of trypan blue (Figure 2(B)). In the presence of 7 β -OHC, biotin (10 and 100 nM) significantly increased cell viability (Figure 2(B)). Thus, the data obtained with the MTT test (A) associated with cell counting in the presence of trypan blue (B) demonstrate that biotin prevents 7 β -OHC-induced cell death and restores cell growth. After staining with FDA, there was also a marked decrease of FDA positive cells

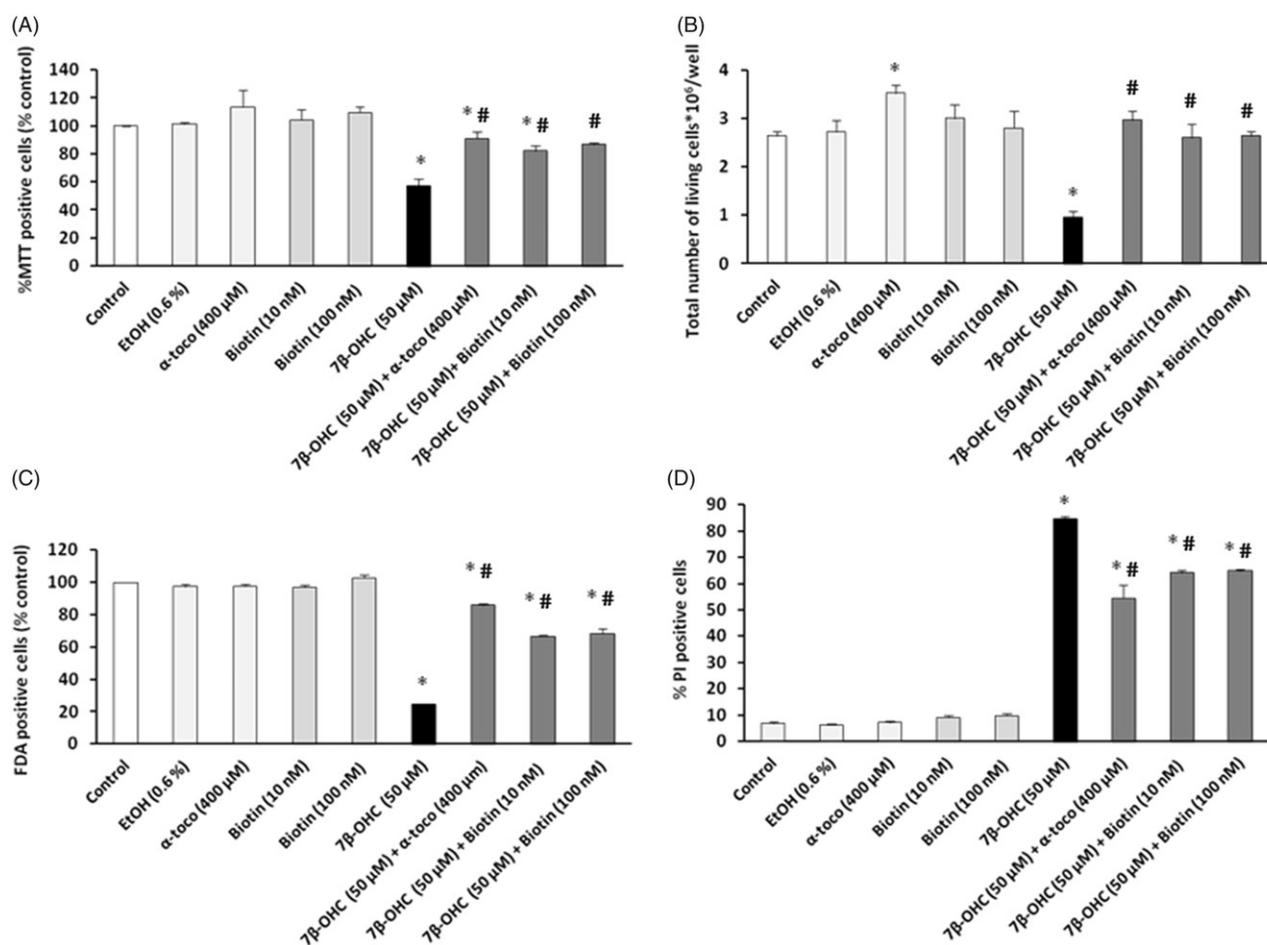


Figure 2. Effect of 7 β -OHC and biotin on cell viability and plasma membrane integrity. 158N cells were cultured for 24 h in the presence or absence of 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC, 50 μ M) with or without biotin (10 and 100 nM), or α -tocopherol (400 μ M). The effects on succinate dehydrogenase activity were evaluated with the MTT test (A), the impact on cell viability was evaluated by the counting of living cells after staining with trypan blue (B), the effect on plasma membrane esterase activity was measured with the FDA assay allowing to quantify esterase activity (C), the plasma membrane permeability was measured after staining with propidium iodide (PI) (% of PI-positive cells) (D). Data shown are mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol 0.6%). Significant differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%): * $p \leq 0.05$. Significant differences between 7 β -OHC-treated cells and (7 β -OHC + biotin (10 nM)), (7 β -OHC + biotin (100 nM)) or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; # $p \leq 0.05$.

(considered as living cells) in 7 β -OHC-treated cells compared to control and vehicle-treated cells (Figure 2(C)). These observations are consistent with the results obtained after staining with PI, which show in 7 β -OHC-treated cells, a higher percentage of PI-positive cells (more than 70% of PI-positive cells), corresponding to cells with altered plasma membrane and/or dead cells (Figure 2(D)). A significant decrease in the percentage of PI-positive cells was also observed when biotin (10 and 100 nM) was added to 7 β -OHC compared to 7 β -OHC alone (Figure 2(D)).

Thus, biotin, used at 10 and 100 nM, was able to attenuate 7 β -OHC-induced loss of membrane integrity with an efficiency which was similar to that observed with α -tocopherol (400 μ M) (Figure 2(A–D)).

Biotin prevents 7 β -hydroxycholesterol-induced disruption of redox status

There are several lines of evidence that oxidative stress is one of the major events involved in neurodegenerative demyelinating diseases, such as MS [69,70]. In this context, we examined the effect of 7 β -OHC and biotin on ROS overproduction ($O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2), antioxidant activities (glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities), lipid peroxidation products (malondialdehyde (MDA) and

conjugated dienes (CDs)), and protein oxidation products (carbonylated proteins (CPs) and SH group level).

The quantification of ROS production, including $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 , was evaluated by flow cytometry after staining with DHE and DHR123, respectively. The highest percentages of DHE and DHR123 positive cells were observed following 7 β -OHC-treatment (Figure 3(A,B)). This increase was significantly attenuated by biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μ M) (Figure 3(A,B)).

Under treatment with 7 β -OHC (50 μ M), a marked increase of GPx, SOD and CAT activities was also observed compared to control and vehicle-treated cells (Figure 4(A–C)). Under the same conditions, a significant reduction of SH groups was observed compared to control and vehicle-treated cells (Figure 4(D)). When 158N cells were exposed to biotin (10 and 100 nM) prior to addition of 7 β -OHC, a significant increase on GPx and SOD activities as well as of SH groups was observed, compared to 7 β -OHC alone and similar effects were observed with α -tocopherol (400 μ M) (Figure 4(A,B,D)). The CAT activity was reduced when biotin (10 and 100 nM) was added with 7 β -OHC, and increased CAT activity was observed when α -tocopherol (400 μ M) was associated with 7 β -OHC (Figure 4(C)).

In addition, colourimetric methods of analysis were used to evaluate lipid and protein oxidation products. A marked increase of CDs and MDA levels (reflecting lipid

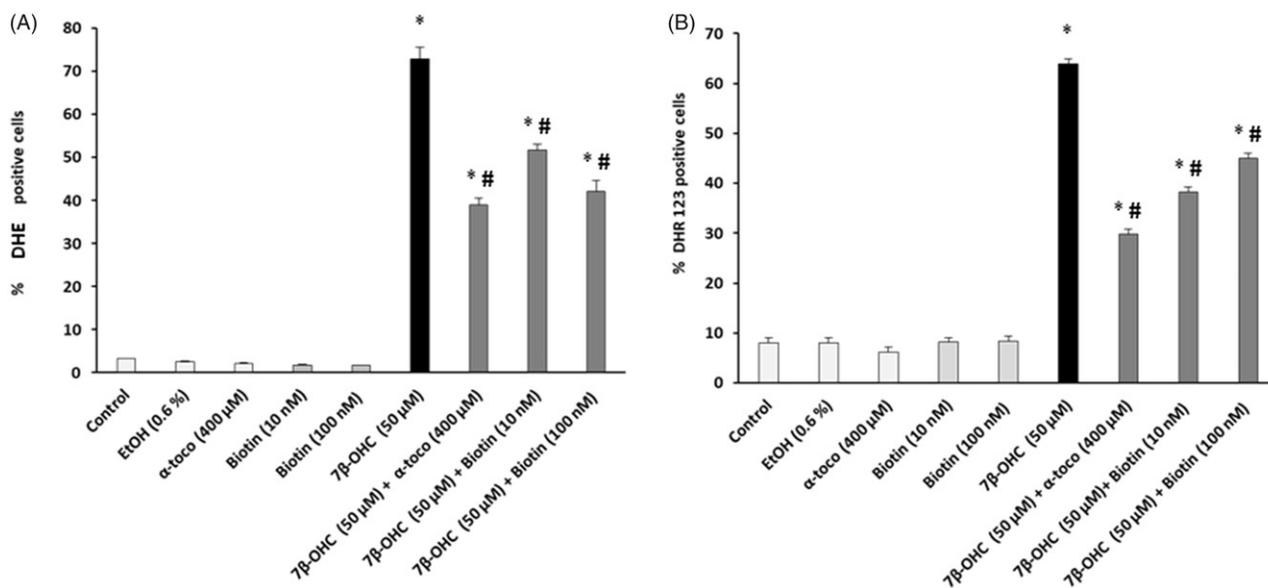


Figure 3. Effect of biotin on 7 β -hydroxycholesterol-induced ROS production. 158N cells were cultured for 24 h with or without 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC; 50 μ M) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM), or α -tocopherol (400 μ M). % DHE positive cells, including superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) production, and % DHR 123 positive cells, including hydrogen peroxide (H_2O_2) production, were detected by flow cytometry after staining with DHE (A) and DHR123 (B), respectively. Data shown are mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol 0.6%). Significant differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%): * $p \leq 0.05$. Significant differences between 7 β -OHC-treated cells and (7 β -OHC + biotin (10 nM)), (7 β -OHC + biotin (100 nM)) or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; # $p \leq 0.05$.

