



THÈSE DE DOCTORAT

DOCTEUR en Sciences Biologiques – Univ. Tunis El Manar **(Spécialité Neurosciences Cellulaires et Moléculaires)**

Présentée en vue de l'obtention du Grade de

DOCTEUR en Biochimie et Biologie Moléculaire **Univ. Bourgogne Franche-Comté (ED : ES n°554)**

Laboratoires :

Neurophysiologie, physiopathologie cellulaire et biomolécules de valorisation LR18ES03,
Tunis, Tunisie

Bio-PeroxiL, 'Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique' EA7270,
Dijon, France

Etude des mécanismes moléculaires associés aux effets neurotrophiques l'ODN et des polyphénols « Resvératrol et Apigénine » sur les cellules nerveuses

Soutenue publiquement le 11/12/2019

Par : Amira NAMSI

Devant le jury composé de		
Sadok BOUKCHINA	Professeur, Faculté des Sciences de Tunis	Président
Sellama BAHRI	Professeure, Faculté des Sciences de Tunis	Rapporteuse
Naim KHAN	Professeur, Université de Bourgogne Franche-Comté France	Rapporteur
Abderraouf KENANI	Professeur, Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie	Rapporteur
Isabelle DELTON	Professeure, INSA de Lyon, France	Rapporteuse
David VAUDRY	Docteur, Université de Rouen Normandie, France	Examineur
Oifa MASMOUDI-KOUKI	Professeure, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie	Directrice de thèse
Gérard LIZARD	Docteur, Université de Bourgogne Franche-Comté, France	Directeur de thèse
Marie-Christine TONON	Docteur, Université de Rouen Normandie, France	Invitée

DEDICACE

À mon adorable Maman et mon cher Papa,
A mes frères d'amour, mes hommes et mon espoir mes trois cavaliers

Anis, Iheb et Amir

A mes belles-sœurs

Ramla

Claribel

Ashley

A mes adorables neveux Zaidan, Youssef, Fares et ma petite princesse Dahlia
A deux Ames chères qui ont finis leurs vies atteintes de la maladie d'Alzheimer
Mes deux grands-mères

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

Cette Thèse est la vôtre.

Avant-propos

Ce travail s'inscrit dans le cadre du programme de mes recherches sur «les neurosciences cellulaire et moléculaire et la biochimie des lipides».

Les travaux de ce projet ont été réalisés au laboratoire Bio-peroxIL «Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique» EA7270 (Université de Bourgogne / Inserm), Dijon, France et au sein du Laboratoire de «Neurophysiologie, Physiopathologie Cellulaire et Valorisation des Biomolécules» LR18ES03 (Faculté des Sciences de Tunis-Université Tunis El Manar), Tunis, Tunisie.

Ce travail a été rendu possible financièrement grâce aux soutiens : du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de Tunis (Tunisie), de l'Université de Bourgogne, Dijon (France), du PHC UTIQUE 16G0820 / 34940PK (Tunisie, Campus France) géré par le Pr. Olfa Masmoudi-Kouki (LR18ES03) et le Dr David Vaudry, INSERM U1239 (Université Normandie Rouen - Mont-Saint-Aignan, France)

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciement à tous les membres du Jury de m'avoir fait l'honneur de juger mes travaux de thèse : La Professeur **Sellama BAHRI** (Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis El Manar), le Professeur **Naim KHAN** (Université de Bourgogne, Dijon, France), le Professeur **Abderraouf KENANI** (Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie) et la Professeur **Isabelle DELTON** (Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, France) qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Docteur **David VAUDRY** (Université de Rouen - Normandie / INSERM 1239) d'avoir participé en tant qu'examineur. Un grand merci à monsieur le Professeur **Sadok BOUKCHINA** (Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis El Manar) d'avoir présidé mon jury de soutenance de Thèse.

J'adresse mes vifs remerciements au Prof. **Olfa MASMOUDI-KOUKI**. Je rends hommage à son honnêteté scientifique et morale. Ses enseignements ont toujours été d'une grande qualité ; ils m'ont énormément apporté et resteront un exemple pour moi.

Le Docteur **Gérard LIZARD** pour m'avoir accueillie dans son laboratoire m'avoir fait l'honneur de diriger ma Thèse. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au Laboratoire de « Biochimie du peroxysome, inflammation et métabolisme lipidique ».

Merci à tous les membres du laboratoire Bio-PeroxiL (EA7270, Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique) de l'université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, pour leur gentillesse. Merci en particulier à **Thomas NURY, Anne VEJUX, Stéphane SAVARY, Pierre ANDREOLETTI, Mustapha CHERKAOUI-MALKI, Norbert LATRUFFE, Doriane TROMPIER, Catherine GONDCAILLE et Nathalie BANCOD** qui m'ont accompagné au quotidien.

Je remercie le Docteur **Christian MULLER**, chercheur CNRS, Equipe CAMBAP (UMR 7178 CNRS) de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien pour son accueil chaleureux lors de mon stage à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg.

Un grand merci au Docteur **Marie-Christine TONON** pour l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux de recherche.

Je remercie vivement le Docteur **David VAUDRY**, chercheur Inserm, Equipe Neuropeptides, Mort neuronale et Plasticité cellulaire (Inserm U1239). Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de mon admiration pour ses compétences et ses connaissances scientifiques.

J'exprime mes remerciements au Docteur **Jérôme LEPRINCE**, chercheur Inserm, pour avoir fourni l'ODN et les antagonistes des récepteurs et des voies de signalisation.

Je remercie vivement le **Prof. Naim KHAN** et à son épouse le Docteur **Amira KHAN** pour leur aide et leur soutien, j'ai de la chance de les connaître.

Je voudrai aussi remercier mes amis pour leur soutien, leurs conseils et pour tous les bons moments passés ensemble ainsi que pour nos discussions interminables dont je ne me lasserai jamais (**Mouna, Chayma, Raouen, Khadija, Meryem, Randa**).

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

Liste de publications Scientifiques

Publications dans des revues à comité de lecture en relation avec la Thèse :

Namsi A, Nury T, Khan AS, Leprince J, Vaudry D, Caccia C, Leoni V, Atanasov AG, Tonon MC, Masmoudi-Kouki O, Lizard G. Octadecaneuropeptide (ODN) Induces N2a Cells Differentiation through a PKA/PLC/PKC/MEK/ERK-Dependent Pathway: Incidence on Peroxisome, Mitochondria, and Lipid Profiles. *Molecules*. 2019 Sep; 24(18). pii: E3310. doi: 10.3390/molecules24183310.

Namsi A, Nury T, Hamdouni H, Yammine A, Vejux A, Vervandier-Fasseur D, Latruffe N, Masmoudi-Kouki O, Lizard G. Induction of Neuronal Differentiation of Murine N2a Cells by Two Polyphenols Present in the Mediterranean Diet Mimicking Neurotrophins Activities: Resveratrol and Apigenin. *Diseases*. 2018 Jul; 6(3). pii: E67. doi: 10.3390/diseases6030067.

Publication électronique en relation avec la Thèse

Namsi A, Yammine A, Nury T, Vervandier-Fasseur D, Zarrouk A, Masmoudi-Kouki O, Latruffe N et Lizard G. Induction de la différenciation neuronale par deux polyphénols présents dans le régime méditerranéen: le Resvératrol et l'Apigénine. *Territoires du vin [En ligne]*, 2019, URL : <http://preo.u-bourgogne.fr/territoiresduvin/index.php?id=1728>; Chaire UNESCO Culture et Traditions du Vin, Université de Bourgogne, France.

Ouvrage en relation avec la Thèse

- ❖ Wine and Vine Components and Health; Norbert Latruffe and Jean-Pierre Rifler, Eds, MDPI, 2019.

Publications dans des revues à comité de lecture réalisées en collaboration pendant la Thèse

Zarrouk A, Martine L, Grégoire S, Nury T, Meddeb W, Camus E, Badreddine A, Durand P, **Namsi A**, Yammine A, Nasser B, Mejri M, Bretillon L, Mackrill JJ, Cherkaoui-Malki M, Hammami M, Lizard G. Profile of Fatty Acids, Tocopherols, Phytosterols and Polyphenols in Mediterranean Oils (Argan Oils, Olive Oils, Milk Thistle Seed Oils and Nigella Seed Oil) and Evaluation of their Antioxidant and Cytoprotective Activities. *Curr Pharm Des*. 2019 Jul. doi: 10.2174/1381612825666190705192902.

Fouache A, Zabaïou N, De Joussineau C, Morel L, Silvente-Poirot S, **Namsi A**, Lizard G, Poirot M, Makishima M, Baron S, Lobaccaro JA, Trousson A. Flavonoids differentially modulate liver X receptors activity-Structure-function relationship analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019 Jun; 190: 173-182. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.03.028.

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 Oct; 153: 181-202. doi: 10.1016/j.biochi.2018.07.009.

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; 1-20. doi: 10.1080/10408398.2018.1491828.

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 Oct; 153: 46-51. doi: 10.1016/j.biochi.2018.04.013.

Vejux A, **Namsi A**, Nury T, Moreau T, Lizard G. Biomarkers of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Current Status and Interest of Oxysterols and Phytosterols. *Front Mol Neurosci*. 2018 Jan 31; 11:12. doi: 10.3389/fnmol.2018.00012.

Liste des communications

Amira Namsi, Thomas Nury, Haythem Hamdouni, Aline Yammine, Anne Vejux, Dominique Vervandier-Fasseur, Latruffe Norbert, Olfa Masmoudi-Kouki, Gérard Lizard ; Comment se fabriquer des neurones par le régime méditerranéen ? Les polyphénols (Fruits rouges, persil) nouvel espoir de la médecine régénératives ; Assemblée Générale de l'Association Nutrition Méditerranéenne et Santé (NMS) ; Arbois, France, 3 Mai 2019.

Amira Namsi, Thomas Nury, Jérôme Leprince, David Vaudry, Olfa Masmoudi-Kouki, Gérard Lizard ; Induction of neuronal differentiation by ODN on N2a murine neurons; Journée sur le développement de stratégies régénératrices pour la réparation du système nerveux et la récupération fonctionnelle» organisée par l'Institut de Recherche Biomédicale (IRIB), Université de Rouen Normandie, Mont-Saint-Aignan, France ; 10 Décembre 2018.

Amira Namsi, Randa Sghaier, Thomas Nury, Amira Zarrouk, Fatiha Brahmi, Wiem Meddeb, Khouloud Sassi, Aline Yammine, Iham Badreddine, Wafa Mihoubi, Anne Vejux, Dominique Vervandier-Fasseur, Boubker Nasser, Ahmed Salaheddine Masmoudi, Fatma Ben Aissa-Fennira, Olfa Masmoudi-Kouki, and Gérard Lizard; Mediterranean diet and neuroprotection ; BMAT 2018 – Hammamet, Tunisie, 3-4 Novembre 2018.

Amira Namsi, Thomas Nury, Haithem Hamdouni, Aline Yammine, Anne Vejux, Dominique Vervandier-Fasseur, Norbert Latruffe, Olfa Masmoudi-Kouki, Gérard Lizard ; Induction of neuronal differentiation of murine N2a cells by two polyphenols present in the Mediterranean diet mimicking neurotrophins activities: resveratrol and apigenin; International Conference « vine, wine, food and health », Heraklion, Crete, Mai 23-26, 2018.

Amira Namsi, Thomas Nury, Marie-Christine Tonon, Olfa Masmoudi-Kouki, Gérard Lizard ; The cytoprotective and morphological differentiation effects of ODN on murine neurons N2a ; Forum des Jeunes Chercheurs UBFC, Dijon, France ; Juin 2017.

Amira Namsi, Thomas Nury, Marie-Christine Tonon, Olfa Masmoudi-Kouki, Gérard Lizard ; Effets cytoprotecteurs et différenciateurs de l'ODN sur des neurones murins N2a 23^{ème} Journée du savoir, Dijon, France. 21 Mai 2017.

Amira Namsi, Gérard Lizard, Olfa Masmoudi-Kouki; Analyses Cellulaires et Cytomique: Méthodes alternatives à l'expérimentation animale ; Cours PHC-UTIQUE Université Tunis El Manar - Tunis, 11-13 avril 2017.

Meryam Debbabi, **Amira Namsi**, Maryem Bezzine, Amira Zarrouk, Gérard Lizard; Cytomique & Cytométrie; Cours PHC – UTIQUE Université Tunis El Manar – Tunis, 27 octobre 2016.

Résumé

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par un stress oxydatif associé à des dommages mitochondriaux aboutissant à la mort des cellules neuronales. Pour atténuer ces dommages et favoriser la cytoprotection neuronale ainsi que la neurogenèse, des facteurs neurotrophiques naturels de type endogènes (Neuropeptide : octadécaneuropeptide (ODN)) ou exogènes (Polyphénols : resvératrol (RSV) et apigénine (API)) pourraient être utilisés comme agents thérapeutiques permettant de favoriser la différenciation neuronale des cellules souches immatures et pluripotentes. L'ODN est un peptide produit par les astrocytes et connu comme agent neuroprotecteur puissant d'où l'intérêt d'étudier ses effets sur la mobilisation du calcium, sa capacité à protéger les cellules neuronales contre la mort par apoptose générée par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'évaluer son pouvoir à stimuler la neurogenèse en favorisant la différenciation neuronale. Les effets des polyphénols (RSV, API), composés majeurs du régime méditerranéen, sur la neurogenèse ont été également évalués.