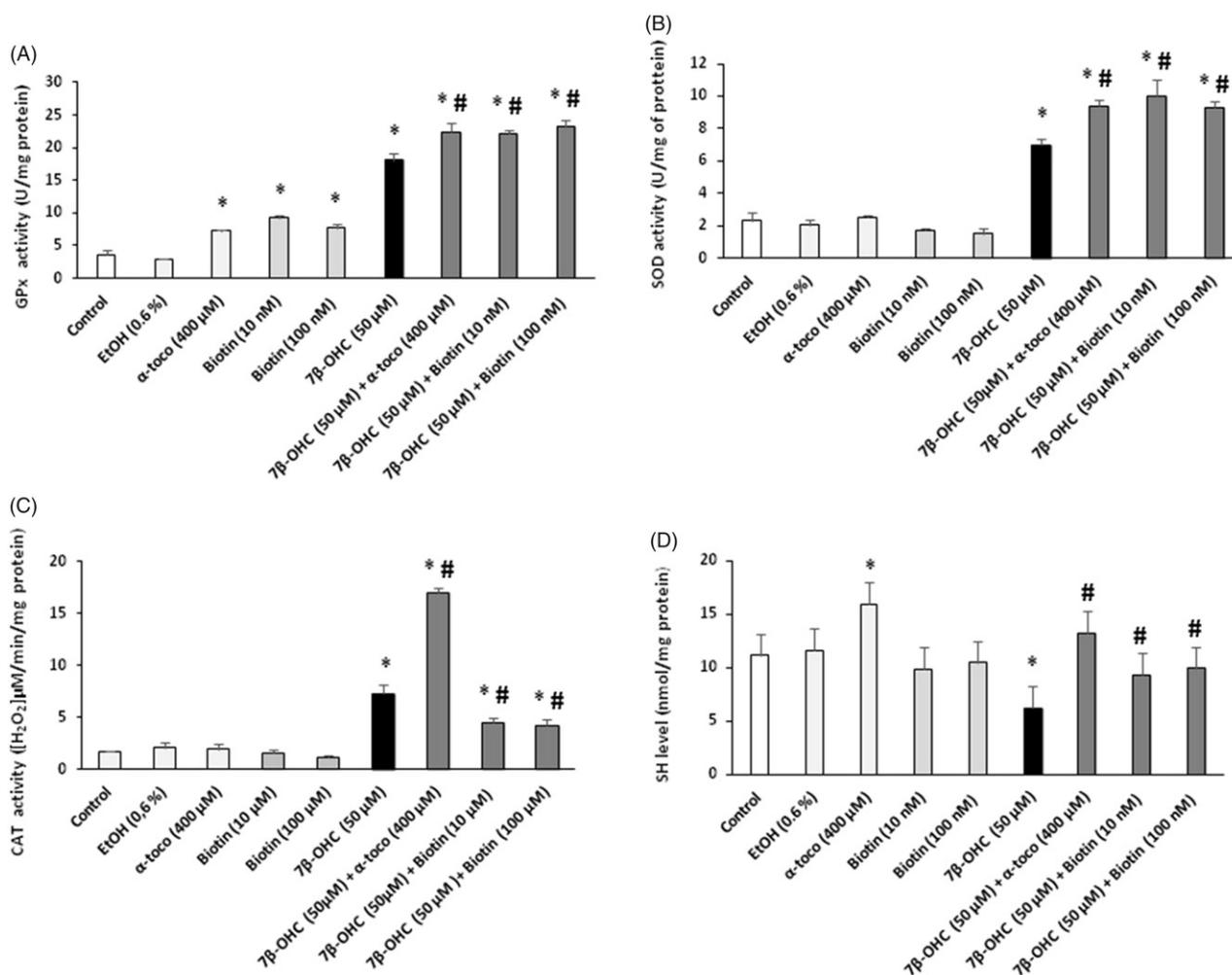


Figure 4. Effect of biotin and 7 β -hydroxycholesterol on oxidative stress. 158N cells were incubated for 24 h with or without 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC, 50 μ M) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μ M). The effects on antioxidant enzymes activities were determined by colourimetric assays with the measurement of glutathione peroxidase (GPx) activity (A), superoxide dismutase (SOD) activity (B), and catalase (CAT) activity (C), as well as by the measurement of SH group (D). Data shown are mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%). Significant differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%): * $p \leq 0.05$. Significant differences between 7 β -OHC-treated cells and (7 β -OHC + biotin (10 nM)), (7 β -OHC + biotin (100 nM)) or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; # $p \leq 0.05$.

peroxidation) as well as of CPs (indicating protein oxidation) were observed in 7 β -OHC-treated 158N cells, compared to control and vehicle-treated cells (Figure 5). This increase was significantly reduced when cells were incubated with 7 β -OHC in the presence of biotin (10 and 100 nM), compared to treatment with 7 β -OHC alone (Figure 5).

Biotin prevents 7 β -hydroxycholesterol-induced mitochondrial damage

As mitochondria contribute to different mechanisms leading to cell death and to the enhancement of oxidative stress [70], it was important to evaluate the effect

of biotin at the mitochondrial level in 7 β -OHC-treated 158N cells. To this end, the transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi$ m) was measured by flow cytometry after staining with DiOC₆(3); cardiolipin level was quantified by LC-MS; mitochondrial mass was measured by flow cytometry with MitoTracker Red; overproduction of O₂^{•-} was quantified by flow cytometry after staining with MitoSOX.

The effect of biotin on 7 β -OHC-induced loss of $\Delta\Psi$ m revealed that the highest value of DiOC₆(3) negative cells (cells with depolarized mitochondria) was observed with 7 β -OHC-treated-cells (Figure 6(A)). Biotin (10 and 100 nM) strongly attenuated the loss of $\Delta\Psi$ m, as did α -tocopherol (400 μ M) (Figure 6(A)).

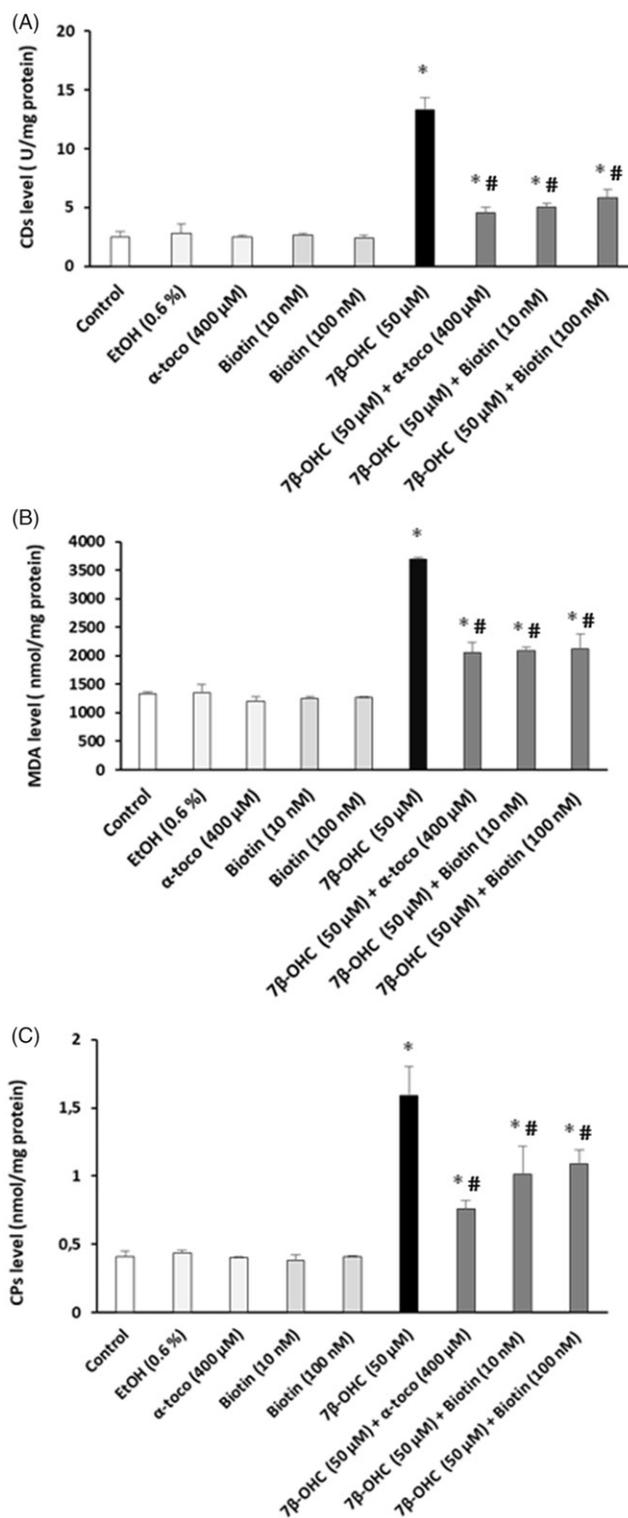


Figure 5. Effect of biotin on 7 β -hydroxycholesterol-induced lipid peroxidation products and carbonylated protein formation. 158N cells were cultured for 24 h with or without 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC, 50 μ M) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μ M). The effects on lipid peroxidation product formation were evaluated by the measurement of conjugated dienes (CDs) (A), and malondialdehyde (MDA) (B) levels. The impact on protein oxidation was evaluated by the measurement of carbonylated protein levels (C). Data shown are mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol 0.6%). Significant differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%): * $p \leq 0.05$. Significant differences between 7 β -OHC-treated cells and (7 β -OHC + biotin (10 nM)), (7 β -OHC + biotin (100 nM)) or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; # $p \leq 0.05$.

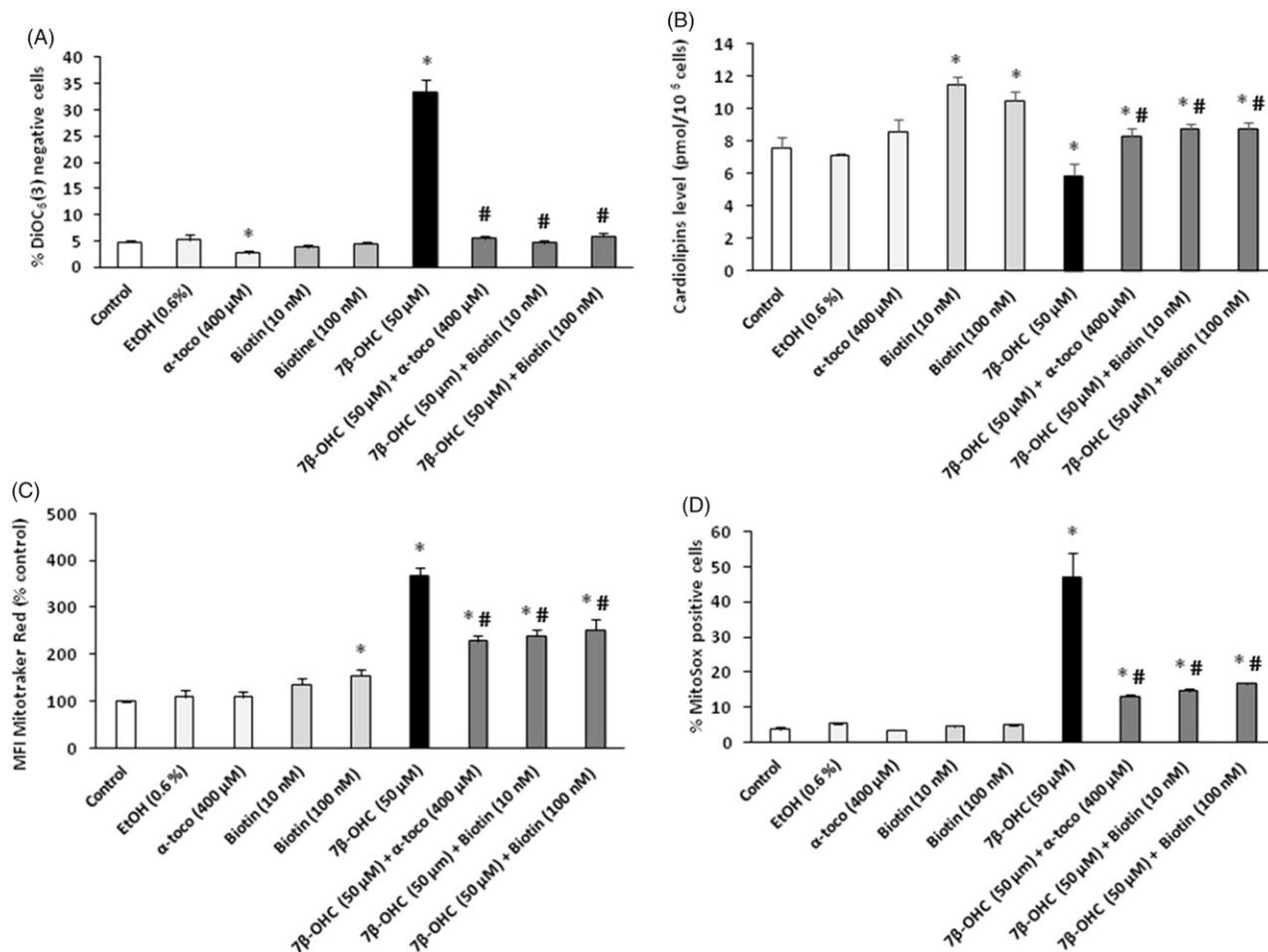


Figure 6. Effect of biotin on 7β-hydroxycholesterol-induced mitochondrial damage. 158N cells were cultured for 24 h with or without 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC, 50 μM) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM) or α-tocopherol (400 μM). The transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\psi_m$) was measured by flow cytometry after staining with DiOC₃ (3) (A), cardiolipin levels were determined by GC-MS (B), the mitochondrial mass was determined by flow cytometry after staining with MitoTracker Red (C), and mitochondrial superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) overproduction was evaluated by flow cytometry after staining with MitoSOX (D). Data shown are mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol 0.6%). Significant differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%): * $p \leq 0.05$. Significant differences between 7β-OHC-treated cells and (7β-OHC + biotin (10 nM)), (7β-OHC + biotin (100 nM)) or (7β-OHC + α-tocopherol)-treated cells; # $p \leq 0.05$.

Table 1. Organic acid profile in 158N cells exposed to 7β-hydroxycholesterol without or with biotin.

	Organic acids					
	Glycolysis		TCA cycle			
	Lactic acid	Pyruvic acid	Succinic acid	Fumaric acid	Malic acid	Citric acid
Control	126.98 \pm 7.99	15.27 \pm 0.36	7.55 \pm 0.11	1.33 \pm 0.04	3.69 \pm 0.1	4.79 \pm 0.2
Vehicle (EtOH: 0.6%)	122.64 \pm 3.53	14.13 \pm 0.5	6.82 \pm 0.05	1.22 \pm 0.06	2.54 \pm 0.08	3.84 \pm 0.11
Biotin (10 nM)	104.40 \pm 9.81	16.16 \pm 0.01	9.01 \pm 0.3	1.59 \pm 0.05	4.62 \pm 0.08	4.52 \pm 0.45
Biotin (100 nM)	110.75 \pm 6.59	14.96 \pm 0.65	8.61 \pm 0.4	1.66 \pm 0.14	4.30 \pm 0.15	4.35 \pm 0.27
7β-OHC (50 μM)	220.59 \pm 2.5 ^a	8.11 \pm 0.06 ^a	5.46 \pm 0.01 ^a	0.93 \pm 0.02 ^a	1.75 \pm 0.08 ^a	2.80 \pm 0.25 ^a
7β-OHC + Biotin (10 nM)	127.85 \pm 7.09 ^b	18.86 \pm 0.43 ^b	11.57 \pm 0.23 ^b	1.83 \pm 0.17 ^b	4.48 \pm 0.17 ^b	3.56 \pm 0.35 ^b
7β-OHC + Biotin (100 nM)	104.98 \pm 2.27 ^b	17.48 \pm 0.5 ^b	14.92 \pm 0.8 ^b	2.24 \pm 0.06 ^b	5.63 \pm 0.19 ^b	4.95 \pm 0.00 ^b

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. significant difference between vehicle (ethanol) and 7β-OHC-treated cells is indicated by ^a(Mann–Whitney test; $p < 0.05$) and by ^b(Comparison between 7β-OHC and (7β-OHC + biotin (10–100 nM)); Mann–Whitney test; $p < 0.05$). 7β-hydroxycholesterol: 7β-OHC.

Table 2. Sterol and oxysterol profile in 158N cells exposed to 7 β -hydroxycholesterol without or with biotin.

	Cholesterol	Lathosterol	Desmosterol	Lanosterol	Triol	7 kC	7 β -OHC
Control	2.84 \pm 0.01	14.80 \pm 0.15	12.93 \pm 0.37	0.63 \pm 0.00	0.17 \pm 0.01	0.56 \pm 0.02	0.62 \pm 0.00
Vehicle (EtOH: 0.6%)	2.86 \pm 0.02	14.07 \pm 0.02	12.08 \pm 0.13	0.58 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	0.59 \pm 0.00	0.66 \pm 0.04
Biotin (10 nM)	2.84 \pm 0.07	26.86 \pm 0.53	9.84 \pm 0.13	0.86 \pm 0.01	0.08 \pm 0.05	0.63 \pm 0.38	1.47 \pm 4.49
Biotin (100 nM)	2.34 \pm 0.03	43.25 \pm 1.46	11.08 \pm 0.07	0.81 \pm 0.03	0.02 \pm 0.00	0.39 \pm 0.02	1.48 \pm 0.10
7 β -OHC (50 μ M)	2.17 \pm 0.13 ^a	8.53 \pm 0.17 ^a	6.46 \pm 0.07 ^a	0.23 \pm 0.01 ^a	1.89 \pm 0.16 ^a	10.88 \pm 0.34 ^a	246.70 \pm 0.59 ^a (NB)
7 β -OHC + Biotin (10 nM)	2.75 \pm 0.06 ^b	7.55 \pm 0.21 ^b	6.95 \pm 0.18 ^b	0.34 \pm 0.04 ^b	1.40 \pm 0.10 ^b	7.09 \pm 0.05 ^b	500.46 \pm 1.12 ^b
7 β -OHC + Biotin (100 nM)	2.78 \pm 0.13 ^b	6.01 \pm 0.12 ^b	8.05 \pm 0.31 ^b	0.39 \pm 0.04 ^b	0.92 \pm 0.06 ^b	7.44 \pm 0.41 ^b	569.84 \pm 26.95 ^b

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference between vehicle (ethanol) and 7 β -OHC-treated cells is indicated by ^a(Mann–Whitney test; $p < 0.05$) and ^b(comparison between 7 β -OHC and (7 β -OHC + Biotin (10–100 nM)); Mann–Whitney test; $p < 0.05$). 7 β -OHC: 7 β -hydroxycholesterol; 7kC: 7-ketocholesterol.

NB: The level of 7 β -OHC in 7 β -OHC-treated 158N cells (24 h) represents 1% of the initial mass of 7 β -OHC introduced in the culture medium.

As cardiolipins are mitochondrial phospholipids contributing to the control of mitochondrial bioenergetic, which depends on $\Delta\Psi_m$ [71], it was also important to determine the effects of 7 β -OHC and biotin on these molecules. Noteworthy, the highest levels of cardiolipins were found with biotin treated cells (10 and 100 nM) (Figure 6(B)). When 158N cells were exposed to 7 β -OHC, a significant decrease in total cardiolipins was observed (Figure 6(B)). This decrease was significantly counteracted when 7 β -OHC was associated with biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μ M) (Figure 6(B)).

MitoTracker Red dye, which is specific for mitochondria and binds covalently and permanently to mitochondrial proteins of living cells, was used to measure the mitochondrial mass [72]. In the presence of MitoTracker Red, the highest mean fluorescence intensity (MFI) was found when 158N cells were treated with 7 β -OHC compared to control and vehicle-treated cells, supporting either the possibility of mitochondrial swelling (as a consequence of cell death) and/or of an enhancement of mitochondrial mass (to prevent mitochondrial dysfunctions) (Figure 6(C)). This increase was significantly inhibited by biotin (10 and 100 nM) as well as by α -tocopherol (400 μ M) (Figure 6(C)).

Mitochondrial O₂^{•-} overproduction was also evaluated by flow cytometry after staining with MitoSOX. When 158N cells were exposed to 7 β -OHC (50 μ M), a marked increase in the percentage of MitoSOX positive cells (% of cells overproducing mitochondrial O₂^{•-}) was observed compared to control and vehicle-treated cells. This overproduction of O₂^{•-} was significantly attenuated by biotin (10 and 100 nM) or α -tocopherol (400 μ M) (Figure 6(D)). Altogether, these findings demonstrate the ability of biotin to prevent mitochondrial damage.

To characterize more precisely the effects of 7 β -OHC and biotin at the mitochondrial level, the effects of these molecules on glycolysis and TCA cycle were studied.

Evaluation of the effects of biotin and 7 β -OHC on glycolysis and TCA cycle

The tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) is a metabolic pathway considered as source of energy from the mitochondria. The effects of 7 β -OHC and biotin on different organic acid levels implicated in glycolysis (lactic acid, pyruvic acid) and in the TCA cycle (succinic acid, fumaric acid, malic acid, citric acid) were evaluated.

In stress conditions, pyruvate is converted to lactate via an LDH catalyzed reaction. This reaction requires NADH, and the cells can continue to perform glycolysis by regenerating NAD⁺. The amount of lactic acid (lactate) was significantly enhanced when 158N cells were exposed to 7 β -OHC (220.59 \pm 2.50 ng/million cells) compared to vehicle-treated cells (122.64 \pm 3.53 ng/million cells). However, when 7 β -OHC was added with biotin, lactate levels were significantly reduced compared to 7 β -OHC alone (Table 1). In addition, the amount of pyruvic acid (pyruvate) was significantly decreased in 7 β -OHC-treated cells (8.11 \pm 0.06 ng/million cells) compared to vehicle-treated cells (14.13 \pm 0.5 ng/million cells). This decrease was significantly attenuated when 158N cells were simultaneously exposed to biotin (10 and 100 nM) and 7 β -OHC compared to 7 β -OHC alone (Table 1).

On the other hand, a marked decreases in succinic acid (succinate), fumaric acid (fumarate), malic acid (malate) and citric acid (citrate) levels were observed under treatment with 7 β -OHC (50 μ M) compared to vehicle-treated cells. These decreases were significantly counteracted when 7 β -OHC was associated with biotin (Table 1). This finding underlines the ability of biotin to regulate the TCA cycle.

Evaluation of the effects of biotin on lipid metabolism

Mitochondria also play an important role in cholesterol and fatty acid metabolism. This lead us to study the effect of 7 β -OHC and biotin on sterol, oxysterol and

Table 3. Saturated fatty acid profile in 158N cells exposed to 7 β -hydroxycholesterol without or with biotin.

	Control	Vehicle (EtOH: 0.6%)	Biotin (10 nM)	Biotin (100 nM)	7 β -OHC (50 μ M)	7 β -OHC + Biotin (10 nM)	7 β -OHC + Biotin (100 nM)
C14:0	109.48 \pm 0.30	101.56 \pm 0.86	123.25 \pm 5.55 ^c	101.94 \pm 10.44	81.82 \pm 0.36 ^a	138.08 \pm 1.69 ^b	123.57 \pm 6.17 ^b
C16:0	2360.32 \pm 25.67	2300.14 \pm 40.89	2806.87 \pm 17.60 ^c	2626.80 \pm 62.15 ^c	1727.54 \pm 29.59 ^a	2828.48 \pm 25.40 ^b	2786.07 \pm 5.10 ^b
C18:0	1240.25 \pm 21.80	1169.50 \pm 22.09	1238.28 \pm 13.84	1217.26 \pm 2.43	722.54 \pm 16.83 ^a	1539.69 \pm 35.82 ^b	1334.08 \pm 29.33 ^b
C20:0	29.40 \pm 2.49	24.36 \pm 1.17	19.03 \pm 1.72 ^c	13.36 \pm 0.48 ^c	10.83 \pm 1.14 ^a	17.00 \pm 1.03 ^b	19.37 \pm 0.38 ^b
C22:0	4.61 \pm 0.54	4.49 \pm 0.18	6.46 \pm 0.01 ^c	4.89 \pm 0.45	8.19 \pm 0.26 ^a	7.53 \pm 0.15 ^b	10.00 \pm 0.47 ^b
C24:0	8.32 \pm 0.31	8.27 \pm 0.18	12.48 \pm 0.01 ^c	8.36 \pm 0.02	24.58 \pm 0.84 ^a	20.62 \pm 0.37 ^b	15.38 \pm 1.09 ^b
C26:0	1.47 \pm 0.13	1.51 \pm 0.28	2.67 \pm 0.14 ^c	1.79 \pm 0.38	11.85 \pm 0.91 ^a	9.84 \pm 0.45 ^b	7.51 \pm 0.15 ^b
\sum SFA (C < 22)	3739.44 \pm 44.69	3595.56 \pm 16.77	4187.43 \pm 0.07 ^c	3959.36 \pm 53.67 ^c	2542.72 \pm 14.26 ^a	4523.25 \pm 63.94 ^b	4263.09 \pm 30.02 ^b
\sum VLCSFA (C \geq 22)	14.40 \pm 0.98	14.27 \pm 0.08	21.61 \pm 0.12 ^c	15.04 \pm 0.05	44.62 \pm 2.01 ^a	37.99 \pm 0.96 ^b	32.89 \pm 1.71 ^b
\sum FA	3753.84 \pm 43.70	3609.83 \pm 16.69	4209.03 \pm 0.0 5 ^c	3974.40 \pm 53.62 ^c	2587.34 \pm 12.25 ^a	4561.24 \pm 62.98 ^b	4295.98 \pm 31.73 ^b

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Significant difference between vehicle (ethanol) and 7 β -OHC-treated cells is indicated by^a (Mann-Whitney test; $p < 0.05$), ^b(comparison between 7 β -OHC and (7 β -OHC + Biotin (10 nM)) or (7 β -OHC + Biotin (100 nM)); Mann-Whitney test; $p < 0.05$), and ^c(Comparison between vehicle (DMSO 0.05%) and biotin (10 nM) or biotin (100 nM) treated cells; Mann-Whitney test; $p < 0.05$). \sum SFA: Sum of saturated fatty acids; \sum VLCSFA: Sum of very long chain saturated fatty acids; 7 β -hydroxycholesterol: 7 β -OHC.

fatty acid metabolism, evaluated by the profiles of these different types of lipid.

Effects of biotin on sterol and oxysterol profiles

When 158N cells were exposed to 7 β -OHC (50 μ M), a significant decrease in the cholesterol level was observed compared to control and vehicle-treated cells, and this decrease was prevented when 7 β -OHC was associated with biotin (Table 2).

Lathosterol levels were also lower in 7 β -OHC-treated cells compared to control and vehicle-treated cells, and when 7 β -OHC was associated with biotin (10 and 100 nM), the amount of lathosterol remained in the same range as in 7 β -OHC-treated cells (Table 2). Under treatment with 7 β -OHC, a marked decrease of desmosterol and lanosterol levels was also observed compared to control and vehicle-treated cells; compared to 7 β -OHC-treated cells, the amount of these cholesterol precursors were slightly but significantly increased when 7 β -OHC was associated with biotin (Table 2).