Les propriétés cytoprotectrices et/ou différenciatrices de l'ODN (10^{-16} - 10^{-8} M) et des polyphénols (RSV : 6.25 -50 μ M ; API : 6.25 -50 μ M) ont été essentiellement étudiées sur des cellules de neuroblastomes murins N2a mais aussi sur d'autres lignées nerveuses murines (BV-2, C6) et humaines (SK-N-BE ; CCF-STTG1). La cytoprotection a été mesurée par différents tests de viabilité (FDA, MTT, DiOC₆(3), iodure de propidium). La différenciation a été évaluée morphologiquement par la présence de neurites (axones et dendrites) visualisés grâce à différentes techniques de microscopie. L'acide rétinolique (AR : 6.25 -50 μ M) a été utilisé comme contrôle positif d'induction de différenciation. Les voies de signalisation impliquées dans la différenciation neuronale ont été caractérisées. Nous avons aussi étudié l'effet de l'ODN (10^{-14} M, 48 h) sur la morphologie, la topographie et l'activité des mitochondries et des peroxysomes au cours de la différenciation. Ces deux organites sont impliqués dans le métabolisme des lipides (acides gras, cholestérol).

Les résultats obtenus montrent que l'ODN est capable de promouvoir la survie des cellules N2a cultivées en condition de stress oxydatif aigu induit par le H_2O_2 . De plus, l'ODN ainsi que les polyphénols RSV et l'API, qui sont dépourvus d'effet cytotoxique intrinsèque stimulent la croissance des neurites indiquant qu'ils exercent des effets neurotrophiques pro-différenciateurs. Cet effet de l'ODN met en jeu l'activation de son récepteur metabotropique associé aux voies de transduction intracellulaire PKA, PKC ainsi que MAPK / ERKs. De plus, l'ODN stimule la biogenèse des mitochondries et des peroxysomes, organites essentiels dans l'activité axonale (transport axonal et renouvellement). L'étude des voies de signalisation démontre que les effets trophiques du RSV et API mettent en jeu l'activation des voies de transduction de la PKC, PKA ainsi que celle des MAPK / ERKs.

Sur la base de ces résultats, la libération d'ODN pourrait être un mécanisme endogène de protection en réponse aux attaques oxydatives et au processus de neurodégénérescence, empêchant la mort cellulaire et favorisant la différenciation des cellules neuronales. Nos travaux mettent aussi en évidence pour la première fois que les polyphénols en plus de leur action antioxydante stimulent la formation, la maturation et l'élongation des neurites des cellules N2a non différenciées. L'ensemble de ces travaux indique que le neuropeptide ODN et les polyphénols RSV et API sont de puissants agents neurotrophiques. Ces molécules présentent donc un intérêt pharmacologique en vue de leur utilisation et/ou de leurs analogues synthétiques pour traiter des maladies neurodégénératives en favorisant la neuroprotection, la neuro-réparation et la neurogenèse.

Abstract

Neurodegenerative diseases are characterized by oxidative stress associated with mitochondrial damages leading to neuronal cell death. To mitigate these damages and promote neuronal cytoprotection and neurogenesis, endogenous (Neuropeptide: octadecaneuropeptide (ODN)) or exogenous (Polyphenols: resveratrol (RSV) and apigenin (API)) natural neurotrophic factors could be used as therapeutic agents to promote neuronal differentiation of immature and pluripotent stem cells. ODN is a peptide produced by astrocytes and known as a powerful neuroprotective agent. It is therefore of interest of studying its effects on the mobilization of calcium, its ability to protect neuronal cells against apoptosis death caused by hydrogen peroxide (H_2O_2) and evaluate its ability to stimulate neurogenesis by promoting neuronal differentiation. The effects of polyphenols (RSV, API), major compounds of the Mediterranean diet, on neurogenesis were also evaluated.

The cytoprotective and/or differentiating properties of ODN (10^{-16} - 10^{-8} M) and polyphenols (RSV: 6.25 -50 μ M, API: 6.25 -50 μ M) were mainly studied on murine N2a neuroblastoma cells but also on other murine (BV-2, C6) and human (SK-N-BE, CCF-STTG1) nerve lines. Cytoprotection was measured by various viability tests (FDA, MTT, DiOC₆(3), propidium iodide). Differentiation was morphologically evaluated by the presence of neurites (axons and dendrites) and visualized by different microscopical techniques. Retinoic acid (RA: 6.25-50 μ M) was used as a positive inductor of differentiation. The signaling pathways involved in neuronal differentiation have been characterized. We also studied the effect of ODN (10^{-14} M, 48 h) on the morphology, topography and activity of mitochondria and peroxisome during differentiation. These two organelles are involved in the metabolism of lipids (fatty acids, cholesterol).

The results obtained show that ODN is able to promote the survival of N2a cells cultured under the conditions of acute oxidative stress induced by H_2O_2 . In addition, ODN as well as polyphenols (RSV and API), which lack intrinsic cytotoxic effects, stimulate neurite outgrowth, indicating that they exert pro-differentiating neurotrophic effects. This effect of ODN involves activation of its metabotropic receptor associated with intracellular transduction pathways PKA, PKC and MAPK / ERKs. In addition, ODN stimulates the biogenesis of mitochondria and peroxisomes, essential organelles in axonal activity (axonal transport and renewal). The study of signaling pathways demonstrate that the trophic effects of RSV and API involve the activation of PKC, PKA and MAPK / ERK transduction pathways.

Based on these results, the ODN release could be an endogenous protective mechanism in response to oxidative attacks and process of neurodegeneration, preventing cell death and promoting neuronal cell differentiation. Our work also highlights for the first time that polyphenols, in addition to their antioxidant activity, stimulate the formation, maturation and elongation of neurites of undifferentiated N2a cells. All of this work indicates that ODN neuropeptide and polyphenols (RSV and API) are potent neurotrophic agents. These molecules and/or their synthetic analogues may have pharmacological interest for treating neurodegenerative diseases by promoting neuroprotection, neuro-repair and neurogenesis.

Liste des Abréviations

A

AA : Acide arachidonique
ABC : *ATP Binding Cassette*
AC : Adénylate cyclase
ACBP : *Acyl-CoA binding protein*
AG : Acides gras
AGI : Acides gras insaturés
AGM : Acides gras mono-insaturés
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AGS : Acides gras saturés
AGTLCs : Acides gras à longue et à très longue chaîne
AL : Acide linoléique
ALA : α -linoléique
AO : acridine orange
API : Apigénine
ApoE : Apolipoprotéine E
AR : acide rétinoïque
ATP : Adénosine triphosphate

B

BDGF : *Brain-derived growth factor*
BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*
bFGF : *Basic fibroblast growth factor* .
BHE : Barrière hématoencéphalique .
BO : Bulbe olfactif
BrdU : Bromodésoxyuridine
BZD : Benzodiazépines

C

CBR : *Central benzodiazepine receptor*
CG : Chromatographie en phase gazeuse
CG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
COX-2 : Cyclooxygénase 2
CRH : *Corticotropin-releasing hormone*

D

DAG : Diacylglycérol
DBI : Diazepam-binding inhibitor
DHA : Acide docosahexaénoïque
DHE : Dihydroéthidine dihydroéthidine
DHR123 : Dihydrorhodamine 123
DiOC₆(3) : *3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide*
DMSO : Diméthylsulfoxyde

E

EC₅₀ : *Efficient concentration 50*
EGF : Facteur de croissance épidermique
EPA : Acide eicosapentaénoïque
ERK : *Extracellular signal-regulated Kinase*
EZ : Endozépine

F

FDA : Fluorescéine diacétate
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
FGF2: *Fibroblast growth factor 2*

G

GABA : *Acide γ -aminobutyrique*
RCPG : Récepteur couplé à une protéine G
GDNF: *Glial cell line-derived neurotrophic factor*
GFAP : *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GnRH : Gonadolibérine

H

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

I

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intercellulaire-1
i.c.v : intracérébroventriculaire
IGF-1 : Facteur de croissance à l'insuline-1
IP : Iodure de Propidium
IP₃ : Inositol triphosphate

L

LCR : Liquide céphalo-rachidien

M

MA : Maladie d'Alzheimer
MAN : Modulateur allostérique négatif
MAP : Modulateur allostérique positif
MET : Microscopie électronique à transmission
MND : Maladies neurodégénératives
MP : Maladie de Parkinson
MTT : 3-(4,5-diméthyl – thiazol-2-yl) -2,5-diphényl-Tetra-zolium bromure

N

NGF : *Nerve growth factor*
NO₃⁻ : Peroxynitrite
NPY : Neuropeptide Y
NR : Nile Red
NTs : Neurotrophines

O

ODN : Octadécaneuropeptide

P

PACAP : *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*
PFA : Paraformaldéhyde

PIP₂ : Phosphatidylinositol di phosphate
PKC : Protéine kinase C
PKA : Protéine kinase A
PLC : Phospholipases C
POMC : Pro-opiomélanocortine

R

RE : Réticulum endoplasmique
RH 123 : Rhodamine 123
RIA : Radioimmunologique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RSV : Resvératrol

S

SDH : Succinate déshydrogénase
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SR101 : Sulforhodamine 101

T

Tau : *Tubuline associated unit*
TNF : *Tumor necrosis factor*
TSPO : *Translocator protein*
TTN : Triakontatétraneuropeptide

V

VEGF : Facteur de croissance vasculaire endothélial

Z

ZSG : Zone sous granulaire
ZSV : Zone sous-ventriculaire

...

6-OHDA : 6-hydroxydopamine
24S-OHC : 24S-hydroxycholesterol
27-OHC : 27-hydroxycholestérol

Liste des Figures

Figure 1: Mécanismes moléculaires induisant la neurodégénérescence des neurones moteurs	31
Figure 2: Classification des lipides selon leurs propriétés physico-chimiques.....	32
Figure 3: Représentation de la structure plane du cholestérol et positionnement du cholestérol dans les membranes.....	33
Figure 4: Représentation schématique de la synthèse du cholestérol.....	35
Figure 5: Rôle du cholestérol dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.....	37
Figure 6: Classification des acides gras	37
Figure 7: Effet des dysfonctionnements péroxysomaux dans les maladies neurodégénératives	43
Figure 8: Représentation schématique de maturation de DBI.....	46
Figure 9: Comparaison des séquences en acides aminés du DBI de différentes espèces.....	47
Figure 10: Représentation schématique tridimensionnelle de la structure du DBI.	48
Figure 11: Représentation schématique de la distribution des peptides de la famille de l'ODN dans différents organes et dans le SNC	51
Figure 12: Représentation schématique de l'effet de l'ODN / DBI sur les récepteurs GABA _A dans la zone subventriculaire du cerveau de souris.....	55
Figure 13: Schéma de l'effet protecteur de l'ODN sur les astrocytes et les neurones en grain et voies de signalisations mises en jeu.	58
Figure 14: Structure chimique du phénol	59
Figure 15: Structure de base des flavonoïdes	62
Figure 16: Structure chimique d'un exemple de flavonoïdes comme l'Apigénine.....	62
Figure 17: Structure chimique d'un exemple de stilbènes (non-flavonoïdes).....	63
Figure 18: Absorption, métabolisme et excrétion du Resvératrol	64
Figure 19: Neutralisation des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par les polyphénols	67
Figure 20: Représentation schématique de l'effet anti-inflammatoire	69
Figure 21: Schéma d'une colonne de microscope électronique à transmission	78
Figure 22: Réaction enzymatique transformant la fluorescéine diacétate en fluorescéine	80
Figure 23: Métabolisation du MTT en bleu de formazan par les cellules vivantes	80
Figure 24: Structure chimique de l'Iodure de Propidium.....	81
Figure 25: Schéma d'oxydation de DHE en HE	82
Figure 26: Schéma d'oxydation de DHR 123 en RH 123.....	82
Figure 27: Structure chimique du DiOC ₆ (3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide).....	83
Figure 28: Représentation du cycle cellulaire	85
Figure 29: Effet-dose de H ₂ O ₂ sur les cellules N2a après 1 h de traitement. La viabilité cellulaire est quantifiée par mesure de l'intensité de la fluorescence du FDA.	93
Figure 30: Protocole expérimental pour évaluer l'effet cytoprotecteur de l'ODN contre le stress oxydant induit par H ₂ O ₂	94
Figure 31: Effet cytoprotecteur de l'ODN sur les cellules N2a en présence de H ₂ O ₂ (300 µM) après 1 h de pré-traitement.	94
Figure 32: Effet protecteur de l'ODN	96
Figure 33: Evaluation de l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur la prolifération et le métabolisme mitochondrial avec le test MTT.	97
Figure 34: Evaluation de l'effet cytoprotecteur de l'ODN associé ou non à H ₂ O ₂ sur l'intégrité de la membrane plasmique	97

Figure 35: Mesure de la production des ROS.	99
Figure 36: Evaluation de l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur la déstabilisation des lysosomes induite par un stress oxydant.....	100
Figure 37: Evaluation de l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur le potentiel transmembranaire mitochondriale.....	101
Figure 38: Effets de l'ODN sur la signalisation du $[Ca^{2+}]$ dans les cellules N2a.	103
Figure 39: Quantification de lipides neutres et polaires par le Nile Red.	104
Figure 40: Protocole expérimental d'évaluation des effets cytoprotecteurs des analogues de l'ODN et des voies de signalisation associées aux effets cytoprotecteurs de l'ODN	105
Figure 41: Les cellules N2a ont été pré-incubées pendant 30 min en absence ou en présence de l'agoniste du récepteur métabotropique OP de l'analogue dit inactif de l'ODN appelé $[Ala^{15}]$ OP	106
Figure 42: Caractérisation pharmacologique des récepteurs impliqués dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN.....	107
Figure 43: Identification des voies de signalisations impliquées dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN.....	108
Figure 44: Protocole expérimental utilisé pour évaluer l'effet différenciateur de l'ODN	109
Figure 45: Évaluation morphologique de la différenciation neuronale des cellules N2a traitées avec l'ODN..	110
Figure 46: Quantification de la différenciation neuronale induite par l'ODN sur les cellules N2a.	110
Figure 47: Caractérisation et quantification des cellules neuronales différenciées (cellules avec dendrites, axones et dendrites + axones) par ODN..	112
Figure 48: visualisation des prolongements (axones et / ou des dendrites) sur les cellules N2a différenciées par ODN avec la sulforhodamine 101 (SR101).....	113
Figure 49: Incidence de la différenciation neuronale induite par l'ODN sur la croissance et la viabilité des cellules N2a.....	114
Figure 50: Incidence de la différenciation induite par ODN sur l'adhésion et la confluence des cellules N2a	115
Figure 51: Incidence de la différenciation induite par ODN sur l'intégrité de la membrane plasmique	116
Figure 52: Mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène	118
Figure 53: Incidence de la différenciation induite par ODN sur l'intégrité lysosomale	119
Figure 54: Incidence de la différenciation induite par ODN sur le potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$)	120
Figure 55: Induction de la différenciation neuronale des cellules N2a par l'ODN	122
Figure 56: Visualisation par microscopie électronique à transmission des mitochondries et des peroxysomes dans des cellules N2a différenciées par l'ODN..	124
Figure 57: Protocole expérimental évaluant l'effet différenciateur de l'ODN et des analogues structuraux	125
Figure 58: Evaluation de l'effet différenciateur de l'ODN	126
Figure 59: Protocole expérimental évaluant les récepteurs et les voies de signalisations impliqués dans l'effet différenciateur de l'ODN.....	127
Figure 60: Caractérisation pharmacologique des récepteurs impliqués dans l'effet différenciateur de l'ODN..	128
Figure 61: Evaluation des voies de signalisation impliquées dans la différenciation neuronale induite par ODN.....	129
Figure 62: Incidence de la différenciation induite par l'ODN sur la quantité de lipides neutres et polaires par cellule.....	131

Figure 63: Profil de cholestérol et de ses précurseurs dans les cellules N2a différenciées ou non par l'ODN	134
Figure 64: Protocole expérimental évaluant l'effet préventif de l'ODN contre le stress oxydant sur plusieurs lignées de cellules nerveuses.....	135
Figure 65: Évaluation morphologique et quantification de la différenciation neuronale des cellules CCF-STTG1 et SK-N-BE traitées par l'ODN	138
Figure 66: Protocole expérimental destiné à évaluer l'effet différenciateur des deux polyphénols (RSV, API)	139
Figure 67: Évaluation morphologique de la différenciation neuronale des cellules N2a traitées par le resvératrol, l'apigénine et l'acide rétinoïque.....	140
Figure 68: Quantification de la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine sur cellules N2a.	141
Figure 69: Incidence de la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine sur la croissance et la viabilité des cellules N2a	142
Figure 70: Impact du resvératrol, de l'apigénine ainsi que de l'acide rétinoïque sur la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.....	144
Figure 71: Caractérisation et quantification des cellules N2a différenciées par le resvératrol et l'apigénine.....	146
Figure 72: Protocole expérimental pour évaluer les voies de signalisation impliquées dans l'effet différenciateur de l'ODN.....	147
Figure 73: Récepteurs et voies de signalisation pouvant être impliqués dans la différenciation neuronale des cellules N2a	147
Figure 74: Évaluation de l'implication de la protéine kinase A (PKA), de la phospholipase C (PLC) / de la protéine kinase C (PKC) et les voies de signalisation MEK / ERK dans la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine sur les cellules N2a	149
Figure 75: Évaluation de l'implication du récepteur de l'ODN dans la différenciation neuronale induite par resvératrol et apigénine sur les cellules N2a.....	150
Figure 76: Représentation schématique de l'activité neurotrophique du RSV, API et ODN ..	169

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des acides gras selon leurs structures, le nombre et la position des doubles liaisons	38
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des propriétés pharmacologiques	53
Tableau 3 : Quantité de polyphénols mesurés sur 24 variétés de fruits et 28 variétés de légumes selon le CIRAD	60
Tableau 4 : Les deux groupes de polyphénols	61
Tableau 5 : Séquences des amorces des gènes étudiés	90
Tableau 6 : Effets de l'ODN sur les valeurs de Ct des neuropeptides à activité neurotrophique potentielle (DBI, NGF et BDNF).....	130
Tableau 7 : Profils des acides gras dans les cellules N2a différenciées par l'ODN	133
Tableau 8 : Effet cytoprotecteur de l'ODN sur différents types de cellules nerveuses	136
Tableau 9 : Effets des deux polyphénols (resvératrol et apigénine) et de l'acide rétinoïque sur les valeurs de Ct des neuropeptides à activité neurotrophique potentielle: <i>Diazepam binding inhibitor</i> DBI (inhibiteur de la liaison au diazépam et précurseur de l'ODN), facteur de croissance (NGF : <i>Nerve growth factor</i>) et facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF).....	151

Table des matières

AVANT-PROPOS	3
PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL DE THESE	21
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	25
1. NEUROGENESE ET NEURODEGENERESCENCE	26
1.1. ASPECTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA NEUROGENESE	26
1.2. NEURODEGENERESCENCE ET ALTERATIONS CELLULAIRES	28
1.2.1. Dysfonctionnements cellulaires associés à la neurodégénérescence	29
1.2.2. Dysfonctionnement mitochondrial et neurodégénérescence	40
1.2.3. Dysfonctionnement peroxysomal et neurodégénérescence	41
2. FACTEURS NEUROTROPHIQUES ENDOGENES ET EXOGENES.....	44
2.1 DEFINITION D'UN FACTEUR NEUROTROPHIQUE.....	44
2.2 FACTEURS NEUROTROPHIQUES ENDOGENES	45
2.2.1. L'Endozépine, ODN	45
2.3. FACTEURS NEUROTROPHIQUES EXOGENES : LES POLYPHENOLS.....	58
2.3.1. Structures et classifications des polyphénols	59
2.3.1.1.Structures et biosynthèse des polyphénols	59
2.3.1.2.Classifications et localisations des polyphénols.....	61
- Les flavonoïdes (Flavones) : Apigénine	62
- Les non-flavonoïdes (Stilbènes) : Resvératrol/ trans-Resvératrol	63
2.3.2. Propriétés neurotrophiques et neurodifférenciatrices	64
2.3.3. Propriétés antioxydantes.....	66
2.3.4. Propriétés anti-inflammatoires.....	68
2.3.5. Effets sur la mort cellulaire	69
OBJECTIFS.....	71
METHODOLOGIE.....	74
1.LIGNEES CELLULAIRES ET CULTURE DE CELLULES.....	75
2.CARACTERISATION ET QUANTIFICATION DES CELLULES DIFFERENCIEES SELON DES CRITERES MORPHOLOGIQUES	76
3.VISUALISATION DES NEURITES PAR COLORATION A LA SULFORHODAMINE 101.....	76
4.OBSERVATION SIMULTANEE DES MITOCHONDRIES ET DES PEROXYSONES PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE.....	77
5.ETUDE DE L'ULTRASTRUCTURE CELLULAIRE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	77
6.MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE	79
7.MESURE DU STRESS OXYDANT.....	81
8.ANALYSE DES ORGANITES (MITOCHONDRIE, LYSOSOME).....	83
9.ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE	84
10.MESURE TAUX DU CALCIUM INTRACELLULAIRE	85
11.ANALYSE DES LIPIDES.....	86
I. EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX	86
II. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE APPLIQUEE A L'ANALYSE DES ACIDES GRAS	87
12.MESURE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR RT-QPCR	87

i. Extraction des ARN	87
ii. Dosage d'ARN.....	88
iii. Transcription inverse	88
iv. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel	89
13. ANALYSE STATISTIQUE	90
RESULTATS	91
1. .. EFFETS CYTOPROTECTEURS DE L'ODN CONTRE LES DOMMAGES OXYDATIFS SUR LES CELLULES N2A	93
1.1. CHOIX DE LA CONCENTRATION OPTIMALE CYTOPROTECTRICE DE L'ODN	93
1.2. EFFET CYTOPROTECTEUR DE L'ODN SUR LA MORT ET L'ADHESION CELLULAIRE	94
1.2.1. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur l'adhésion cellulaire	95
1.2.2. Effet de l'ODN sur la survie cellulaire.....	96
1.2.3. Effet de l'ODN sur l'intégrité de la membrane plasmique	97
1.3. EFFET CYTOPROTECTEUR DE L'ODN SUR LA SURPRODUCTION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.....	98
1.4. EFFET CYTOPROTECTEUR DE L'ODN SUR L'ACTIVITE DES ORGANITES (LYSOSOME, MITOCHONDRIE).....	100
1.4.1. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur l'intégrité lysosomale.....	100
1.4.2. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur le potentiel transmembranaire mitochondrial.....	101
1.5. EFFET DE L'ODN SUR L'ACTIVATION CELLULAIRE : MOBILISATION DU CALCIUM.....	102
1.6. EFFET DE L'ODN SUR LE STATUT LIPIDIQUE CELLULAIRE (LIPIDES NEUTRES, LIPIDES POLAIRES).....	104
1.7. IDENTIFICATION DES RECEPTEURS ET DES VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUES DANS LES EFFETS CYTOPROTECTEURS DE L'ODN SUR LES CELLULES N2A.....	105
1.7.1. Caractérisation des récepteurs impliqués dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN : Etude de l'implication des récepteurs aux benzodiazépines centraux et des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G.....	106
1.7.2. Caractérisation des voies de signalisation impliquées dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN	107
2. EFFETS DIFFERENCIATEUR DE L'ODN SUR LES CELLULES N2A	108
2.1. EFFET DE L'ODN SUR L'INDUCTION DE TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE DE TYPE NEURONE DES CELLULES N2A.....	109
2.1.1. Évaluation de la différenciation neuronale induite par l'ODN : analyse par microscopie en contraste de phase.....	109
2.1.2. Classification des cellules N2a différenciées par l'ODN.....	111
2.1.3. Utilisation de la sulforhodamine 101 pour l'identification des cellules N2a différenciées et la détermination des longueurs de neurites : analyse par microscopie en fluorescence	112
2.2. INCIDENCE DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR ODN SUR LA VIABILITE CELLULAIRE.....	113
2.2.1. Incidence de la différenciation neuronale induite par ODN sur la croissance et la viabilité des cellules N2a.....	113
2.2.2. Incidence de la différenciation neuronale induite par ODN sur l'intégrité de la membrane plasmique.....	116
2.3. INCIDENCE DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR ODN SUR LA SURPRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGENE ET D'ANIONS SUPEROXYDE.....	117
2.4. IMPACT DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR L'ODN SUR L'ACTIVITE DES ORGANITES (LYSOSOME, MITOCHONDRIE).....	118
2.4.1. Impact de la différenciation neuronale induite par ODN sur l'intégrité lysosomale.....	118
2.4.2. Impact de la différenciation induite par ODN sur le potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$)	119
2.5. INCIDENCE DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE SUR LA REPARTITION CELLULAIRE DES MITOCHONDRIES ET DES PEROXYSOMES	120
2.5.1. Évaluation par microscopie à fluorescence de l'effet de l'ODN sur la topographie des mitochondries et des péroxysomes	120