For triol, which is considered as a marker of oxidative stress, a significant increase was detected in 7 β -OHC-treated cells compared to control and vehicle-treated cells. It was slightly but significantly reduced when biotin was associated with 7 β -OHC compared to 7 β -OHC alone (Table 2).

In addition, 7-ketocholesterol (7 kC) and 7 β -OHC levels were also quantified. Under treatment with 7 β -OHC, a higher level of 7 kC, which is considered as a marker of oxidative stress [73], was observed compared to control and vehicle-treated cells (Table 2). When 7 β -OHC was added with biotin, a significant decrease of 7 kC level was observed compared to 7 β -OHC alone (Table 2). Our data also show an important accumulation of 7 β -OHC in 158N cells: 246.70 \pm 0.59 ng/million cells (Table 2). Surprisingly, in the presence of biotin (10 and

100 nM) associated with 7 β -OHC, the levels of 7 β -OHC per cell are higher than in 7 β -OHC alone (Table 2).

Evaluation of the effect of biotin on the fatty acid profile

As shown in Table 3, a significant decrease in myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and arachic acid (C20:0) was observed in 7 β -OHC-treated cells compared to control and vehicle-treated cells. These levels of fatty acids were significantly enhanced and in the range of those observed in control and vehicle-treated cells when biotin (10 and 100 nM) was added prior to 7 β -OHC.

Behenic acid (C22:0) was significantly higher in 7 β -OHC cells compared to control and vehicle-treated cells. When the cells were exposed to 7 β -OHC associated with biotin (10 nM) a significant decrease was observed while a significant increase was found with biotin (100 nM) associated with 7 β -OHC compared to 7 β -OHC alone (Table 3).

The amount of tetracosanoic acid (C24:0) and cerotic acid (C26:0) was also significantly higher in 7 β -OHC-treated cells when compared to control and vehicle-treated cells. It was significantly reduced with biotin (10–100 nM) associated with 7 β -OHC compared to 7 β -OHC alone (Table 3).

In addition, a significant reduction of total saturated fatty acids with a carbon chain below 22 carbons (\sum SFA C < 22) was observed in 7 β -OHC-treated cells compared to control and vehicle-treated cells. (\sum SFA C < 22) was significantly increased when 7 β -OHC was associated with biotin (10 and 100 nM) compared to 7 β -OHC alone. In addition, the total amount of very long chain saturated fatty acid with a carbon chain more than or equal to 22 carbons (\sum VLCSFA C \geq 22) was higher in 7 β -OHC cells. (\sum VLCSFA C \geq 22) was

Table 4. Mono-unsaturated fatty acid profile in 158N cells exposed to 7 β -hydroxycholesterol without or with biotin.

	Control	Vehicle (EtOH: 0.6%)	Biotin (10 nM)	Biotin (100 nM)	7 β -OHC (50 μ M)	7 β -OHC + Biotin (10 nM)	7 β -OHC + Biotin (100 nM)
C14:1 n-5	2.19 \pm 0.00	2.10 \pm 0.02	3.34 \pm 0.14 ^c	3.32 \pm 0.19 ^c	1.61 \pm 0.09 ^a	2.34 \pm 0.08 ^b	2.18 \pm 0.18 ^b
C16:1 n-10	231.31 \pm 6.96	230.16 \pm 9.14	297.48 \pm 9.00 ^c	273.97 \pm 12.24 ^c	207.41 \pm 6.36 ^a	285.44 \pm 7.43 ^b	226.04 \pm 5.61 ^b
C16:1 n-7	454.04 \pm 26.71	420.16 \pm 28.80	617.21 \pm 19.11 ^c	574.15 \pm 14.72 ^c	313.62 \pm 11.98 ^a	617.24 \pm 7.88 ^b	622.45 \pm 0.69 ^b
C18:1 n-9	2239.11 \pm 16.15	2035.46 \pm 48.32	2317.24 \pm 26.52 ^c	2519.05 \pm 39.06 ^c	1970.72 \pm 36.33	2391.74 \pm 85.82 ^b	2147.86 \pm 25.81 ^b
C18:1 n-7	502.24 \pm 8.92	464.92 \pm 46.02	670.29 \pm 33.45 ^c	478.28 \pm 20.01	403.71 \pm 2.75 ^a	651.32 \pm 1.43 ^b	482.86 \pm 2.72 ^b
C20:1 n-9	62.63 \pm 3.25	54.37 \pm 0.23	74.37 \pm 4.77 ^c	68.47 \pm 0.43 ^c	16.82 \pm 0.11 ^a	58.64 \pm 1.79 ^b	50.22 \pm 2.96 ^b
C20:1 n-7	32.03 \pm 0.04	34.63 \pm 0.47	37.54 \pm 1.82 ^c	23.88 \pm 2.18 ^c	5.65 \pm 1.00 ^a	26.96 \pm 1.49 ^b	26.50 \pm 1.17 ^b
C22:1 n-9	2.37 \pm 0.05	2.34 \pm 0.04	3.47 \pm 0.01 ^c	3.35 \pm 0.00 ^c	2.29 \pm 0.16	3.33 \pm 0.09 ^b	2.35 \pm 0.08
C24:1 n-9	12.58 \pm 0.53	13.01 \pm 0.01	29.20 \pm 0.27 ^c	16.89 \pm 0.42 ^c	32.71 \pm 0.96 ^a	33.61 \pm 0.20	26.31 \pm 0.83 ^b
C26:1 n-9	0.59 \pm 0.03	0.62 \pm 0.00	1.22 \pm 0.03 ^c	0.62 \pm 0.03	2.27 \pm 0.08 ^a	2.03 \pm 0.01 ^b	1.50 \pm 0.10 ^b
Σ MUFA	3539.09 \pm 47.48	3257.77 \pm 17.64	4051.37 \pm 27.41 ^c	3962.00 \pm 84.09 ^c	2956.82 \pm 13.18 ^a	4072.65 \pm 99.38 ^b	3588.28 \pm 22.11 ^b

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. significant difference between vehicle (ethanol) and 7 β -OHC-treated cells is indicated by ^a(Mann-Whitney test; $p < 0.05$). ^b(comparison between 7 β -OHC and (7 β -OHC + Biotin (10 nM)) or (7 β -OHC + Biotin (100 nM)); Mann-Whitney test, $p < 0.05$), and ^c(Comparison between vehicle (DMSO 0.05%) and biotin (10 nM) or biotin (100 nM) treated cells; Mann-Whitney test; $p < 0.05$). Σ MUFA: Sum of mono-unsaturated fatty acids. 7 β -hydroxycholesterol: 7 β -OHC.

significantly reduced when biotin (10 and 100 nM) was associated with 7 β -OHC compared to 7 β -OHC alone (Table 3).

As shown in Table 4, the analysis of mono-unsaturated fatty acid (MUFA) revealed a significant decrease in myristoleic acid (C14:1 n-5), sapienic acid (C16:1 n-10) and palmitoleic acid (C16:1 n-7), cis-vaccenic acid (C18:1 n-7), eicosenoic acid (C20:1 n-9) and paullinic acid (C20:1 n-7) levels, following treatment with 7 β -OHC (50 μ M) compared to control and vehicle-treated cells. However, very long chain monounsaturated fatty acids such as nervonic acid (C24:1 n-9) and hexacosenoic acid (C26:1 n-9) were significantly increased. Interestingly, when 158N were simultaneously treated with biotin and 7 β -OHC, an enhancement of most types of MUFA was found, whereas a significant reduction of nervonic acid (C24:1 n-9) and hexacosenoic acid (C26:1 n-9) levels were observed compared to 7 β -OHC-treated cells. The Σ MUFA was significantly reduced in 7 β -OHC-treated cells compared to control and vehicle-treated cells; interestingly, when 158N cells were exposed to biotin (10 and 100 nM) combined with 7 β -OHC, a significant increase of the Σ MUFA was observed compared to 7 β -OHC alone, and the values were either higher or in the range of those observed in control and vehicle-treated cells (Table 4).

As shown in Table 5, a significant decrease of all polyunsaturated fatty acid (PUFA) was observed under treatment with 7 β -OHC, compared to control and vehicle-treated cells. Cotreatment of 7 β -OHC with biotin (10 and 100 nM) induces an enhancement of all PUFA levels compared to 7 β -OHC alone. Thus, 7 β -OHC induces a significant decrease in total polyunsaturated fatty acids (Σ PUFA), total polyunsaturated fatty acids n-3 (Σ PUFA n-3) and total polyunsaturated fatty acids n-6 (Σ PUFA n-6) compared to control and vehicle-treated cells. These levels were significantly enhanced

when 158N cells were exposed to biotin (10 and 100 nM) associated with 7 β -OHC compared to 7 β -OHC alone.

In addition, our results also show an increase in Δ 4-desaturase (C22:6 n-3/C22:5 n-3), Δ 8- desaturase (C20:3 n-6/C20:2 n-6) and Δ 9- desaturase (C18:1 n-9/ c18:0) activity index as well as elongase activity index (22:5 n-3/C20:5 n-3) under treatment with 7 β -OHC (Table 5). When 158N cells were cotreated with 7 β -OHC and biotin (10 nM), a significant decrease in Δ 5-desaturase index (C20:4 (n-6)/C20:3 (n-6)) and Δ 9-desaturase (C18:1 n-9/C18:0) activity index was observed. The decrease in Δ 8-desaturase (C20:3 n-6/ C20:2 n-6) activity index was revealed either under cotreatment with (biotin (10 nM) associated with 7 β -OHC) and (biotin (100 nM) associated with 7 β -OHC). Under the same conditions, Δ 9-desaturase (C18:1 n-9/C18:0) activity index and elongase activity index (22:5 n-3/C20:5 n-3) and (C18:1 n-9/C18:0) were enhanced (Table 5).

Our results demonstrate the effects of 7 β -OHC and biotin on the fatty acid profile. It is noteworthy that changes on the fatty acid profile can be in part the consequence of mitochondrial dysfunction.

Altogether, these data bring new evidence of the ability of biotin to act on sterol and fatty acid metabolism.

Analysis of myelin proteins expression (PLP, MBP) in 7 β -hydroxycholesterol-treated murine oligodendrocytes 158N without or with biotin

Myelin proteins such as proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP) correspond to 50 and 30% of myelin proteins, respectively [74], and are expressed by 158N cells [75]. Therefore, we determined whether PLP and MBP expression was affected

Table 5. Polyunsaturated fatty acid profile in 158N cells exposed to 7 β -hydroxycholesterol without or with biotin.