2.5.2. Évaluation de l'effet de l'ODN sur la topographie des mitochondries et des peroxysomes dans des cellules N2a différenciées par microscopie électronique à transmission.....	123
2.6. EVALUATION DES RECEPTEURS ET DES VOIES DE SIGNALISATIONS ASSOCIES A L'EFFET DIFFERENCIATEUR DE L'ODN	125
2.6.1. Evaluation des activités d'analogues structuraux de l'ODN sur la différenciation neuronale des cellules N2a.....	125
2.6.2. Caractérisation pharmacologique des récepteurs impliqués dans l'effet différenciateur de l'ODN.....	127
2.6.3. Caractérisation des voies de signalisation impliquées dans l'effet différenciateur de l'ODN	128
2.7. INCIDENCE DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR L'ODN SUR L'EXPRESSION DES FACTEURS NEUROTROPHIQUES : NGF ET BDNF.....	130
2.8. INCIDENCE DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR L'ODN SUR LE PROFIL LIPIDIQUE DES CELLULES N2A.....	131
2.8.1. Différenciation neuronale induite par l'ODN et statut lipidique cellulaire (lipides neutres et polaires).....	131
2.8.2. Différenciation neuronale induite par l'ODN : profils d'acides gras, de cholestérol et de précurseurs du cholestérol	132
3. EFFET CYTOPROTECTEUR ET/OU DIFFERENCIATEUR DE L'ODN SUR DES CELLULES NEURONALES HUMAINES (SK-N-BE), ASTROCYTAIRES HUMAINES (CCF-STTG1), MICROGLIALES MURINES (BV-2) ET GLIALES DE RAT (C6).....	135
3.1. EFFET CYTOPROTECTEUR DE L'ODN SUR LES CELLULES CCF-STTG1, SK-N-BE, BV-2 ET C6 .	135
3.2. EFFET DIFFERENCIATEUR DE L'ODN SUR LES CELLULES CCF-STTG1 ET SK-N-BE.....	137
4. EFFET DIFFERENCIATEUR DES POLYPHENOLS : RESVERATROL ET APIGENINE	138
4.1. ÉVALUATION ET QUANTIFICATION DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR LE RESVERATROL ET L'APIGENINE CELLULES N2A	139
4.2. INCIDENCE DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR LE RESVERATROL ET L'APIGENINE SUR LA CROISSANCE ET LA VIABILITE DES CELLULES N2A.....	142
4.3. INCIDENCE DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR LE RESVERATROL, L'APIGENINE ET L'ACIDE RETINOÏQUE SUR LA REPARTITION DES CELLULES DANS LES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE.....	143
4.4. CARACTERISATION ET QUANTIFICATION DE LA DIFFERENCIATION NEURONALE INDUITE PAR LE RESVERATROL ET L'APIGENINE	145
4.5. CARACTERISATION DES VOIES DE SIGNALISATION DU RESVERATROL ET DE L'APIGENINE IMPLIQUEES DANS LA DIFFERENCIATION NEURONALE DES CELLULES N2A.....	147
4.6. ÉVALUATION DE LA PARTICIPATION DU RECEPTEUR DE L'OCTADECANEUROPEPTIDE (ODN) A LA DIFFERENCIATION NEURONALE DES CELLULES N2A INDUITE PAR LE RESVERATROL ET L'APIGENINE.....	150
DISCUSSION	152
1. EXTENSION DE LA NOTION D'EFFETS CYTOPROTECTEURS DE L'ODN CONTRE LE STRESS OXYDANT ET LA MORT CELLULAIRE.....	154
2. EFFET DIFFERENCIATEUR DE L'ODN SUR CELLULES NERVEUSES.....	159
3. EFFET DIFFERENCIATEUR DES POLYPHENOLS (RESVERATROL, APIGENINE) SUR LES CELLULES N2A	162
CONCLUSION & PERSPECTIVES	167
REFÉRENCES.....	170

Problématique du travail de Thèse

Les maladies neurodégénératives (MND) affectent un ensemble hétérogène de neurones du système nerveux central d'une façon progressive conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Les maladies neurodégénératives présentent une grande hétérogénéité aussi bien d'un point de vue symptomatique que physiopathologique d'où la difficulté de leur classement (**Przedborski et al., 2003**). A titre d'exemple, c'est le cas de la maladie de Parkinson qui est caractérisée par une perte progressive de neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* qui innervent le striatum, induisant un ensemble de troubles neurologiques, et en premier lieu la survenue de graves déficits moteurs (tremblements au repos, hypertonie musculaire, akinésie et bradykinésie). Différents mécanismes sont associés à la neuro-pathogenèse, en particulier le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, le stress oxydatif, l'apoptose et les processus neuro-inflammatoires. Quant à la maladie d'Alzheimer, qui est caractérisée par une dilatation des ventricules cérébraux et des sillons corticaux ainsi que par une perte neuronale affectant particulièrement le système cholinergique (noyau basal de Meynert, septum, cortex entorhinal, amygdale et hippocampe), elle entraîne une atrophie du lobe temporal, du lobe pariétal, d'une partie du cortex frontal et du gyrus cingulaire d'où une perte de 8-10 % de la masse du cerveau.

Les MND peuvent présenter des altérations communes comme le stress oxydant, le dysfonctionnement des mitochondries et sans doute aussi celui des peroxysomes ainsi que des phénomènes inflammatoires pouvant être associés à l'accumulation et à l'agrégation anormale de protéines. Les neurones sont des cellules importantes pour le fonctionnement du SNC et en particulier pour la cognition. Pour une MND donnée, un groupe de neurones est sélectivement détruit provoquant des symptômes particuliers: troubles mentaux, perte de mémoire, comportement anormal et/ou troubles de la motricité et de l'équilibre ; paralysie musculaire, etc. Les causes des MND sont encore peu connues mais peuvent varier notamment en raison de la diversité des types de neurones affectés. A la complexité fonctionnelle du système nerveux s'ajoutent des facteurs environnementaux qui peuvent influencer l'activité cérébrale: habitudes et hygiène de vie, régime alimentaire (**Brown et al., 2005 ; Nieoullon, 2011**). De plus, la prévalence des MND ne cesse d'augmenter, en raison notamment de l'allongement de l'espérance de vie, ce qui pose un problème de santé publique majeur. Comme les traitements actuels ne sont que des traitements palliatifs, il est d'un grand intérêt de pouvoir développer des stratégies visant à protéger les cellules neuronales des processus neurodégénératifs en étant capables de stopper ou de ralentir la progression de la neurodégénérescence.

Les neurotrophines (NTs) forment une famille de biomolécules de nature polypeptidique qui sont essentielles pour la survie et la différenciation des neurones. Cette famille regroupe des peptides ou de petites protéines tels que le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), le NGF (*nerve growth factor*), le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) ou encore le FGF2 (*fibroblast growth factor*). Dans le cerveau, les cellules astrogliales représentent la principale source de neurotrophines jouant un rôle crucial dans la neurogenèse et dans des épisodes post-lésionnels. Les activités des facteurs neurotrophiques peuvent être mimées par des molécules naturelles tels que les polyphénols (**Ebadi et al., 1997 ; Scalbert et al., 2002 ; Moosavi et al., 2015**).

L'Octadécaneuropeptide (ODN), appartient à la famille des endozépines, généré par un clivage protéolytique de son précurseur le *diazepam binding inhibitor* (DBI) principalement exprimé et produit par les cellules gliales (**kaddour et al., 2013**) et considéré comme ligand endogène des récepteurs des benzodiazépines (**Tonon et al., 2006**). Il a été démontré que l'ODN a une activité anti-apoptotique aussi bien sur les neurones traités par la 6-OHDA que sur les astrocytes corticaux exposés à un stress oxydant (**Hamdi et al., 2012 a, Kaddour et al., 2013**). De plus, l'ODN présente une activité anti-inflammatoire (**Tokay et al., 2005**) et possède la capacité de contrôler le métabolisme oxydatif (**Hamdi et al., 2012 b ; 2015**), en stimulant l'activité et l'expression des enzymes antioxydantes et la biosynthèse du glutathion, principal dissipateur des espèces réactives dans le cerveau (**Masmoudi-Kouki et al., 2018**). De plus, l'administration de milieu conditionné, cellules astrogliales, traitées par un agent stimulateur de la production d'ODN, prévient complètement la mort apoptotique des neurones en grain du cervelet provoquée par le stress oxydant (**Masmoudi-Kouki et al., 2011, Ghouili et al., 2018**). L'ensemble de ces données indique que le neuropeptide ODN, auquel nous nous sommes plus particulièrement intéressés, pourrait être fortement impliqué dans les processus de neuroprotection et trophique.

Les polyphénols sont des micronutriments abondants dans les aliments (légumes, fruits) et certaines boissons (vins rouges, jus de fruits), mais ils sont peu abondants dans les huiles (Argan, Olive). Les polyphénols présentent une activité neuroprotectrice en particulier dans les maladies liées à l'âge associées ou non à des dysfonctionnements mitochondriaux, du stress oxydant et de l'inflammation pouvant aboutir à la mort cellulaire (**Upadhyay et al., 2015 ; Carito et al. 2016**). Les polyphénols, en particulier le resvératrol, présentent des propriétés pro-différenciatrices sur différents types cellulaires (**Kang et al., 2011; Guo et al., 2017**) ainsi que des propriétés anti-tumorales et anti-oxydantes (**Dias et al., 2016**). L'apigénine appartient à la famille des flavones connue par leurs effets sur la survie neuronale et la neurogenèse chez les

souris ainsi que pour leurs effets neurodifférenciateurs sur les cellules souches pluripotentes humaines (**Moosavi *et al.*, 2015 ; Costa *et al.*, 2016**).

Le projet de cette thèse consiste à étudier le rôle du neuropeptide ODN et de deux polyphénols (resvératrol, apigénine) présents en quantités importantes dans le régime méditerranéen, en tant que nouvel agent neurotrophique et neuroprotecteur sur des cellules neuronales en culture, essentiellement lignée cellulaire de neuroblastome murin N2a, et à déterminer les mécanismes intracellulaires mis en jeu dans ces effets.

Etude Bibliographique



1. Neurogenèse et Neurodégénérescence

L'altération de la neurogenèse caractérise un certain nombre de maladies neurodégénératives et s'inscrit dans le processus de la neurodégénérescence. Il a été bien démontré que pendant la vie adulte, la perte neuronale spontanée ou causée par la dégénérescence aboutit à des dysfonctions du système nerveux central (**Martinez & Gomes, 2002; Nadkarni et al., 2008; Santello & Volterra, 2008; De Sampaio e Spohr et al., 2010**). Des études ont montré qu'il est envisageable de stimuler des cellules souches afin de générer de nouveaux neurones fonctionnels permettant de maintenir, voire restaurer les fonctions cérébrales (**Altman, 1963 ; Altman & Das, 1965**). La neurogenèse chez l'adulte pourrait offrir des pistes intéressantes de thérapie afin de traiter les maladies neurodégénératives.

1.1. Aspects cellulaires et moléculaires de la neurogenèse

La neurogenèse désigne une série d'événements séquentiels qui englobent la prolifération, la survie, la différenciation et la maturation cellulaire. Cet ensemble de processus est nécessaire pour la génération de nouveaux neurones fonctionnels à partir de cellules souches d'un cerveau mature ou immature (**McKay, 1997 ; Galli et al., 2002**). Ce phénomène bien identifié chez l'embryon et l'enfant est appelé « neurogenèse primaire ». La neurogenèse se poursuit durant l'âge adulte et dans certaines structures cérébrales en raison de la présence des couches embryonnaires primaires germinales dans des zones spécifiques du système nerveux central (SNC), il s'agit de « neurogenèse adulte » (**McKay, 1997 ; Gage, 2000 ; Ernst & Frisén, 2015**). Ces nouveaux neurones marqués par la thymidine ou la méthode de bromodésoxyuridine (BrdU), ont été identifiés par des marqueurs neuronaux matures (**Smith, 2001 ; Kuhn et al., 2015**). La nouvelle production de neurones permet de réguler les fonctions fondamentales du cerveau en augmentant la prolifération des cellules progénitrices dans les niches neuronales permettant l'intégration des neurones « nouveau-nés » dans des circuits fonctionnels tels que l'apprentissage et la mémoire. Cela permet au cerveau de s'adapter aux changements de l'environnement offrant ainsi la possibilité de se réparer; il s'agit de « la neurogenèse réparatrice » (**Peretto & Paredes, 2014**).

La neurogenèse a été identifiée et comparée dans de nombreuses espèces mammifères (**Amrein, 2015**), tels que les rongeurs (**Lois & Alvarez-Buylla, 1994**), les primates (**Kornack & Rakic, 2001 ; Pencea et al., 2001**) et l'Homme (**Eriksson et al., 1998 ; Sanai et al., 2004 ; Bergmann et al., 2015**).

Chez les mammifères, la neurogenèse adulte se déroule principalement dans deux régions cérébrales le bulbe olfactif (BO) et l'hippocampe (**Spalding, 2013 ; Bergmann, 2015**). Cette régénérescence neuronale a été identifiée dans des zones particulières dans le bulbe olfactif nommée la zone sous-ventriculaire (ZSV) bordant les ventricules cérébraux (**Lois & Alvarez-Buylla, 1994 ; Laywell et al., 2000 ; Corona et al., 2011**) et dans la zone sous granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe (**Palmer et al., 1995 ; Ruscio et al., 2008**).

Chez les adultes, il a été démontré que la neurogenèse au niveau de gyrus denté de l'hippocampe ne génère que les neurones en grain (**Rietze et al., 2000 ; Liu et al., 2003**). En outre, la ZSG du gyrus denté contient des microenvironnements de « niche » qui permettent aux neurones de se développer à partir des précurseurs donnant naissance aux neurones immatures, à d'autres cellules gliales et endothéliales, ou encore aux cellules immunitaires comme les microglies et les macrophages. La ZSG est également spécialisée dans la réception synaptique générée par différentes régions du cerveau tout comme les fibres dopaminergiques, les projections sérotoninergiques, l'apport acétylcholinergique du septum ainsi que les connexions GABAergiques issues des interneurons locaux (**Bengzon et al., 1997 ; Cooper-Kuhn et al., 2004 ; Dominguez-Escriba et al., 2006**). La neurogenèse adulte n'existe pas seulement dans l'hippocampe mais se déroule aussi au niveau du BO sachant que quantitativement le nombre des neurones bulbaires néoformés est supérieurs à celui de l'hippocampe.

Plusieurs études, qui ont été réalisées sur les mammifères, en se basant sur des critères d'immunohistochimie et d'ultrastructure, ont montré l'existence de trois principaux types cellulaires dans le BO essentiellement dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) (**Doetsch et al., 1997**) tels que les neuroblastes ou cellules granulaires qui forment des chaînes homotypiques et les cellules périglomérulaires comme les astrocytes (cellules riches en protéines gliales fibrillaires) ainsi que des neurones qui tapissent la paroi latérale des ventricules cérébraux permettant par la suite la migration de leurs précurseurs vers le BO (**Lois & Alvarez Buylla, 1994 ; Sanai et al., 2011**) puis se différencient en interneurons granulaires qui sont tous de nature GABAergiques ou périglomérulaires homogènes ou hétérogènes pouvant être à la fois GABAergiques et dopaminergiques ou seulement GABAergiques (**Halasz & Shepherd, 1983**). La plupart des neurones en grain, générés au stade embryonnaire, continuent leur renouvellement jusqu'à l'âge adulte (**Luskin et al., 1993**).

Les mécanismes de signalisation qui soutiennent la neurogenèse adulte sont dynamiquement régulés par de nombreux facteurs environnementaux qui peuvent influencer positivement ou négativement le processus de la neurogenèse au niveau des cellules

progénitrices et lors de l'intégration des neurones néoformés dans les circuits destinés (**Ma DK et al., 2009**). Le processus de la neurogenèse est orchestré dans ces régions par des interactions complexes entre les différents repères environnementaux intrinsèques et extrinsèques. Ces processus de prolifération, de différenciation et de migration sont notamment régulés par plusieurs signaux tels que les facteurs de croissances (facteur de croissance des fibroblastes (FGF), facteur de croissance épidermique (EGF) et *brain-derived growth factor* (BDGF)), les neurotransmetteurs (sérotonine, dopamine, glutamate), les hormones (œstrogène, prolactine, corticostéroïdes), les facteurs de transcriptions, les régulateurs épigéniques (antidépresseur, opiacé, lithium) et les morphogènes (**Hagg, 2005 ; Faigle & Song, 2013**). Pendant la phase de maturation, les cellules néoformées chez les adultes, passent par des périodes critiques dans lesquelles il y aurait des modifications de la force de connexion, l'apparition, la réorganisation des neurones ainsi que les synapses; ce phénomène est appelé « plasticité neuronale » (**Nissant et al., 2009 ; Ming & Song, 2011**).

1.2. Neurodégénérescence et altérations cellulaires

La neurodégénérescence est un processus pathologique progressif entraînant la perte de structures et de fonctions des cellules nerveuses. Les troubles du SNC proviennent principalement d'agents toxiques, de lésions traumatiques et peuvent aussi être déclenchés par la dégénérescence neuronale associée au vieillissement (**Bishop et al., 2010**) et/ou à différents facteurs comme l'accumulation de cytokines et de neurotransmetteurs sachant que des facteurs génétiques peuvent aussi y contribuer (**Cooper et al., 2009 ; Vanderweyde et al., 2013 ; Nussbacher et al., 2015 ; Cookson, 2017**). L'oxydation ou le stress métabolique touchent particulièrement la réactivité des astrocytes et des microglies, qui à leur tour contribuent au dysfonctionnement neuronal déclenchant ainsi la neuroinflammation conduisant à la mort cellulaire (**Verkhratsky & Butt, 2007 ; Frank-Cannon, 2009 ; Perry et al., 2010 ; Parpura et al., 2012**). Dans ces conditions, les cellules nerveuses sont capables d'adopter un statut réactif (gliose) permettant, d'améliorer et de restaurer la fonctionnalité neuronale (**Toledano et al., 2016**). En se basant sur plusieurs données épidémiologiques, des approches méthodologiques et génétiques, les maladies neurodégénératives sont souvent caractérisées par une dégénérescence progressive d'une population bien précise des cellules neuronales tels que les neurones GABAérgiques du striatum causant la maladie de Huntington (**Zoghbi & Orr, 2000**), les motoneurones dans les maladies affectant le système moteur comme dans la sclérose latérale amyotrophique (**Swarup & Julien, 2011; Friesse et al., 2014**), les neurones dopaminergiques et motoneurones situés dans la substance noire conduisant au développement

de la maladie de Parkinson (**Fahn, 2003 ; Baldi et al., 2003 ; Gao et al., 2012 ; Singleton et al., 2013 ; Ztaou et al., 2016**) et les neurones cholinergiques principalement situés dans l'hippocampe ainsi que dans le cortex cérébral impliqués dans la maladie d'Alzheimer (**Sabbagh & Cummings, 2011; Jagannatha Rao et al., 2017 ; Wadhwani et al., 2019**). Le dysfonctionnement de la dégradation des protéines (**Ebrahimi-Fakhari et al., 2012 ; Wadhwani et al., 2019**), le stress oxydant (**Golembiowska et al., 2013 ; Bahdoudi et al., 2018**), la neuroinflammation (**Taylor et al., 2013**), le stress du réticulum endoplasmique (**Mercado et al., 2013**) ainsi que les dysfonctionnements mitochondriaux (**Exner et al., 2012; Yong-Kee et al., 2012**) sont considérés comme des mécanismes responsables de la perte des neurones et sont impliqués dans la plupart des maladies neurodégénératives.

1.2.1. Dysfonctionnements cellulaires associés à la neurodégénérescence

Pendant des décennies, des travaux de recherches ont été réalisés afin d'identifier les causes principales des troubles neurodégénératifs. Le stress oxydant est largement accepté comme étant un composant critique déclencheur d'un groupe de maladies dévastatrices, notamment la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (**Golembiowska et al., 2013; Bahdoudi et al., 2018**), caractérisées par un déséquilibre en faveur des agents pro-oxydants, en augmentant la production des radicaux libres, par rapport à une réduction des défenses anti-oxydantes (**Dizdaroglu & Karakaya, 2012; Huang et al., 2016**). Le stress oxydant se manifeste par l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides et l'oxydation de l'ADN conduisant à l'altération structurale et fonctionnelle des tissus nerveux induisant la perte progressive de neurones.

1.2.1.1. Altération du métabolisme protéique dans la neurodégénérescence

Plusieurs troubles neurodégénératifs, y compris la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, ont des caractéristiques communes comme la protéinopathie, caractérisée par le dépliage, l'accumulation et l'agrégation protéiques (prion, amyloïde, tau (*tubuline associated unit*) et polyglutamines) qui sont capables de se propager d'une cellule à une autre (**Walker & Jucker, 2015 ; Arbor et al., 2016 ; Yang et al., 2018 ; Wadhwani et al., 2019**). Ces protéines mal repliées peuvent être neutralisées par des protéines dites chaperonnes ou bien dégradées puis éliminées par le système ubiquitine-protéasome (**Rubinsztein, 2006**) ou encore par le système phagosome-lysosome (**Mitsui et al., 2009 ; Sardiello et al., 2009 ; Settembre et al., 2011**) en déclenchant le processus de l'autophagie permettant de dégrader massivement les

macromolécules et les organites. L'autophagie est une voie de dégradation alternative à celle du protéasome **(Rubinsztein, 2006)**. Cette voie peut être stimulée dans des conditions de stress ; comme la carence en nutriments, l'absence de facteurs de croissance et l'hypoxie. L'augmentation de protéines mal repliées peut être induite par plusieurs facteurs tels que le vieillissement, des facteurs génétiques (des mutations), facteurs environnementaux intracellulaire, les variations de pH, le stress oxydant et les métaux lourds. Les protéines mal conformées ou dysfonctionnelles vont s'agréger entre-elles formant ainsi des oligomères qui à leur tour vont s'agréger pour constituer des fibrilles au niveau intracellulaire **(Rubinsztein, 2006)**. Ces dernières forment des inclusions intracytoplasmiques (Maladie de Parkinson et chorée de Huntington) et/ou même intranucléaire (Ataxie spinocérébelleuse de type 1 (SCA1)) ou même constituer des agrégats extracellulaires (β -amyloïde dans la maladie d'Alzheimer) présents au niveau des plaques séniles **(DiMauro & Schon, 2008)**. Il a été bien démontré que la présence des agrégats de protéines toxiques augmente le risque et stimule la progression des maladies neurodégénératives **(Lin & Beal, 2006)**. De ce fait, les protéines toxiques telles que l' α -synuclease, la protéine Tau et β -amyloïde, exprimées dans les neurones, adoptent une conformation anormale qui peut transformer les protéines normales en protéines toxiques aboutissant à un état pathologique. Par conséquent, les protéines Tau mal repliées, s'accumulent induisant une tauopathie **(Sanders et al., 2014)**. Il a été démontré que lorsque les protéines Tau humaines mutantes sont ré-implantées dans le cerveau de souris transgéniques, elles induisent des pathologies semblables aux celles observées chez les patients atteints par la tauopathie **(Clavaguera et al., 2013 ; Kaufman et al., 2016)**. D'autres études ont été réalisées sur des neurones différenciés, provenant des cellules souches des patients porteurs de tauopathie ; elles ont montré des altérations du transport mitochondrial, ainsi que des modifications précoces de l'épissage voire de la distribution de la protéine Tau avant même leur agrégation indiquant un aspect de maladies indépendantes des agrégats toxiques **(Iovino et al., 2015)**. Dans les études moléculaires détaillées sur d'autres protéinopathies neurodégénératives, il existe la protéine précurseur de l'amyloïde, générant par son clivage la β -amyloïde, ce qui prouve que l'aggrégation de ces protéines peut augmenter le risque génétique tel que le facteur de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer, citons comme exemples le gène APOE **(Yu et al., 2014 ; Liao et al., 2017)** associé aux plaques séniles et aux dégénérescences neurofibrillaires **(Hampel & Carrillo, 2012)** et le gène TREM2 **(Guerreiro & Hardy, 2013 ; Guerreiro et al., 2013 ; Carrasquillo et al., 2017)** dont le rôle est de moduler et/ou dégrader les protéines sujettes à l'aggrégation comme la β -amyloïde permettant ainsi le maintien des neurites sains **(Ulrich & Holtzman, 2016 ; Yuan et al., 2016)**. Les approches de stratégies

thérapeutiques qui sont basées sur le ciblage direct de la racine génétique des maladies sont de plus en plus importantes afin de traiter divers troubles neurodégénératifs (**Katsnelson *et al.*, 2016**) (**Figure 1**) .

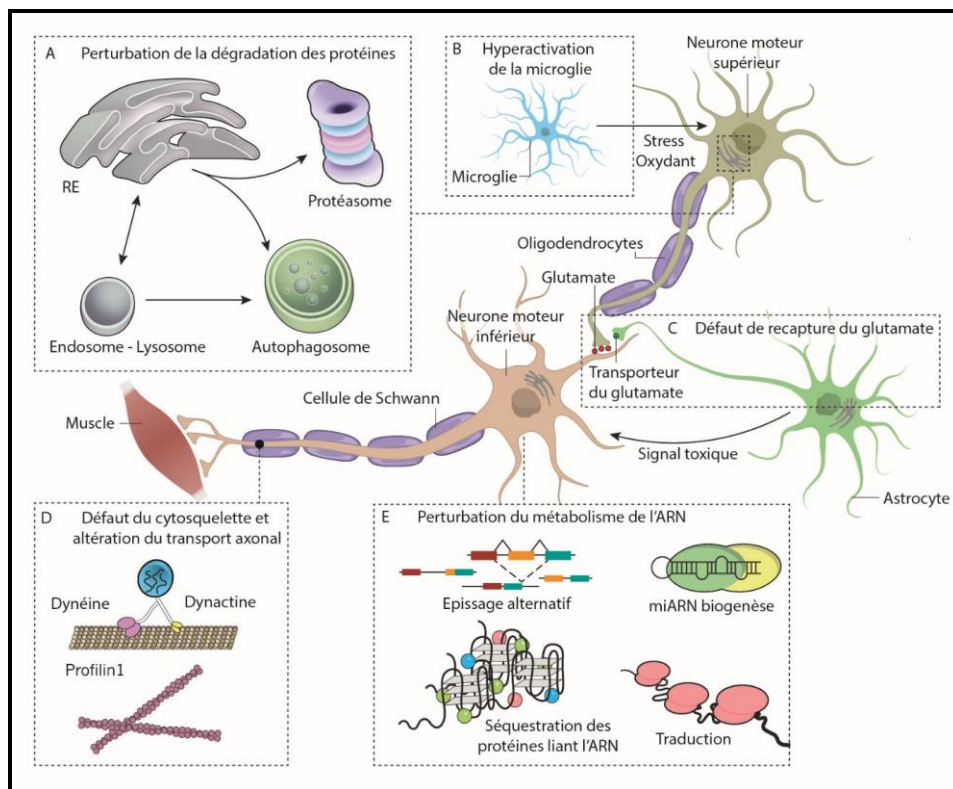


Figure 1 : Mécanismes moléculaires induisant la neurodégénérescence des neurones moteurs (Taylor JP *et al.*, 2016)

1.2.1.2. Altération du métabolisme lipidique dans la neurodégénérescence

Le cerveau est un organe vulnérable aux dommages oxydatifs (**Shankar & Walsh, 2009**) à cause de plusieurs facteurs : forte consommation d'oxygène (**Okonkwo *et al.*, 2017** ; **Boussen *et al.*, 2018**), présence des taux élevés d'acides gras polyinsaturés et présence de niveaux élevés d'ions métalliques de transition (**Santana *et al.*, 2013** ; **Axelsen *et al.*, 2011** ; **Butterfield *et al.*, 2007**).