	Control	Vehicle (EtOH : 0.6%)	Biotin (10 nM)	Biotin (100 nM)	7 β -OHC (50 μ M)	7 β -OHC + Biotin (10 nM)	7 β -OHC + Biotin (100 nM)
C18:2 n-6	32.66 \pm 2.10	28.06 \pm 0.94	37.72 \pm 1.08 ^c	38.50 \pm 1.17 ^c	23.14 \pm 1.48 ^a	34.63 \pm 0.81 ^b	27.78 \pm 0.66 ^b
C20:4 n-6 (AA)	314.84 \pm 6.38	277.13 \pm 2.48	326.89 \pm 4.57 ^c	276.78 \pm 9.70 ^c	203.91 \pm 2.73 ^a	276.71 \pm 3.86 ^b	264.79 \pm 4.70 ^b
C20:5 n-3 (EPA)	450.26 \pm 2.05	400.48 \pm 22.37	144.79 \pm 2.62 ^c	155.04 \pm 1.28 ^c	127.58 \pm 0.95 ^a	148.40 \pm 2.20 ^b	145.38 \pm 5.51 ^b
C20:3 n-6	87.23 \pm 7.07	84.27 \pm 2.34	87.55 \pm 0.10	120.40 \pm 0.85 ^c	65.15 \pm 2.24 ^a	97.37 \pm 3.56 ^b	88.22 \pm 6.46 ^b
C20:2 n-6	52.96 \pm 2.27	47.51 \pm 0.10	32.73 \pm 2.60 ^c	33.71 \pm 0.98 ^c	15.72 \pm 2.19 ^a	42.69 \pm 0.53 ^b	41.36 \pm 1.57 ^b
C22:6 n-3 (DHA)	95.82 \pm 2.21	82.47 \pm 0.90	102.16 \pm 2.47 ^c	103.62 \pm 0.49 ^c	70.85 \pm 0.86 ^a	96.70 \pm 3.52 ^b	95.34 \pm 0.21 ^b
C22:5 n-3 (DPA)	92.21 \pm 1.70	90.63 \pm 3.51	91.29 \pm 2.52	102.96 \pm 1.88 ^c	63.52 \pm 0.87 ^a	92.06 \pm 2.32 ^b	90.10 \pm 5.93 ^b
Σ PUFA	1588.33 \pm 14.33	1373.67 \pm 29.60	823.12 \pm 8.36 ^c	834.13 \pm 8.76 ^c	569.87 \pm 3.31 ^a	802.95 \pm 0.70 ^b	759.34 \pm 24.67 ^b
Σ PUFA (n-3)	638.29 \pm 5.97	573.58 \pm 26.79	338.24 \pm 2.36 ^c	361.61 \pm 0.11 ^c	261.95 \pm 0.95 ^a	337.16 \pm 3.40 ^b	330.82 \pm 11.65 ^b
Σ PUFA (n-6)	487.70 \pm 5.07	436.96 \pm 1.18	484.88 \pm 5.99	469.40 \pm 6.71 ^c	307.91 \pm 4.25 ^a	451.40 \pm 6.08 ^b	422.17 \pm 13.38 ^b
Σ PUFA (n-3)/ Σ PUFA (n-6)	1.31 \pm 0.00	1.31 \pm 0.06	0.70 \pm 0.00 ^c	0.77 \pm 0.01 ^c	0.85 \pm 0.01 ^a	0.75 \pm 0.02 ^b	0.78 \pm 0.00 ^b
Δ 4: C22:6 (n-3)/C22: 5 (n-3)	1.04 \pm 0.00	0.91 \pm 0.03	1.12 \pm 0.00 ^c	1.01 \pm 0.02	1.12 \pm 0.03 ^a	1.05 \pm 0.06	1.06 \pm 0.07
Δ 5: C20:4 (n-6) /C20:3 (n-6)	3.64 \pm 0.37	3.29 \pm 0.12	3.73 \pm 0.06	2.30 \pm 0.10 ^c	3.13 \pm 0.07	2.84 \pm 0.06 ^b	3.01 \pm 0.17
Δ 8: C20:3 (n-6) /C20: 2 (n-6)	1.64 \pm 0.06	1.77 \pm 0.05	2.69 \pm 0.22 ^c	3.57 \pm 0.08 ^c	4.25 \pm 0.73 ^a	2.28 \pm 0.11 ^b	2.13 \pm 0.08 ^b
Δ 9: C16:1 (n-7)/ C16:0	0.19 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	0.22 \pm 0.01 ^c	0.22 \pm 0.00 ^c	0.18 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00 ^b	0.22 \pm 0.00 ^b
Δ 9: C18:1 (n-9)/ c18:0	1.81 \pm 0.02	1.74 \pm 0.07	1.87 \pm 0.00 ^c	2.07 \pm 0.03 ^c	2.73 \pm 0.01 ^a	1.55 \pm 0.02 ^b	1.61 \pm 0.02 ^b
Elongase: 22:5 (n-3)/C20:5 (n-3)	0.20 \pm 0.00	0.23 \pm 0.00	0.63 \pm 0.03 ^c	0.66 \pm 0.02 ^c	0.50 \pm 0.00 ^a	0.62 \pm 0.02 ^b	0.62 \pm 0.02 ^b
Elongase: C18:0/C16:0	0.53 \pm 0.00	0.51 \pm 0.02	0.44 \pm 0.01 ^c	0.46 \pm 0.01 ^c	0.42 \pm 0.02 ^a	0.54 \pm 0.01 ^b	0.48 \pm 0.01 ^b

Concentrations are expressed as ng/million cells.

Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. significant difference between vehicle (ethanol) and 7 β -OHC-treated cells is indicated by ^a(Mann-Whitney test; $p < 0.05$). ^b(comparison between 7 β -OHC and (7 β -OHC + Biotin (10 nM)) or (7 β -OHC + Biotin (100 nM)); Mann-Whitney test; $p < 0.05$.) and ^c(Comparison between vehicle (DMSO 0.05%) and biotin (10 nM) or biotin (100 nM) treated cells; Mann-Whitney test; $p < 0.05$.) Σ PUFA: Sum of polyunsaturated fatty acids; Δ 4: desaturase delta 4; Δ 5: desaturase delta 5; Δ 8: desaturase delta; Δ 9: desaturase delta 9; AA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; DPA: docosapentaenoic acid. (7 β -hydroxycholesterol: 7 β -OHC).

by 7 β -OHC (50 μ M), and what was the impact of biotin (10, 100 nM) and α -tocopherol (400 μ M; used as cytoprotective control) on these proteins. Noteworthy, whereas PLP and MBP expression were not or slightly affected under treatment with α -tocopherol, biotin and 7 β -OHC, increased expressions of these proteins were observed when 7 β -OHC was associated with α -tocopherol or biotin (Supplementary Figure 3). Thus, PLP expression was enhanced when 7 β -OHC was associated with biotin (10 and 100 nM), whereas in this condition MBP expression was only slightly increased (Supplementary Figure 3). At the opposite, PLP expression was slightly increased when 7 β -OHC was associated with α -tocopherol (400 μ M), whereas in this condition MBP expression was strongly enhanced (Supplementary Figure 3). No differences were observed between biotin 10 and 100 nM.

Biotin prevents 7 β -hydroxycholesterol-induced apoptosis and autophagy

The ability of 7 β -OHC to trigger cell death was also supported by an enhancement of lactate dehydrogenase (LDH) activity (Figure 7(A)). As with morphological criteria, evidence of apoptosis and autophagy were also observed under treatment with 7 β -OHC. The effect of 7 β -OHC and biotin on nuclear morphology was assessed by staining with Giemsa and hoechst 33342. As shown in Figure 7(B), the highest percentage of cells with apoptotic nuclei, which are characterized by condensed and/or fragmented cell nuclei, was

observed in 158N cells exposed to 7 β -OHC. However, when 7 β -OHC was combined with biotin (10 and 100 nM), a marked decrease of percentage of cells with apoptotic nuclei was observed compared to 7 β -OHC alone (Figure 7(B)). The effect of 7 β -OHC and biotin on the number of lysosomes per cell and/or autophagic vesicles per cell, was assessed by staining with acridine orange (AO) and evaluated by flow cytometry by the percentage of AO positive cells. As shown in Figure 7(C), the highest percentage of AO positive cells was observed in 158N cells exposed to 7 β -OHC; when 7 β -OHC was associated with biotin (10 and 100 nM), a marked decrease of AO positive cells was observed compared to 7 β -OHC alone (Figure 7(C)). These different side effects (LDH activity, condensation and/or fragmentation of the nuclei, lysosomal modifications) were strongly attenuated by α -tocopherol (400 μ M) (Figure 7).

In addition, apoptosis and autophagy were also evaluated, by Western blotting. Activation of caspase-3 (characteristic of apoptosis) was revealed by the presence of cleaved caspase-3, which was clearly observed following treatment with 7 β -OHC (50 μ M) (Figure 8(A,B)). This event was counteracted when 7 β -OHC was combined with biotin (10 and 100 nM) (Figure 8(A,B)). Moreover an induction of autophagy, was revealed by an activation of LC3-II leading to an enhancement of the ratio [(LC3-II)/(LC3-I)] (Figure 8(A-C)), and this effect was reduced when biotin (10–100 nM) or α -tocopherol (400 μ M) was associated with 7 β -OHC (Figure 8(A-C)).

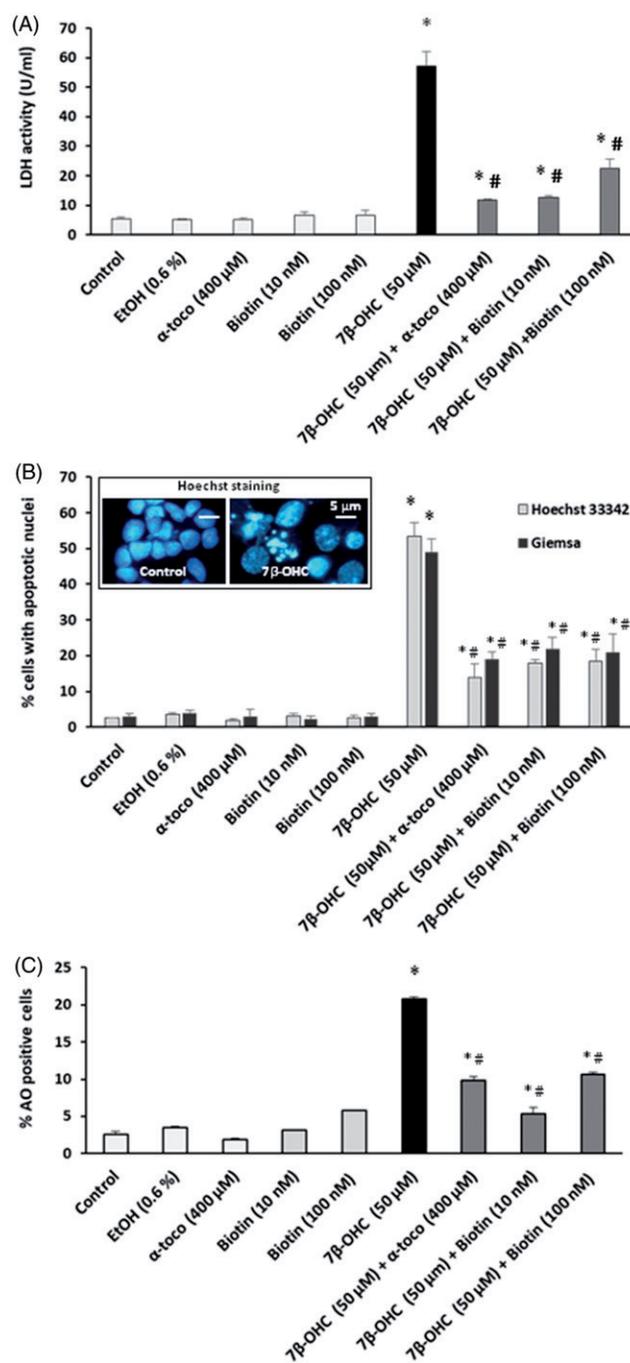


Figure 7. Evaluation of the effect of biotin and 7β-hydroxycholesterol on lactate dehydrogenase activity, morphological aspects of the nuclei and on lysosomal/autophagic vesicle content. 158N cells were cultured for 24 h with or without 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC, 50 μM) in the presence or absence of biotin (10 and 100 nM) or α-tocopherol (400 μM). Under these conditions, LDH activity, which is increased during cell death, was measured in the culture medium (A). The quantification of cells with apoptotic nuclei was evaluated after staining with Giemsa and Hoechst 33 342; apoptotic cells are characterized by condensed and/or fragmented nuclei whereas normal cells have round and regular nuclei; by fluorescence microscopy, after staining with Hoechst 33 342, apoptotic cells are clearly observed (B). The impact of 7β-OHC (50 μM) with or without biotin (10 and 100 nM) or α-tocopherol (400 μM) on lysosomal modifications involved in the autophagic process was determined by flow cytometry after staining with acridine orange (AO) (C). Data shown are mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol 0.6%). Significant differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%): * $p \leq 0.05$. Significant differences between 7β-OHC-treated cells and (7β-OHC + biotin (10 nM)), (7β-OHC + biotin (100 nM)) or (7β-OHC + α-tocopherol)-treated cells; # $p \leq 0.05$.

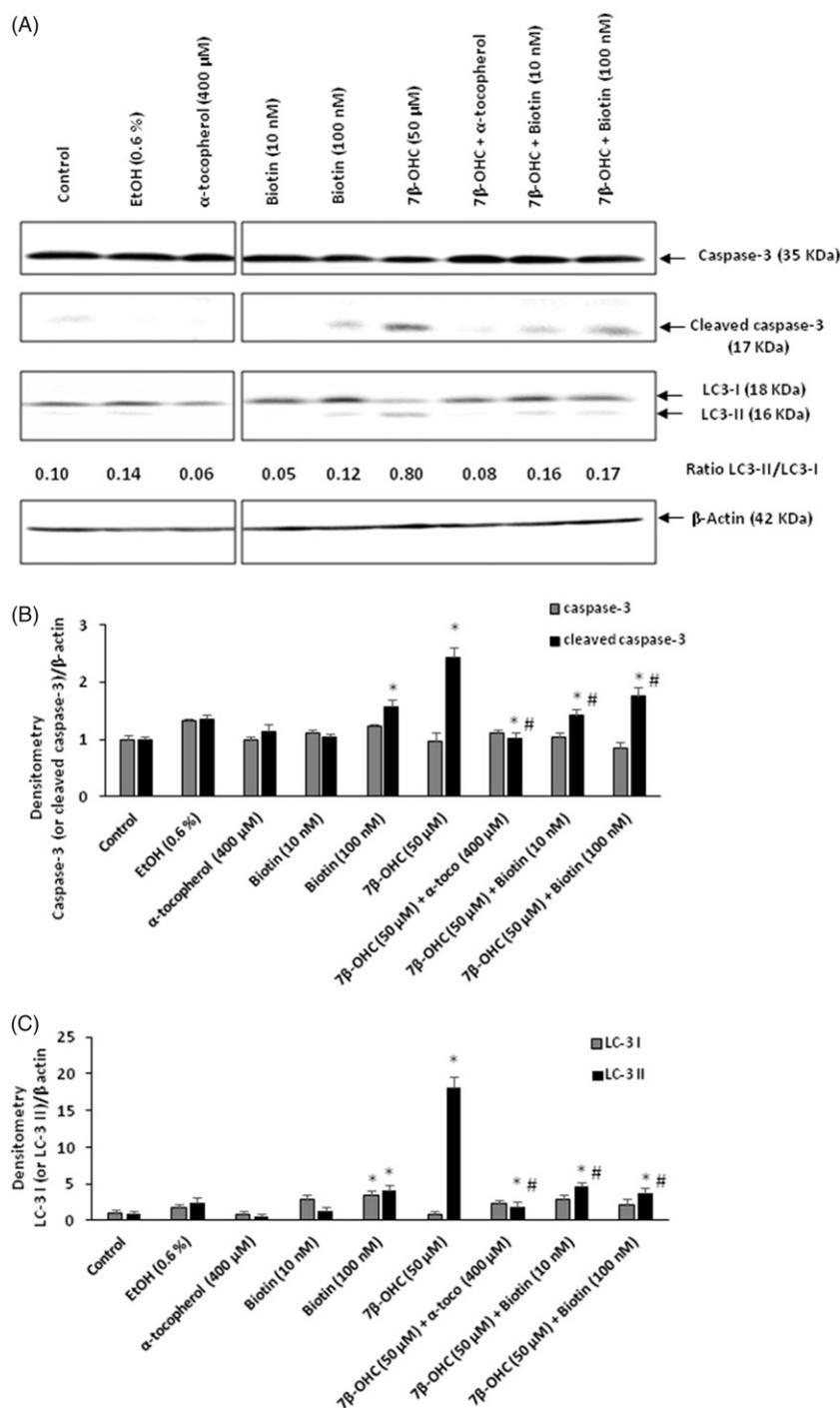


Figure 8. Evaluation of the effect of biotin on 7 β -hydroxycholesterol-induced apoptosis and autophagy on 158N murine oligodendrocytes. 158N cells were cultured for 24h with or without 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC, 50 μ M) in the presence or absence of biotin (10 nM) and (100 nM) or α -tocopherol (400 μ M). Apoptosis and autophagy were characterized by Western blotting with appropriated antibodies raised against uncleaved and cleaved caspase-3 and LC3-I/LC3-II, respectively. Actin was used as internal reference. Autophagy is characterized by an enhanced (LC3-II/LC3-I) ratio. Data shown are characteristic of three independent experiments. A: Western blotting; B: densitometric analysis (caspase-3 (or cleaved caspase-3)/ β -actin); C: densitometric analysis (LC3-I (or LC3-II)/ β -actin). Data shown are mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann-Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol 0.6%). Significant differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%): * $p \leq 0.05$. Significant differences between 7 β -OHC-treated cells and (7 β -OHC + biotin (10 nM)), (7 β -OHC + biotin (100 nM)) or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; # $p \leq 0.05$.

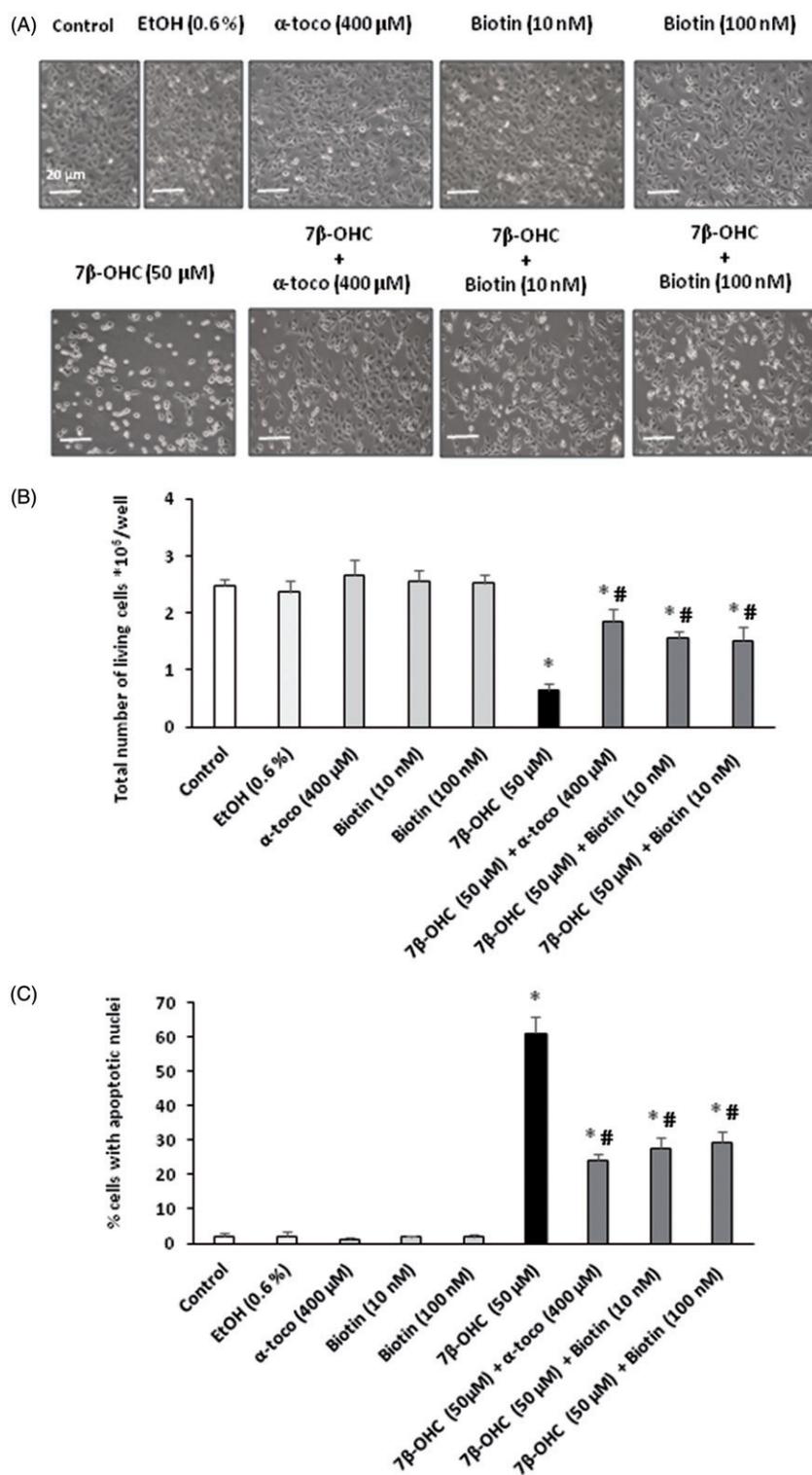


Figure 9. Effects of biotin on the recovery of 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death. In these experiments, after 24 h of culture, 158N cells were incubated with 7 β -OHC (50 μ M) for 6 h before the addition of biotin (10, and 100 nM), or α -tocopherol (400 μ M). The cells were subsequently incubated with 7 β -OHC (50 μ M) associated with biotin or α -tocopherol for an 18-h additional period of time. (A) phase contrast microscopy; (B) total number of living cells evaluated after staining with trypan blue; (C) percentage of cells with apoptotic nuclei determined after staining with Hoechst 33 342. Data shown are mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney test. No significant differences were observed between control (untreated cells), and vehicle (ethanol 0.6%). Significant differences between treated cells and the vehicle (ethanol (EtOH) 0.6%): * $p \leq 0.05$. Significant differences between 7 β -OHC-treated cells and (7 β -OHC + biotin (10 nM)), (7 β -OHC + biotin (100 nM)) or (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells; # $p \leq 0.05$.

Effect of biotin in the recovery of 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death

We also studied the effect of biotin (10 and 100 nM) on 7 β -OHC (50 μ M)-induced cell death when biotin was added after 7 β -OHC. With the FDA test, the ability of α -tocopherol (400 μ M) to prevent 7 β -OHC-induced cell death was the most efficient when α -tocopherol was introduced in the culture medium 6 h after 7 β -OHC; whereas significant, the cytoprotection found when α -tocopherol was introduced 10 h after 7 β -OHC, was very slight (Supplementary Figure 4). Based on these data, the effects of biotin (10 and 100 nM) were evaluated when it was added 6 h after 7 β -OHC. Data obtained by phase contrast microscopy, cell counting with trypan blue, and nuclear staining with hoechst 33 342 show that biotin prevents 7 β -OHC-induced cell death and apoptosis induction; biotin was as efficient as α -tocopherol (Figure 9). Therefore, biotin has also cytoprotective effects on 7 β -OHC-induced cell death when it is added after this oxysterol.

Discussion

Increased levels of 7 β -OHC are observed in the plasma, and CSF of patients with neurodegenerative diseases [11,13]. Elevated levels of 7 β -OHC have been reported in the cortex of patients with AD [23], and also in the plasma of patients with X-ALD [19], which is a rare demyelinating neurodegenerative disease, reinforcing the interest in this oxysterol in the process of demyelination. Since 7kC has been found at elevated levels in the brain and CSF of MS patients [76], and can be converted to 7 β -OHC by HSD11B1, it is tempting to speculate that 7 β -OHC might directly or indirectly contribute to demyelination by inducing dysfunctions in oligodendrocytes. Based on in vitro studies on 158N oligodendrocytes, 7 β -OHC has been shown to trigger mitochondrial damage and oxidative stress which are hallmarks of neurodegeneration [24,30]. It is, therefore, important to find cytoprotective molecules with respect to this oxysterol. At the moment α -tocopherol is the most powerful molecule capable of preventing 7 β -OHC-induced side effects on nerve cells [24], but its cytoprotective effect requires high concentrations (200–400 μ M) [30]. As encouraging results were obtained with biotin in patients with progressive MS [33], we asked whether this ubiquitous coenzyme was able to attenuate 7 β -OHC-induced side effects. It is noteworthy that biotin, currently being evaluated in the treatment of X-ALD and MS in its progressive form [33,42], plays crucial roles in brain chemistry, myelin synthesis and mitochondrial functions [33,34]. In the

present study, on 158N cells, which have several characteristics of differentiated oligodendrocytes [75], we report cytoprotective effects of biotin (10–100 nM) on 7 β -OHC-induced mitochondrial damage, oxidative stress and cell death, which are major events involved in demyelination. In similar experimental conditions than those used with α -tocopherol (200–400 μ M) and DHA (50 μ M) on 158N murine oligodendrocytes [24,30], our data show that biotin (10–100 nM) is as efficient as α -tocopherol in preventing 7 β -OHC-induced side effects.

In agreement with previous data, 7 β -OHC exhibits cytotoxic effects on 158N cells characterized by modification of cell morphology and cell functions [24,30]. A marked increase of round and floating cells and a decrease of adherent cells were revealed, suggesting inhibition of cell growth and loss of cell adhesion which can be at least in part the consequence of the modification of actin configuration [72]. These changes were accompanied with a loss of membrane integrity, suggesting an alteration of membrane constituents associated with cell death. It is notable that when biotin was added with 7 β -OHC, a marked attenuation of these side effects was observed. This highlights the ability of biotin to prevent 7 β -OHC-induced side effects on 158N cells. It was therefore of interest to define the effect of biotin on 7 β -OHC-induced oxidative stress, mitochondrial damage, alteration of lipid metabolism (cholesterol, fatty acids) and cell death, which are major events involved in neurodegeneration, including demyelination.

Our data demonstrate that 7 β -OHC-induced side effects are associated with disequilibrium of redox status shown by an enhancement of antioxidant enzyme activities (GPx, SOD, CAT) as well as activation of lipid and protein oxidation [77]. The increase of antioxidant activities under 7 β -OHC treatment could be explained by a cell reaction to protect the cells against increased levels of O₂^{•-} and H₂O₂. The enhancement of O₂^{•-} could be the consequence of mitochondrial damage and/or of the activation of various NADPH oxidase isoforms [24,78]. In our study, 7 β -OHC-induced disequilibrium of the redox status is also associated with an accumulation of MDA, CDs and CPs which can contribute to the alteration of plasma membrane and increase permeability to PI. Thus, the increased permeability to PI and the enhancement of LDH activity in the culture medium of 7 β -OHC-treated cells could be considered as a consequence of oxidative stress leading to plasma membrane alteration and secondary necrosis. Based on these different findings and hypotheses, it was relevant to consider whether biotin was able to prevent the

modifications induced by 7 β -OHC on the antioxidant enzymes and on the lipid and protein oxidation products. Interestingly, when biotin or α -tocopherol were added to 7 β -OHC, an increase of GPx and SOD activities, and of SH groups was observed. Surprisingly, compared to 7 β -OHC-treated cells, enhancement of CAT activity was only revealed in (7 β -OHC + α -tocopherol)-treated cells. These latter data suggest that the cellular targets of α -tocopherol and biotin are different. Moreover, biotin was also able to prevent O₂^{•-} and H₂O₂ overproduction and consequently lipid peroxidation and protein carbonylation. These data are in accordance with previous findings from the kidneys of diabetic mice [79], and they underline the effect of biotin in the regulation of the redox status.