Il existe deux méthodes principales de classifications des lipides ; la première est basée sur la composition moléculaire et la deuxième basée sur les propriétés physico-chimiques des lipides qui se subdivise à son tour en deux catégories selon leurs caractères saponifiables; les lipides à base d'acides gras et les lipides à base de stérols (Fahy, 2005 ; 2011) (Figure 2).

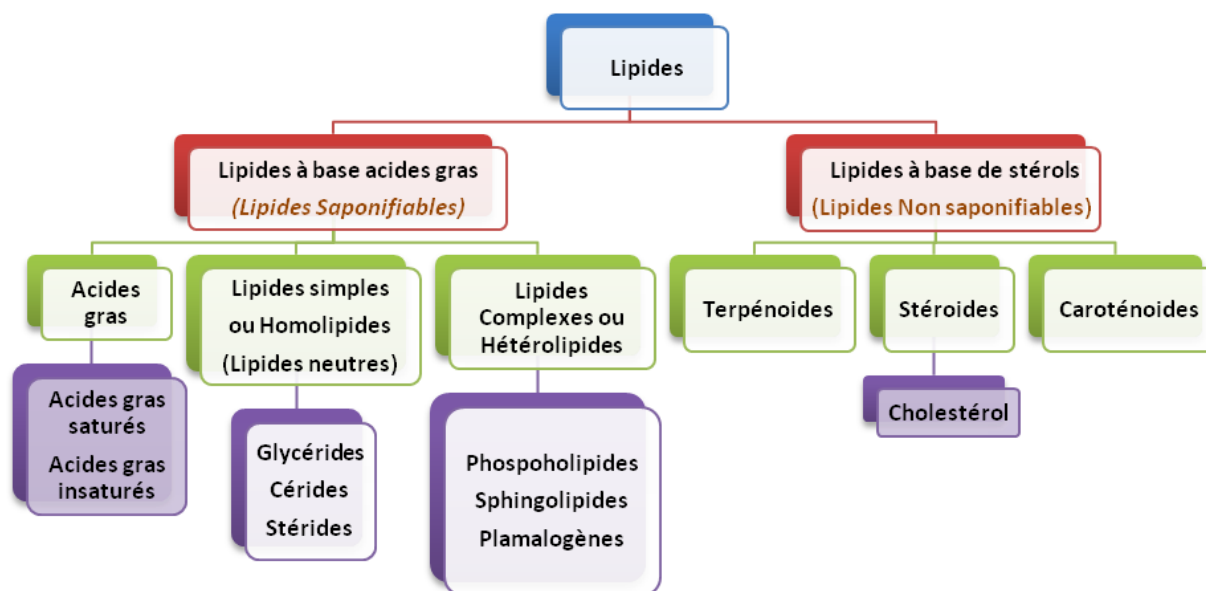


Figure 2 : Classification des lipides selon leurs propriétés physico-chimiques

D'après les méthodes utilisées pour l'isolation et la purification des lipides, ces derniers ne sont solubles qu'en présence de solvants organiques apolaires tels que le chloroforme, l'hexane et le benzène (Folch, 1957).

Le métabolisme lipidique implique un processus de synthèse, de stockage et de dégradation des lipides qui sont composés de cholestérol et esters de cholestérol, d'acides gras, de triglycérides et de phospholipides.

a. Lipides membranaires

Les principaux composants des lipides membranaires sont les phospholipides (Julien *et al.*, 2006 ; 2010) telles que la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, et la sphingomyéline. Au niveau cellulaire, l'altération du métabolisme lipidique est de plus en plus marquée au cours du vieillissement (Zechner *et al.*, 2012 ; Luo *et al.*, 2017).

L'activité métabolique importante des neurones génère des niveaux élevés de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui ont la capacité de former des radicaux libres, le radical hydroxyle (OH) et la peroxynitrite ($NO_3^{\cdot-}$) permettant l'initiation de la

peroxydation des lipides membranaires (**Wang & Michaelis, 2010; Texel & Mattson, 2011**). Les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres se produisent dans les neurones pendant les lésions cérébrales et les troubles neurodégénératifs. La peroxydation lipidique membranaire perturbe l'asymétrie des lipides membranaires provoquant des changements majeurs dans les caractéristiques des membranes : changements de la fluidité (**Mykytczuk *et al.*, 2007 ; Chen & Zhao, 2007 ; Tekpli *et al.*, 2013**) ; augmentation de la rigidité des membranes, diminution de l'activité des enzymes membranaires, altération de l'activité des récepteurs membranaires et des canaux ioniques (**Yehuda, 2002 et 2012**). Ceci conduit à une destruction membranaire et à une modulation des interactions intermoléculaires (**Oghalai *et al.*, 1998 ; Organ & Raphael, 2009**) induisant, par la suite un dysfonctionnement neuronal et une mort cellulaire (**Wong & Ryan, 2015**).

b. Cholestérol : précurseurs et dérivées au niveau du système nerveux central

Le cholestérol est un constituant vital important pour le fonctionnement normal du système nerveux. Il joue un rôle principal à la fois au cours du développement et à l'âge adulte (**Zhang & Liu, 2015**). Le cholestérol est principalement synthétisé par les animaux et l'Homme, et appartient à la famille des stérols dont le rôle est primordial dans la croissance et la viabilité cellulaire (**Mann & Beachy, 2000**). Le cholestérol contient 27 atomes de carbones; il comprend 4 cycles formant un noyau stéroïdien (aussi appelé noyau stérane ou cyclopentanoperhydrophantrène), un groupe hydroxyle en position 3 et une chaîne carbonée en position 17 (**Figure 3**).

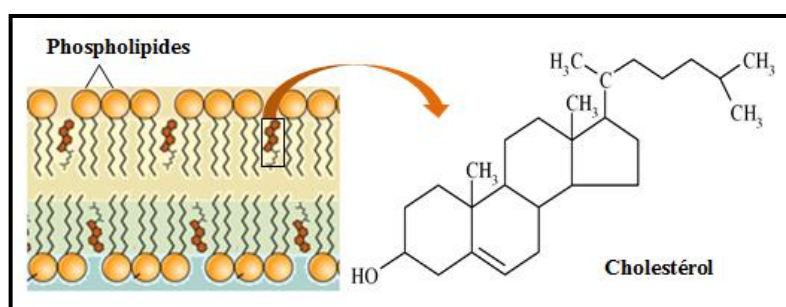


Figure 3 : Représentation de la structure plane du cholestérol et positionnement du cholestérol dans les membranes

La présence de quatre noyaux fusionnés avec l'existence d'une double liaison fait du cholestérol un composé stéroïdien insaturé. Son caractère amphiphile lui permet de former un constituant structural essentiel des membranes et de la couche externe des lipoprotéines

plasmiques. Cette structure est importante car elle peut interagir avec les acides gras pour donner des esters de cholestérol, ce qui explique son rôle important dans le maintien de la structure et de la fonction des membranes particulièrement les membranes plasmiques des mammifères **(Zuo et al., 2017)**.

Le cerveau est considéré comme un organe riche en cholestérol, il contient environ 25 % du cholestérol corporel total **(Björkhem & Meaney, 2004)**. La majeure partie du cholestérol cérébral, présent dans son état libre non estérifié, réside principalement dans la myéline (~70-80 %) **(Saher et al., 2011 ; Segatto et al., 2013)**. Chez les mammifères, le cholestérol cérébral est synthétisé *in situ* **(Cunningham et al., 2015)**. Le cholestérol cérébral joue un rôle principal dans le développement neuronal, la plasticité synaptique, la prolifération des cellules gliales, la croissance des neurites, la stabilité des microtubules, la synaptogenèse et la myélinisation **(Goritz et al., 2005)** ainsi que les fonctions cérébrales physiologiquement importantes telles que la libération des neurotransmetteurs **(Koudinov & Koudinova, 2001 ; Linetti et al., 2010 ; Liu et al., 2010 ; Funfschilling et al., 2012)**. Au niveau des surrénales, foie et rein, le cholestérol agit comme un précurseur pour la synthèse des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et de la vitamine D3. L'altération de l'homéostasie du cholestérol est un facteur de risque majeur dans de nombreuses maladies y compris les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington et la maladie d'Alzheimer **(Valenza & Cattaneo, 2006 ; Zhang & Liu, 2015 ; Xue-Shan et al., 2016 ; Zarrouk et al., 2018)**.

Les organes, autres que le cerveau, afin d'assurer leur besoin en cholestérol, mettent en jeu deux mécanismes : soit la synthèse de novo, soit la capture de cholestérol circulant apporté en particulier par l'alimentation **(Reiss & Voloshyna, 2012 ; Iuliano et al., 2015)**. Le cholestérol cérébral est essentiellement synthétisé de novo **(Quan et al., 2003 ; Zhang & Liu, 2015)**. Dans le SNC, la majorité du cholestérol est produite par les astrocytes qui alimentent les oligodendrocytes et les neurones. Les neurones en voie de développement sont capables de synthétiser du cholestérol afin de répondre à leurs propres besoins, alors que les neurones matures ne peuvent synthétiser que des petites quantités de cholestérol et ceci dépend principalement du cholestérol exogène au niveau du SNC (trafics astrocyte/neurones (cholestérol) versus neurones/astrocytes (24S-hydroxycholestérol)). Au niveau cérébral, l'échange des lipides cerveau / sang (et réciproquement) est contrôlé par la barrière hématoencéphalique (BHE). Dans le SNC, la synthèse, le métabolisme ainsi que l'excrétion du cholestérol sont strictement contrôlés **(Schreurs, 2010)**.

D'une façon générale, le cholestérol est synthétisé à partir du mévalonate formé de trois Acétyl-CoA dont l'étape limitante est la conversion de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) en mévalonate par l'enzyme HMG-CoA réductase (HMG-CoA) ; (**Figure 4**) (**Farrer et al., 1997, Zarrouk et al., 2018**).

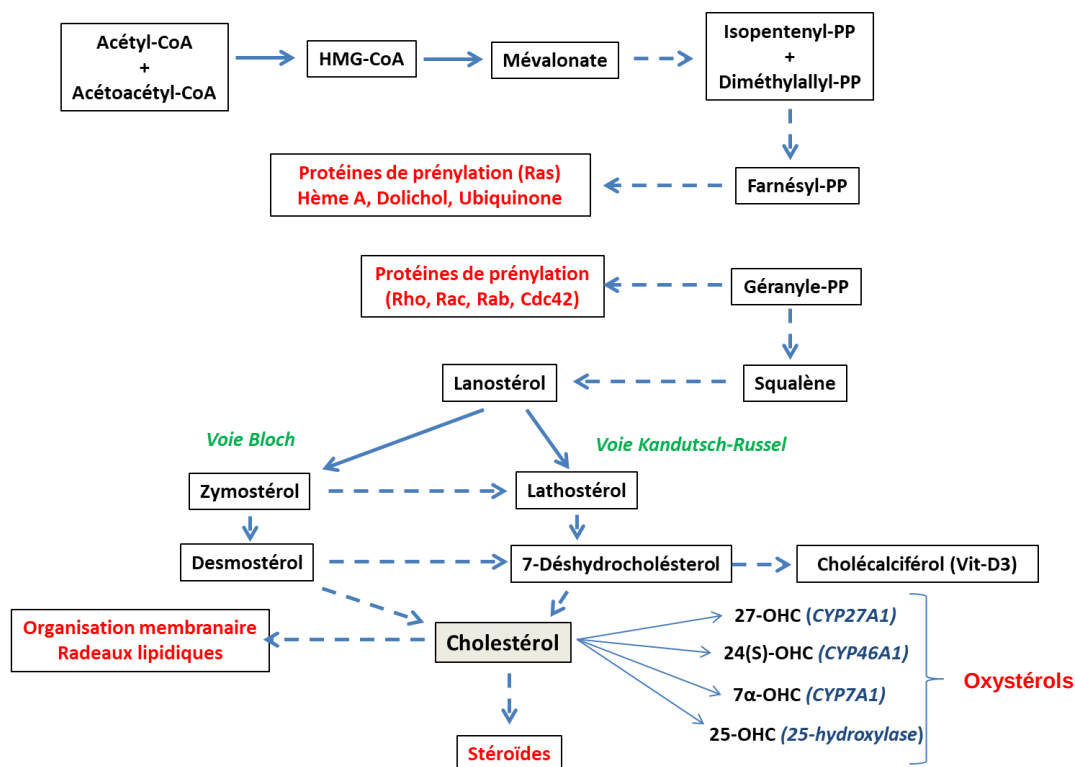


Figure 4 : Représentation schématique de la synthèse du cholestérol
(Zarrouk et al., 2018)

La voie du mévalonate apparaît comme une cible pharmacologique permettant de moduler les symptômes neurologiques et métaboliques des neuropathologies (**Cartocci, 2016**). Cette voie conduit à la synthèse du squalène à partir duquel commence la synthèse des stérols. En effet, l'époxydation du squalène produit du lanostérol permettant la production des précurseurs du cholestérol selon deux voies ; la voie de Bloch formant de zymostérol produisant le desmostérol et la voie Kandutsch-Russel fabriquant le lathostérol (**Ačimovič & Rozman, 2013**). Ces deux voies participent à la production du cholestérol (**Figure 4**).