It is noteworthy that in 158N cells, 7 β -OHC also induced several mitochondrial dysfunctions [24]. We attempted to bring additional information on the impact of 7 β -OHC on mitochondria with regards on mitochondrial structure, function and metabolism affected in neurodegenerative diseases. In agreement with previous studies [25,80,81], we demonstrated that 7 β -OHC induces alterations in mitochondrial function: it inhibits the succinate dehydrogenase activity, decreases $\Delta\Psi_m$ and enhances the mitochondrial production of O₂^{•-}. These events were associated with an increased mitochondrial mass which could be a consequence of the loss of $\Delta\Psi_m$. It can also be supposed that the increase of the mitochondrial mass might be a consequence of dysfunction of mitochondrial complexes [82,83], which are implicated in the demyelination process [84]. Moreover, as reported with 7 kC [85], 7 β -OHC might modify some components of the mitochondrial membrane such as cardiolipins, which are mitochondrial phospholipids of the inner mitochondrial membrane involved in various mitochondrial functions, especially oxidative phosphorylation and ATP production [71,72]. The decrease of mitochondrial cardiolipins levels observed following treatment with 7 β -OHC might be the consequence of conversion of cardiolipins in other lipids; increased cardiolipin oxidation; increased cardiolipin hydrolysis by endogenous phospholipases; decreased bioavailability or saturation of cardiolipin precursors, which might reflect structural, biochemical, bioenergetic and functional mitochondrial modifications [86]. A cellular release of cardiolipins, resulting from topographical changes of cardiolipins, from the mitochondria to the plasma membrane could also occur [86,87]. In addition, in agreement with the loss of $\Delta\Psi_m$, 7 β -OHC also significantly reduces the level of TCA cycle intermediates (citrate, fumarate, succinate and malate) [51,88].

This dysfunction of the TCA cycle explains the increase of lactate production (due to increased glycolysis) and the decrease of pyruvate level. Since pyruvate is the precursor of acetyl-CoA, its decreased amount could be the origin of a reduced concentration of TCA cycle intermediates (citrate, fumarate, succinate and malate), leading to the alteration of oxidative phosphorylation and respiratory function [51,88]. Altogether, these data underline the major impacts of 7 β -OHC at the mitochondrial level.

Interestingly, biotin favours the recovery of mitochondrial function through the upregulation of succinate dehydrogenase activity. It also counteracts the loss of $\Delta\Psi_m$ and reduces the overproduction of mitochondrial O₂^{•-}. Currently, only a few molecules have been identified for their capacity to prevent the 7 β -OHC-induced mitochondrial damage. Only docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) and α -tocopherol, as well as, the combination of these two molecules, have been proven to prevent 7 β -OHC-induced mitochondrial damage in 158N cells [30]. Consequently, it was relevant to determine whether biotin can also prevent 7 β -OHC-induced-mitochondrial changes. Notable findings were that biotin attenuates the increase of mitochondrial mass, and normalizes the levels of cardiolipins. Biotin was also able to regulate glycolysis and to prevent TCA cycle alteration. Thus, our data support a crucial role of biotin in preventing alterations in glycolysis and the TCA cycle caused by 7 β -OHC.

Cholesterol and its precursors are important for brain health [89]. About 25% of the total body of cholesterol is present in the brain [10], and 70% is localized in the myelin sheath, which is synthesized by the oligodendrocytes in the CNS [90]. Cholesterol is an essential structural component for myelin, and plays also a major role in the regulation of myelin structure by modifying the targeting of myelin basic protein (MBP) and myelin compaction [91]. In our study, total cholesterol and its precursors (lathosterol, lanosterol, and desmosterol) were reduced in 7 β -OHC-exposed cells, arguing in favour of an alteration of cholesterol metabolism. Our results support observations done in different cells exposed to other cytotoxic oxysterols (24(S)-hydroxycholesterol and 7 kC), which demonstrate that the alteration of cholesterol synthesis is associated with mitochondrial dysfunction leading different forms of cell death including apoptosis and necroptosis [51,92]. The alteration of cholesterol synthesis could contribute to the demyelination process and defects in the quality of myelin [29]. Cholesterol can also be oxidized, leading to the formation of 7 kC and 7 β -OHC [93]. Nonetheless, with exposure to 7 β -OHC, an enhancement of the

intracellular level of 7kC was revealed, indicating enhanced oxidative stress and lipid peroxidation [93]. It is interesting to note that biotin counteracts changes in the level of some precursors of cholesterol observed in the presence of 7 β -OHC, and attenuates the increase of 7kC, that could be related to the ability of biotin to prevent oxidative stress.

In addition, fatty acids are essential components of phospholipids which are abundant in the myelin sheath [90]. It was consequently relevant to study the impact of 7 β -OHC with or without biotin on the fatty acid profile. Reduced amounts of the saturated fatty acids myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0), which are structural elements of membrane phospholipids, were observed under treatment with 7 β -OHC. These data argue in favour of a correlation between TCA cycle dysfunction and the reduction of fatty acid synthesis [94]. An increase of very long chain saturated fatty acids (VLCsFA) as behenic acid (C22:0) tetracosanoic acid (C24:0) and cerotic acid (C26:0), have also been observed in 7 β -OHC-exposed cells, suggesting peroxisomal dysfunction, since β -oxidation of VLCsFA occurs in the peroxisome [95]. Of note, it has been demonstrated that an excess of VLCsFA can induce cell death through proapoptotic pathway, which is related to mitochondrial dysfunction and oxidative stress [96]. In accordance with previous studies, the amounts of monounsaturated fatty acid (MUFAs) and polyunsaturated fatty acid (PUFAs) were also reduced in 158N cells exposed to 7 β -OHC [77]. As unsaturated fatty acids (MUFA and PUFA) are required for neuronal cell functions and neuronal membrane fluidity [97,98], this decrease could favour neurodegeneration [98,99]. It is also important to underline that modifications in cellular fatty acid levels might be related to the repression of ATP-citrate lyase (acyl) activity, which triggers down-regulation of ELOVL6 and could consequently contribute to the modification of fatty acid profile [100].

Interestingly, biotin normalizes the level of saturated fatty acids by increasing the amount of saturated fatty acids (SFA; C < 22) and by reducing the amounts of very long chain saturated fatty acids (VLCsFA; C \geq 22). This also supports a role of biotin not only in mitochondrial activity and but also in peroxisomal activity [101]. Thus, as described with 7kC, our data support that 7 β -OHC also induces peroxisomal dysfunction which could contribute to 7 β -OHC-induced cell death. In addition, in the presence of 7 β -OHC, biotin favours the increase of MUFA and PUFA, which have antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties [99,102,103]. Thus, the increase of arachidonic acid (AA), eicosa-pentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA)

levels, which are potent modulators of membrane fluidity [104], extend the role of biotin as an antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective compounds capable of modulating membrane fluidity and neuronal activity. These findings support that biotin not only participates in fatty acid biosynthesis but also contributes to preventing alteration of fatty acid metabolism. These results reveal novel properties of biotin on fatty acid metabolism and support the potential of biotin to maintain myelin composition when oligodendrocytes are exposed to toxic agents such as 7 β -OHC. Thus, biotin attenuates the quantitative modifications of lipids (cholesterol, precursors of cholesterol, fatty acids) involved in the biogenesis and/or the composition of myelin. Consequently, it was interesting to determine how major myelin proteins such as proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP), which correspond to 50 and 30% of myelin proteins, respectively [74], and which are expressed by the 158N cells [75], are affected by 7 β -OHC and what is the impact of biotin on these proteins. Noteworthy, whereas PLP and MBP expression were not or slightly affected under treatment with α -tocopherol, biotin and 7 β -OHC, increased expressions of these proteins were observed when 7 β -OHC was associated with α -tocopherol or biotin suggesting that these compounds can increase PLP and MBP expression in stress conditions occurring under the action of deleterious environmental factor such as cytotoxic oxysterols.

It was also important to characterize the mode of cell death induced by 7 β -OHC and to determine the effect of biotin on 7 β -OHC-induced cell death. Our data demonstrate that 7 β -OHC-induced cell death triggers an apoptotic mode of cell death involving the mitochondrial signalling pathway and caspase-3 activation. In agreement with previous studies, it is strongly suspected that 7 β -OHC-induced cell death is associated with lysosomal dysfunction [67]. Compared to untreated and vehicle-treated cells, the ability of 7 β -OHC to trigger autophagy is supported by highest fluorescence intensities in the cells stained with acridine orange, supporting the formation of autophagic vesicles. Moreover, a conversion of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3-I) to (LC3-II), which is a specific criterion of autophagy, was detected with 7 β -OHC [24,28]. These findings confirm that 7 β -OHC induces a complex mode of cell death defined as oxia-poptophagy [24,28]. Noteworthy, biotin was able to counteract 7 β -OHC-induced apoptosis and autophagy: biotin reduces the percentage of cells with condensed and/or fragmented nuclei, and attenuates caspase 3 cleavage as well the activation of LC3-I in LC3-II.

Altogether, our results extend the ability of biotin to activate repair mechanisms contributing to prevent 7 β -OHC-induced oxiaoptophagy. As the cytoprotective activity of biotin was observed either in pretreatment (introduction of biotin 2 h before 7 β -OHC) or when biotin was added 6 h after 7 β -OHC, our data demonstrate an interest of biotin both in a preventive and curative context.

Conclusion

In the murine oligodendrocyte cell-line 158N, 7 β -OHC triggers a complex mode of cell death defined as oxiaoptophagy. 7 β -OHC induces oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction, increased activity of major antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx), lipid and protein oxidation, modification of cholesterol and fatty acid metabolism, and induction of apoptosis and autophagy. Increased catalase activity and accumulation of very long chain fatty acids which indicate peroxisomal dysfunction, were also identified. In addition, when biotin is associated with 7 β -OHC, enhanced expression of major myelin proteins (PLP and MBP) were observed. Altogether, our data demonstrate that biotin is able to efficiently attenuate the different side effects of 7 β -OHC. Up to now, only two molecules, α -tocopherol and DHA (C22:6 n-3), were reported to prevent 7 β -OHC-induced side effects [24]. With the present study, three molecules have now been identified that are capable of opposing the deleterious effects of 7 β -OHC: α -tocopherol, DHA and biotin. This could be of interest not only for the prevention but also for the treatment of neurodegenerative diseases or of various diseases associated with high levels of 7 β -OHC [80]. It will be also important to determine whether biotin is effective on other cell types treated with 7 β -OHC and whether it can prevent cell dysfunction induced by other oxysterols.

Acknowledgements

We acknowledge Dr Delphine Meffre (Inserm UMR1124, Paris, France) for her valuable advice on the choice of anti-PLP and anti-MBP antibodies, and for the conditions of analysis of these proteins by western blotting. This article/publication is based upon work from COST Action NutRedOx-CA16112 supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). We thank Dr John J. Mackrill for English corrections.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by grants from: University Bourgogne (Dijon, France), University Monastir (Monastir, Tunisia), and University Manouba (Tunis, Tunisia).

ORCID

Mustapha Cherkaoui-Malki  <http://orcid.org/0000-0001-5010-739X>

Gérard Lizard  <http://orcid.org/0000-0001-6330-0172>

References

- [1] Mutemberezi V, Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Oxysterols: from cholesterol metabolites to key mediators. *Prog Lipid Res.* 2016;64:152–169.
- [2] Mitić T, Andrew R, Walker BR, et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the regulation of 7-oxysterol levels in the arterial wall through the inter-conversion of 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol. *Biochimie.* 2013;95(3):548–555.
- [3] Zarrouk A, Vejux A, Mackrill J, et al. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res Rev.* 2014;18:148–162.
- [4] Arca M, Natoli S, Micheletta F, et al. Increased plasma levels of oxysterols, in vivo markers of oxidative stress, in patients with familial combined hyperlipidemia: reduction during atorvastatin and fenofibrate therapy. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(5):698–705.
- [5] Ziedén B, Kaminskas A, Kristenson M, et al. Increased plasma 7 β -hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(4):967–971.
- [6] Khatib S, Vaya J. Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(3):709–713.
- [7] Prunet C, Petit JM, Ecartot-Laubriet A, et al. High circulating levels of 7 β - and 7 α -hydroxycholesterol and presence of apoptotic and oxidative markers in arterial lesions of normocholesterolemic atherosclerotic patients undergoing endarterectomy. *Pathol Biol (Paris).* 2006;54(1):22–32.
- [8] Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Crick PJ, et al. Sterols and oxysterols in plasma from Smith–Lemli–Opitz syndrome patients. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017; 169:77–87.
- [9] Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K, et al. Niemann–Pick disease Type C: a lipid trafficking disorder; 2006. DOI:10.1036/ommbid.175.
- [10] Björkhem I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med.* 2006;260(6):493–508.
- [11] Cheng D, Jenner AM, Shui G, et al. Lipid pathway alterations in Parkinson’s disease primary visual cortex. *PLOS ONE.* 2011;6(2):e17299.
- [12] Kreilau F, Spiro AS, McLean CA, et al. Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington’s disease post mortem brain tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016;42(6):535–546.

- [13] Nelson TJ, Alkon DL. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and β -amyloid peptide. *J Biol Chem.* 2005;280(8):7377–7387.
- [14] Vaya J, Schipper HM. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem.* 2007;102(6):1727–1737.
- [15] Bartzokis G, Lu PH, Mintz J. Human brain myelination and amyloid beta deposition in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dem.* 2007;3(2):122–125.
- [16] Bezine M, Namsi A, Sghaier R, et al. The effect of oxysterols on nerve impulses. *Biochimie.* 2018;153:46–51.
- [17] Jackman N, Ishii A, Bansal R. Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiology.* 2009;24(5):290–297.
- [18] Bartzokis G, Lu PH, Geschwind DH, et al. Apolipoprotein E genotype and age-related myelin breakdown in healthy individuals: implications for cognitive decline and dementia. *Arch Gen Psychiatry.* 2006;63(1):63–72.
- [19] Nury T, Zarrouk A, Ragot K, et al. 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;169:123–136.
- [20] Lassmann H, van Horssen J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(3):506–510.
- [21] Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR. 11β -hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(3):265–286.
- [22] Larsson H, Böttiger Y, Iuliano L, et al. *In vivo* interconversion of 7β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(5):695–701.
- [23] Testa G, Staurengi E, Zerbinati C, et al. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol.* 2016;10:24–33.
- [24] Nury T, Zarrouk A, Mackrill JJ, et al. Induction of oxia-poptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7β -hydroxycholesterol-, or 24 (S)-hydroxycholesterol: protective effects of α -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22: 6 n-3). *Steroids.* 2015;99(B):194–203.
- [25] 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.
- [26] Clarion L, Schindler M, de Weille J, et al. 7β -Hydroxycholesterol-induced energy stress leads to sequential opposing signaling responses and to death of C6 glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(1):37–46.
- [27] Malvitte L, Montange T, Vejux A, et al. Activation of a caspase-3-independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization in cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to 7β -hydroxycholesterol. *Curr Eye Res.* 2008;33(9):769–781.
- [28] Nury T, Zarrouk A, Vejux A, et al. Induction of oxia-poptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: impairment by α -tocopherol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(3):714–719.
- [29] Brahmi F, Vejux A, Sghaier R, et al. Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018:1–20. DOI: [10.1080/10408398.2018.1491828](https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1491828).
- [30] Ragot K, Mackrill JJ, Zarrouk A, et al. 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.
- [31] Anagnostouli M, Livaniou E, Nyalala JO, et al. Cerebrospinal fluid levels of biotin in various neurological disorders. *Acta Neurol Scand.* 1999;99(6):387–392.
- [32] Peyro Saint Paul L, Debruyne D, Bernard D, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MD1003 (high-dose biotin) in the treatment of progressive multiple sclerosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016;12(3):327–344.
- [33] Sedel F, Bernard D, Mock DM, et al. Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis. *Neuropharmacology.* 2016;110(B):644–653.
- [34] Tong L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(5):863–891.
- [35] Chapman-Smith A, Cronan JE. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(9):359–363.
- [36] Rodriguez-Melendez M, Schwab Z, Zemleni J. Jurkat cells respond to biotin deficiency with increased nuclear translocation of NF- κ B, mediating cell survival. *Int J Vitam Nutr Res.* 2004;74(3):209–216.
- [37] De la Vega LA, Stockert RJ. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(6):C2037–C2042.
- [38] Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, et al. Biotin deficiency up-regulates TNF- α production in murine macrophages. *J Leukoc Biol.* 2008;83(4):912–920.
- [39] Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, et al. Effect of biotin treatment on metabolic abnormalities occurring in patients with sternocostoclavicular hyperostosis. *J Clin Biochem Nutr.* 1993;15(1):65–76.
- [40] Dokusova OK, Krivoruchenko IV. The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia. *Kardiologija.* 1972;12(12):113.
- [41] Zeng WQ, Al-Yamani E, Acierno JS, et al. Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36. 3 and is due to mutations in SLC19A3. *Am J Hum Genet.* 2005;77(1):16–26.
- [42] Sedel F. Biotin for use in treating X-linked adrenoleukodystrophy. United States patent US 9,789,092 B2. 2017 Oct 17.
- [43] Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(11):839–855.

- [44] Uchida Y, Ito K, Ohtsuki S, et al. Major involvement of Na⁺-dependent multivitamin transporter (SLC5A6/SMVT) in uptake of biotin and Pantothenic Acid by human brain capillary endothelial cells. *J Neurochem.* 2015;134(1):97–112.
- [45] Carvalho JFS, Cruz Silva MM, Moreira JN, et al. Efficient chemoenzymatic synthesis, cytotoxic evaluation, and SAR of epoxysterols. *J Med Chem.* 2009;52(13):4007–4019.
- [46] Colin D, Limagne E, Jeanningros S, et al. Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer Prev Res.* 2011;4(7):1095–1106.
- [47] Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, et al. Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004;11(8):897–905.
- [48] Zarrouk A, Vejux A, Nury T, et al. 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.
- [49] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497–509.
- [50] Vial G, Chauvin MA, Bendridi N, et al. Ipeglimin normalizes glucose tolerance and insulin sensitivity and improves mitochondrial function in liver of a high-fat, high-sucrose diet mice model. *Diabetes.* 2015;64(6):2254–2264.
- [51] Leoni V, Nury T, Vejux A, et al. Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;169:96–110.
- [52] Leoni V, Strittmatter L, Zorzi G, et al. Metabolic consequences of mitochondrial coenzyme A deficiency in patients with PANK2 mutations. *Mol Genet Metab.* 2012;105(3):463–471.
- [53] Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114–121.
- [54] 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(1–2):248–254.
- [55] Misra HP, Fridovich I. Superoxide dismutase and peroxidase: a positive activity stain applicable to polyacrylamide gel electropherograms. *Arch Biochem Biophys.* 1977;183(2):511–515.
- [56] Faure P, Lafond J-L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL, editors. *Analysis of free radicals in biological systems.* Basel: Birkhäuser; 1995. p. 237–248.
- [57] Fernandes DC, Wosniak J, Pescatore LA, et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C413–C422.
- [58] Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol.* 1990;47(5):440–448.
- [59] Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften.* 1988;75(7):354–355.
- [60] Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, et al. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 1989;6(1):67–75.
- [61] Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, et al. 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.
- [62] Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, et al. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem.* 1987;262(12):5488–5491.
- [63] Lizard G, Gueldry S, Deckert V, et al. Evaluation of the cytotoxic effects of some oxysterols and of cholesterol on endothelial cell growth: methodological aspects. *Pathol Biol.* 1997;45(4):281–290.
- [64] Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem.* 1985;33(1):77–79.
- [65] Lizard G, Fournel S, Genestier L, et al. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry.* 1995;21(3):275–283.
- [66] 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):269–275.
- [67] Yuan XM, Li W, Brunk UT, et al. Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(2):208–218.
- [68] Altmeyer A, Jung AC, Ignat M, et al. Pharmacological enhancement of autophagy induced in a hepatocellular carcinoma cell line by high-LET radiation. *Anticancer Res.* 2010;30(2):303–310.
- [69] Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci.* 2008;274(1–2):48–53.
- [70] Bhat AH, Dar KB, Anees S, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.* 2015;74:101–110.
- [71] Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, et al. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1837(4):408–417.
- [72] Zahm JM, Baconnais S, Monier S, 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.* 2003;52(2):57–69.
- [73] 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.
- [74] Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 2001;81(2):871–927.
- [75] Baarine M, Ragot K, Genin EC, et al. 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.
- [76] Leoni V, Lütjohann D, Masterman T. Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *J Lipid Res.* 2005;46(2):191–195.
- [77] Zarrouk A, Ben Salem YB, Hafsa J, et al. 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death, oxidative stress, and fatty acid metabolism dysfunctions attenuated with sea urchin egg oil. *Biochimie.* 2018;153:210–219.
- [78] Chew GT, Watts GF. Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the “recoupling hypothesis”. *QJM.* 2004;97(8):537–548.
- [79] Aldahmash BA, El-Nagar DM, Ibrahim KE, et al. Biotin amelioration of nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22(5): 564–569.
- [80] Zarrouk A, Nury T, Samadi M, et al. Effects of cholesterol oxides on cell death induction and calcium increase in human neuronal cells (SK-N-BE) and evaluation of the protective effects of docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids.* 2015;99(B):238–247.
- [81] Ferrera P, Mercado-Gómez O, Silva-Aguilar M, et al. Cholesterol potentiates β -amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. *Neurochem Res.* 2008;33(8):1509–1517.
- [82] Mahad DJ, Zibaveva I, Campbell G, et al. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain.* 2009;132(5):1161–1174.
- [83] Witte ME, Bø L, Rodenburg RJ, et al. Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions. *J Pathol.* 2009;219(2):193–204.
- [84] Campbell GR, Mahad DJ. Mitochondria as crucial players in demyelinated axons: lessons from neuropathology and experimental demyelination. *Autoimmune Dis.* 2011;2011:262847.
- [85] Nury T, Sghaier R, Zarrouk A, et al. Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol: attenuation by α -tocopherol. *Biochimie.* 2018;153:181–202.
- [86] Sorice M, Circella A, Cristea IM, et al. Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004;11(10):1133–1145.
- [87] Sorice M, Circella A, Misasi R, et al. Cardiolipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for antiphospholipids antibodies. *Clin Exp Immunol.* 2000;122(2):277–284.
- [88] Mamer O, Gravel SP, Choinière L, et al. The complete targeted profile of the organic acid intermediates of the citric acid cycle using a single stable isotope dilution analysis, sodium borodeuteride reduction and selected ion monitoring GC/MS. *Metabolomics.* 2013;9(5):1019–1030.
- [89] Simons M, Trajkovic K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci.* 2006;119(21):4381–4389.
- [90] Morell P, Quarles RH. Characteristic composition of myelin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
- [91] Saher G, Quintes S, Möbius W, et al. Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein P0 required for peripheral myelin compaction. *J Neurosci.* 2009;29(19):6094–6104.
- [92] Yamanaka K, Urano Y, Takabe W, et al. Induction of apoptosis and necroptosis by 24(S)-hydroxycholesterol is dependent on activity of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 1. *Cell Death Dis.* 2014;5:e990.
- [93] Iuliano L. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chem Phys Lipids.* 2011; 164(6):457–468.
- [94] Koh HJ, Lee SM, Son BG, et al. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem.* 2004;279(38): 39968–39974.
- [95] Wanders RJA, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:295–332.
- [96] Hapala I, Marza E, Ferreira T. Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation. *Biol Cell.* 2011;103(6):271–285.
- [97] Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(3 Suppl): 560S–569S.
- [98] De Lau LML, Bornebroek M, Witteman JCM, et al. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. *Neurology.* 2005;64(12): 2040–2045.
- [99] Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci.* 2000;18(4–5):383–399.
- [100] Migita T, Okabe S, Ikeda K, et al. Inhibition of ATP citrate lyase induces triglyceride accumulation with altered fatty acid composition in cancer cells. *Int J Cancer.* 2014;135(1):37–47.
- [101] Schrader M, Fahimi HD. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(4): 421–440
- [102] Colette C, Percheron C, Pares-Herbute N, et al. Exchanging carbohydrates for monounsaturated fats in energy-restricted diets: effects on metabolic profile and other cardiovascular risk factors. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(6):648–656.
- [103] Kim HY, Akbar M, Kim KY. Inhibition of neuronal apoptosis by polyunsaturated fatty acids. *J Mol Neurosci.* 2001;16(2–3):223–227.
- [104] Young G, Conquer J. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod Nutr Dev.* 2005;45(1): 1–28.