Il a été bien démontré que le cholestérol est abondant dans les endosomes et l'appareil de Golgi, contrairement au réticulum endoplasmique et aux membranes mitochondriales internes qui en contiennent une très faible quantité (**Mukherjee et al., 1989**). Le cholestérol affecte plusieurs processus cellulaires en interagissant avec d'autres lipides membranaires et des protéines spécifiques. De plus, les neurones sont capables d'évacuer les lipides en excès à

travers le transport par les lipoprotéines permettant un efflux cellulaire de cholestérol (**Demeester et al., 2000**). Ce dernier est incorporé et redistribué au sein des membranes lors des remodelages synaptiques sous forme libre ou estérifiée, lié aux lipoprotéines. En effet, l'excès de cholestérol peut être converti, soit en 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) au niveau cérébral par l'enzyme 24S-hydroxylase (CYP46A1), une enzyme de la famille des cytochromes P-450, constituant la voie majoritaire de catabolisme du cholestérol au niveau du SNC (**Repa et al., 2000 ; Xue-Shan et al., 2016**), soit en 27-hydroxycholestérol (27-OHC) qui est formé suite à l'activité de la 27S-hydroxylase (CYP27A1) présente au niveau périphérique (**Repa et al., 2000**). L'hydroxylation du cholestérol en 24S-OHC permet d'accélérer son passage à travers la membrane plasmique et la BHE et constitue la voie majeure pour le catabolisme du cholestérol et son homéostasie au niveau cérébral. En effet, au cours des stades précoces de la MA, il a été démontré que les dégâts neuronaux pouvant être associés à une forte action de renouvellement des membranes neuronales, induisant ainsi une augmentation des taux de cholestérol qui seront convertis en 24S-OHC (**Hughes et al., 2014**). Alors qu'au niveau des stades plus tardifs, le taux de 24S-OHC qui circule dans le sang ainsi qu'au niveau du liquide céphalo-rachidien (LCR) diminue, ce qui suggère une diminution du métabolisme du cholestérol et de la quantité de neurones. La réduction des taux du 24S-OHC a été corrélée à la sévérité de la démence et au degré d'atrophie cérébrale (**Burlot et al., 2015**).

Le liquide céphalo-rachidien contient des apolipoprotéines E (**Demeester et al., 2000 ; Koch et al., 2001 ; Balazs et al., 2004**). Les apolipoprotéine E (ApoE) sont des composés de nature protéique synthétisés par les cellules gliales, particulièrement par les astrocytes (**Kiray et al., 2016**) qui les libèrent dans le LCR (**Ladu et al., 2000 ; Zito et al., 2013**). Il a été bien établi que les apolipoprotéines E interviennent dans la physiologie normale du cerveau (transport du cholestérol, remodelage synaptique...). En effet, le cholestérol est transporté à partir des astrocytes vers les neurones *via* l'ApoE qui interagit avec des récepteurs apoE de la famille des LDL-R (**Bu, 2009**). Les cellules gliales fournissent beaucoup de cholestérol sous la forme du complexe cholestérol-Apo-E pour la synaptogenèse massive (**Mauch et al., 2001; Kiray et al., 2016**). Il existe trois isoformes d'ApoE (apoE2, apoE3 et ApoE4) (**Strittmatter & Roses, 1996 ; Zarrouk et al., 2018**).

Par conséquent, le cholestérol régule un grand nombre de voies qui jouent un rôle clé dans le cerveau. Ce composé lipidique et ses dérivés ont un impact positif sur la physiologie neuronale. Toute altération métabolique du cholestérol est considérée comme un facteur principal dans l'apparition de plusieurs troubles cérébraux majeurs telles que la maladie

d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (**Figure 5**).

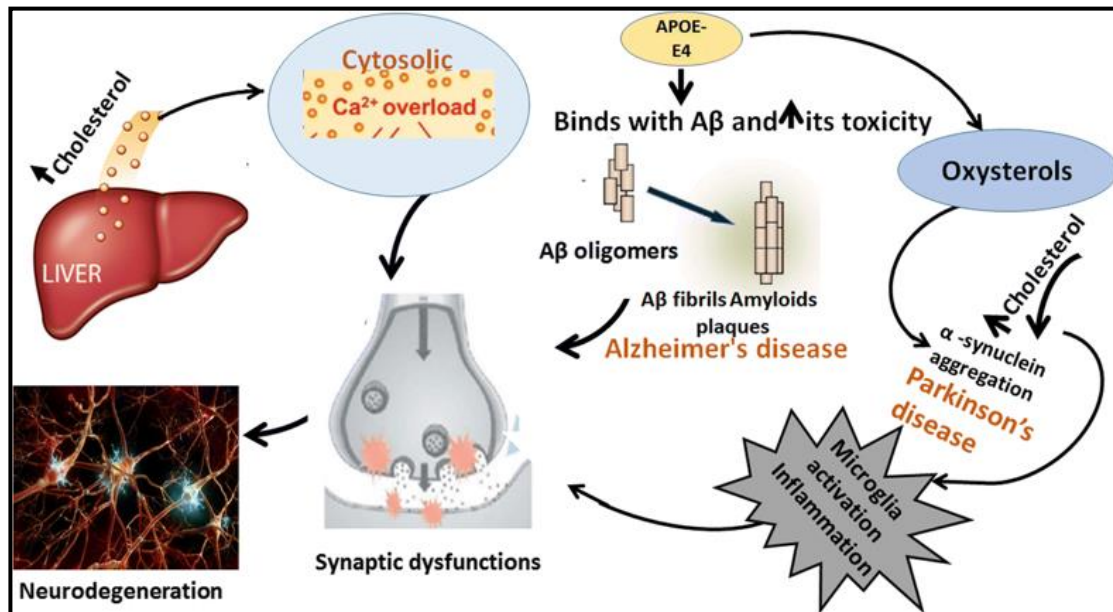


Figure 5 : Rôle du cholestérol dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson

(Hussain G et al., 2019)

c. Acides gras : Nomenclature et classification

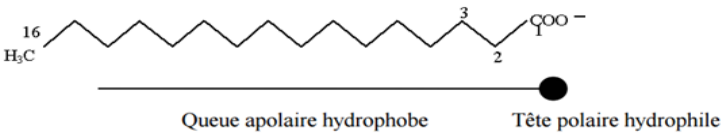
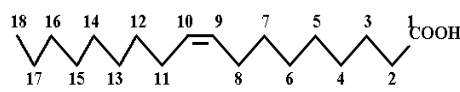
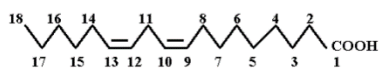


Figure 6: Classification des acides gras

Les lipides sont principalement constitués par les acides gras (AG), qui selon leur nomenclature chimique, désigné par un radical alkyl, formé d'une chaîne d'atomes de carbone avec un groupement carboxyle (COOH) et un groupement méthyl (CH_3) aux extrémités terminales, d'une structure de chaîne carbonée (nature des liaisons, nombre, position et configuration des doubles/triples liaisons) ainsi que par la nature de la fonction acide (**Laï et**

al., 1973). Les acides gras sont classés parmi les composants majeurs de la matière biologique (Nelson & Cox, 2005). Ils sont considérés comme substrats énergétiques présentant environ 30 % de la totalité de l'apport énergétique chez l'Homme (Tvrzicka *et al.*, 2011). Ils sont stockés sous forme de triglycérides (Arterburn *et al.*, 2006) et participent à la formation des esters de cholestérol (Johnson & Schaefer, 2006).

Tableau 1 : Classification des acides gras selon leurs structures, le nombre et la position des doubles liaisons

Acides gras	Acides gras saturés	
	 Un acide gras est constitué par une chaîne hydrocarbonée, plus ou moins longue, apolaire présentant un groupement carboxyle polaire, de formule générale $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$. Les plus abondants sont l'acide palmitique à C16:0 et l'acide stéarique à C18:0.	
	Acides gras insaturés	
	Présentent une ou plusieurs doubles liaisons qui leurs confèrent des propriétés physico-chimiques particulières.	
	Acides gras mono-insaturés	Acides gras polyinsaturés
	Ces AG possédant une seule double liaison dans la chaîne carbonée telle que dans l'acide oléique (C18:1 n-9). $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$ 	Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les acides gras qui ont deux ou plusieurs doubles liaisons, dont la nomenclature dépend de la position de la double liaison sur la chaîne carbonée tels que l'acide linoléique (LA, C18:2 n-6) $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$ 

Les acides gras se subdivisent, selon le nombre de doubles liaisons en AG saturés (AGS) et insaturés (AGI) eux-mêmes répartis en deux sous-groupes; les acides gras mono-insaturés (AGM) et les acides gras polyinsaturés (AGPI) (**Savary *et al.*, 2012**) (**Figure 6; Tableau 1**).

Les acides gras sont synthétisés dans le cytoplasme par deux précurseurs de carbones à l'aide ; d'une protéine porteuse acyle, du NADPH et de l'Acétyl-CoA-carboxylase. Leur dégradation dans la mitochondrie *via* la β -oxydation est accompagnée par la libération d'énergie. Chez les mammifères, les acides gras peuvent être désaturés de manière endogène à cause de l'absence de certaines enzymes « désaturase », par conséquent, une alimentation riche en acide linoléique (AL; 18:2 n-6) et α -linoléique (ALA; 18:3 n-3) est essentiellement qualifiée (**SACN Committee on Toxicity, 2004**). La succession des réactions de désaturations et d'élongations permet la production des acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA; 20:5 n-3), l'acide docosahexaénoïque (DHA; 22:6 n-3) et l'acide arachidonique (AA; 20:4 n-6) (**Tvrzicka *et al.*, 2011**).

Les AGPI sont nécessaires pour le fonctionnement du cerveau. Il a été démontré que les AGPI n-3 et les AGPI n-6 présentent des effets biologiques opposés. Par ailleurs, des études ont mis en valeur le rapport n-3 / n-6 des acides gras consommés (**Noori *et al.*, 2011**). Une modification de ce rapport entraîne un déséquilibre de certaines voies biologiques. En effet, les métabolites dérivés des AGPI n-6 sont considérés comme pro-inflammatoires, alors que les métabolites dérivés des AGPI n-3 sont considérés comme étant des anti-inflammatoires (**Haag, 2003**). Parmi les AGPI les plus actifs au niveau cérébral, on cite le DHA, synthétisé, par β -oxydation péroxysomale, à partir de l'ALA (**Lizard *et al.*, 2012**). Cet acide gras est ensuite incorporé au niveau des membranes cellulaires sous forme de phospholipides, le composant le plus abondant au niveau du cerveau et de la rétine chez l'Homme et les mammifères. L'accumulation de DHA au niveau membranaire peut influencer la fluidité (**Stillwell & Wassall, 2003**), l'élasticité (**Thid *et al.*, 2007**) et la viscosité membranaire permettant aussi le couplage des jonctions communicantes ainsi que la modification des compositions et de la signalisation des lipides membranaire (**Stillwell & Wassall, 2003 ; Wallace, 2015**). De plus, cet acide gras essentiel permet le développement des neurites, accroît la densité des boutons synaptiques et augmente la communication synaptique fonctionnelle des neurones hippocampiques de souris (**Kim *et al.*, 2011**).

1.2.2. Dysfonctionnement mitochondrial et neurodégénérescence

Les mitochondries sont des organites intracellulaires impliqués dans divers processus essentiels des cellules, notamment le métabolisme énergétique par : la production de l'adénosine triphosphate (ATP) (**Schieber & Chandel, 2014**), la production de radicaux libres et leur piégeage, l'homéostasie intracellulaire du calcium, la régulation de la mort cellulaire par apoptose *via* l'activation des caspases (**Halliwell & Gutteridge, 2007 ; Kim et al., 2008**).

Le dysfonctionnement et les altérations pathophysiologiques mitochondriale sont largement impliqués dans le vieillissement, le cancer et le syndrome neurodégénératif et se traduisent par de nombreux troubles métaboliques (**Gastaldi et al., 2008**) telles que la diminution de la capacité oxydative, ainsi que la réduction de la production de l'ATP et la défense antioxydante induite par la génération accrue des espèces réactives de l'oxygène (**Murphy, 2009**). Une réduction de la biogenèse mitochondriale suivie d'une altération du potentiel membranaire, des modifications des processus de fission et de fusion des mitochondries, une altération des activités des protéines oxydatives dues à l'accumulation de ROS (**Piecznik & Neustadt, 2007**) et à l'inhibition de processus qui élimine les mitochondries dysfonctionnelles ; la mitophagie (**Chistiakov et al., 2014**). L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène entraîne des modifications morphologiques des mitochondries (**Kowaltowski, 2009**). L'altération de cet ensemble de fonctions conduit à la neurodégénérescence (**Salvatore DiMauro & Eric Schon, 2008**). Il a été démontré que le dysfonctionnement membranaire et le stress oxydant jouent un rôle crucial dans les maladies neurodégénératives (**Michael T Lin & M Flint Beal, 2006**).

Le dysfonctionnement mitochondriale est aussi un facteur clé dans le développement des accidents vasculaires cérébraux (**Vijayan & Reddy, 2016**). De plus, il a été démontré que le stress oxydant ; un des facteurs contribuant aux dommages cellulaires lors d'une lésion cérébrale ischémique (**Lo et al., 2003**) peut entraîner une altération des fonctions mitochondriales en interagissant avec des composants mitochondriaux et cellulaires tels que l'ADN, les protéines et les lipides (**Chan, 2001 ; Hu & Liu, 2011**). En revanche, le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant jouent un rôle important dans la pathologie précoce de la maladie d'Alzheimer (MA) (**Moreira et al., 2006 ; Moreira et al., 2007 ; Su et al., 2008**). Tout comme la protéine β -amyloïde, la protéine tau est présente principalement dans les neurones ; elle appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (protéine MAP). Lorsqu'elle est hyper phosphorylée elle a un impact négatif sur la dynamique mitochondriale induisant l'allongement de son réseau (**DuBoff et al., 2013**). Elle

altère aussi le transport axonal et réduit le nombre des mitochondries transportées vers les synapses (**Eckert et al., 2014**) conduisant à la dégénérescence synaptique déclenchant par la suite la mort neuronale.

Les voies de stress mitochondrial ont permis de mettre en évidence des cibles thérapeutiques (**Reddy, 2009 ; Friedman & Nunnari, 2014**). Afin de réduire le dysfonctionnement mitochondriale et le stress oxydant, des stratégies thérapeutiques ont été élaborées notamment l'intervention sur le mode de vie, des stratégies pharmacologiques et d'approches ciblées sur les mitochondries permettant ainsi de maintenir la qualité mitochondriale dans les syndromes métaboliques (**Bhatti et al., 2017**).

1.2.3. Dysfonctionnement peroxysomal et neurodégénérescence

Les peroxysomes sont des organites cellulaires formés à partir du réticulum endoplasmique (RE) et sont présents dans toutes les cellules eucaryotes (**Hruban et al., 1972**). Ces organites sont délimités par une simple membrane de 6 à 8 nm de diamètre. La composition chimique, la taille et le nombre des peroxysomes varient d'une cellule à une autre et selon le type cellulaire. En effet, la membrane du réticulum endoplasmique recrute des facteurs protéiques particuliers tels que les peroxines (**Agrawal & Subramani, 2016**) qui s'associent à leur tour dans des structures lamellaires recrutant d'autres protéines membranaires et matricielles. Les vésicules du RE se détachent et deviennent des peroxysomes. Ces petits organites sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques importantes. Les peroxysomes participent ; au métabolisme de dégradation des acides gras à longue et à très longue chaîne (AGTLCs) comme C24:0 et C26:0 (**Baarine et al., 2009 ; Lizard et al., 2012 ; Baker et al., 2015**) via la voie de la β -oxydation et à la dégradation des acides gras possédant un groupement 3-méthyl comme l'acide phytanique via l' α -oxydation (**Elias, 2015**). Ces voies métaboliques nécessitent le transport de métabolites à l'intérieur et à l'extérieur des peroxysomes via le transporteur *ATP Binding Cassette* (ABC) (**Imanaka, 2018**). Les peroxysomes participent également dans différentes voies anaboliques et cataboliques tels que la synthèse des plasmalogènes, des acides biliaires, de l'acide docosahexaénoïque (DHA:C22:6 n-3) et du cholestérol. En outre, ils interviennent dans le maintien de taux d'acides gras présents, en quantités importantes, sous forme de complexe lipoprotéique au niveau de la myéline délimitant les axones des neurones. Autrement, une altération de la biogenèse péroxysomale ou une β -oxydation défectueuse peut aboutir à une accumulation des AGTLCs au niveau du plasma ainsi qu'au niveau des tissus contribuant à la démyélinisation neuronale (**Trompier et al., 2014**). Par ailleurs, une légère modification en composition des acides gras

peut largement modifier la fonction neuronale ce qui explique la relation entre le dysfonctionnement péroxydomale et les maladies liées au vieillissement, notamment les maladies neurodégénératives. Les anomalies cérébrales liées au dysfonctionnement péroxydomale induisent aussi des troubles tels que le stress oxydant, l'inflammation, la mort cellulaire, la migration neuronale et la différenciation neuronale (**Trompier *et al.*, 2014**). En effet, le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer et de Parkinson suggère une perte de péroxydomes ou des protéines péroxydomales permettant l'installation et le développement des troubles neurodégénératifs (**Cipolla & Lodhi, 2017 ; Deori *et al.*, 2018**) (**Figure 7**). De ce fait, il a été démontré que les patients Alzheimer présentent une accumulation des AGTLCs induisant une diminution des taux de plasmalogènes, une augmentation de la densité des peroxysomes dans les cellules neuronales et une diminution du nombre des peroxysomes dans les neurites (**Söderberg *et al.*, 1991 ; Astarita *et al.*, 2010 ; Kou *et al.*, 2011**).

La régulation de la quantité et le contrôle de la qualité des peroxysomes dépend de l'environnement, qui permettra le maintien de nombre ainsi que de la fonction de ces organites (**Anding & Baehrecke, 2017**) nécessitant un processus dynamique basé sur la biogenèse et la dégradation ou pexophagie modulant la quantité de peroxysomes. En effet, l'autophagie sélective au niveau péroxydomale connu sur le nom de pexophagie, joue un rôle principal pour le maintien de l'homéostasie lors divers réactions de stress (anorexie et hypoxie) (**Cho *et al.*, 2018**). Conformément à ces conditions d'environnement, le traitement des rats ayant un régime alimentaire riche en graisse peut induire un diabète permettant d'altérer la β -oxydation au niveau du cortex cérébral, entraînant une accumulation de β -amyloïde dans le cerveau (**Shi *et al.*, 2016**).



Figure 7 : Effet des dysfonctionnements péroxysomaux dans les maladies neurodégénératives

Il a été bien démontré que les peroxysomes agissent sur la production de H_2O_2 et que ce processus n'est pas seulement limité aux mitochondries (**Terlecky et al., 2012**). Au cours de vieillissement, la fonction ainsi que le nombre de péroxysomes est réduit induisant une altération de métabolisme des ROS causant par la suite le stress oxydant observé dans différentes pathologies tel que la maladie d'Alzheimer qui se traduit par l'accumulation de la β -amyloïde (**Terlecky et al., 2012 ; Fransen et al., 2013**). En revanche, le dysfonctionnement peroxysomal pourrait être un précurseur du dysfonctionnement mitochondrial (**Hwang et al., 2012**) et vice versa. En effet, tout comme l'altération génétique de la β -oxydation mitochondriale, l'altération de la β -oxydation péroxysomale peut agir négativement sur les gènes codant pour les transporteurs d'acides gras ; acyl-CoA, ABCD1, ABCD3, ACOX1, D-PBE, SCPX ainsi que l'enzyme nécessaires à la dégradation des acides gras 2-méthyl et des acides biliaires l'enzyme AMACR (α 2-méthylacyl-CoA racémase) (**Van Veldhoven, 2010 ; Ferdinandusse et al., 2014**). Les peroxysomes et les mitochondries sont des organites dynamiques. Ces deux organites présentent une interaction fonctionnelle étroite.

2. Facteurs neurotrophiques endogènes et exogènes

2.1 Définition d'un facteur neurotrophique

Les facteurs neurotrophiques se définissent comme une famille de polypeptides (~200 acides aminés) sécrétés par des cellules spécialisées qui jouent un rôle crucial dans la neurogenèse et dans des épisodes post-lésionnels. Les neurotrophines jouent également un rôle important dans la régulation de la prolifération, la survie et la différenciation des cellules neuronales au cours du développement du système nerveux ou dans les réponses adaptatives aux lésions cérébrales aiguës ou progressives (**Bothwell, 2016**). Ces molécules pléiotropes jouent un rôle clé à la fois dans le développement neuronal ainsi qu'à la plasticité neuronale (**Vilar & Mira, 2016**) par la mise en place de connexions fonctionnelles et appropriées avec les cellules cibles spécifiques *via* le contrôle de la croissance axonale et du guidage, la genèse et le développement de dendrites, et la plasticité synaptique (**Ledda & Paratcha, 2016**). De ce fait, la compréhension du mécanisme d'action des facteurs neurotrophiques impliqué dans leurs effets sur les processus de survie, de prolifération et de la maturation neuronale, permet de considérer les neurotrophines comme cibles thérapeutiques privilégiées. Un défaut dans la sécrétion en neurotrophines, ou de l'activation de leur récepteur est associé à la progression des processus de neurodégénérescence notamment dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (**Hoglinger et al., 2004 ; Gakhar-Koppole et al., 2008 ; O'Keeffe et al., 2009 ; Vilar & Mira, 2016**). La sécrétion des facteurs neurotrophiques est générée soit par les neurones ou par leur territoire d'innervation ou encore par les cellules extraneuronales. Il existe au moins huit familles de facteurs neurotrophiques identifiées selon des classifications variables (**Nathanson, 2012 ; Voutilainen, 2015**) regroupées en deux grandes familles suivant leur origine à savoir les facteurs neurotrophiques endogènes et exogènes.

Dans le cerveau, les cellules astrogliales constituent la principale source de neurotrophines (**Douglas-Escobar et al., 2012; Kim et al., 2016**). De nombreuses neurotrophines sont sécrétées par les astrocytes réactifs, on peut citer notamment le *nerve growth factor* (NGF), le *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), le *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), le *fibroblast growth factor* (FGF2) ou encore le *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Ces facteurs promeuvent à la fois la survie des astrocytes et des neurones. Il a été démontré que la surexpression de NGF rend les souris « parkinsoniennes » plus résistantes au processus de neurodégénérescence (**Wu et al., 2012**). En outre, les astrocytes cultivés en présence de l'agent neurotoxique méthylmercure surexpriment les

neurotrophines NGF, BDNF ou encore le GDNF, et l'administration de milieu conditionné glial confère aux neurones une protection vis-à-vis de ce métal (**Takarada et al., 2012; Takemoto et al., 2015**). Des travaux menés dans notre laboratoire ont montré que l'octadécaneuropeptide ODN, qui appartient à une famille de peptides exclusivement produits par les cellules astrogliales (**Tonon et al., 2006**), présente une activité anti-apoptotique à la fois sur les neurones en grain traités à la 6-OHDA et sur des astrocytes corticaux en culture exposés à un stress oxydant (**Hamdi et al., 2012a; Kaddour et al., 2013**). De plus, l'administration de milieu conditionné de cellules astrogliales, traitées par un agent inducteur de la sécrétion d'ODN, empêche la mort apoptotique des neurones en grain du cervelet provoquée par le H₂O₂ (**Masmoudi-Kouki et al., 2011**). En revanche la répression de l'expression du précurseur de l'ODN par la technique des ARN interférents (siARN) dans les astrocytes en culture, augmente la vulnérabilité des cellules neuronales vis-à-vis de la mort apoptotique (**Ghouili et al., 2018**). L'ensemble de ces données indique que le gliopeptide ODN, auquel nous nous sommes plus particulièrement intéressés, pourrait être considéré comme un puissant neuroprotecteur et neurotrophique endogène.

2.2 Facteurs neurotrophiques endogènes

2.2.1. L'Endozépine, ODN

Le terme endozépine (EZ) est une nomenclature générique désignant une famille de peptides endogènes qui ont été initialement identifiés comme les ligands endogènes des récepteurs des benzodiazépines (BZD) (**Tonon et al., 2006**) (**Figure 8**). Toutes les endozépines dérivent d'un même précurseur, un polypeptide de 11 KDa qui est nommé *diazepam-binding inhibitor* (DBI), pour sa capacité à déplacer de façon compétitive le diazepam tritié de ses sites de liaison sur des membranes neuronales de synaptosomes (**Costa et al., 1983**). Le DBI est également connu, sous le nom *d'acyl-CoA binding protein* (ACBP) pour sa capacité à lier les esters d'acyl-coenzyme A et à stimuler la synthèse d'acides gras (**Mogensen et al., 1987**). La séquence primaire du DBI, caractérisée dans de nombreuses espèces allant des bactéries aux mammifères, a été hautement conservée au cours de l'évolution (**Tonon et al., 2006 et 2013b**), suggérant que les peptides de la famille des EZs exercent des activités biologiques importantes. La séquence du DBI montre la présence de plusieurs sites monobasique et dibasique, sites consensus de clivage protéolytique par les pro-hormones convertases (PC), et dont trois d'entre eux délimitent les séquences des fragments biologiquement actifs, à savoir le triakontatétraneuropeptide (TTN, DBI₁₇₋₅₀) et l'octadécaneuropeptide (ODN, DBI₃₃₋₅₀). Bien

que les enzymes responsables du clivage du DBI ne soient pas complètement caractérisées, l'existence du TTN et l'ODN a été identifiée par des approches biochimiques dans des extraits de divers tissus et organes notamment le cerveau de souris, du singe et de l'Homme (**Ferrero et al. 1984 ; Ferrero et al. 1986, Slobodyansky et al., 1989 ; Farzampour et al., 2015**) (Figure 8).

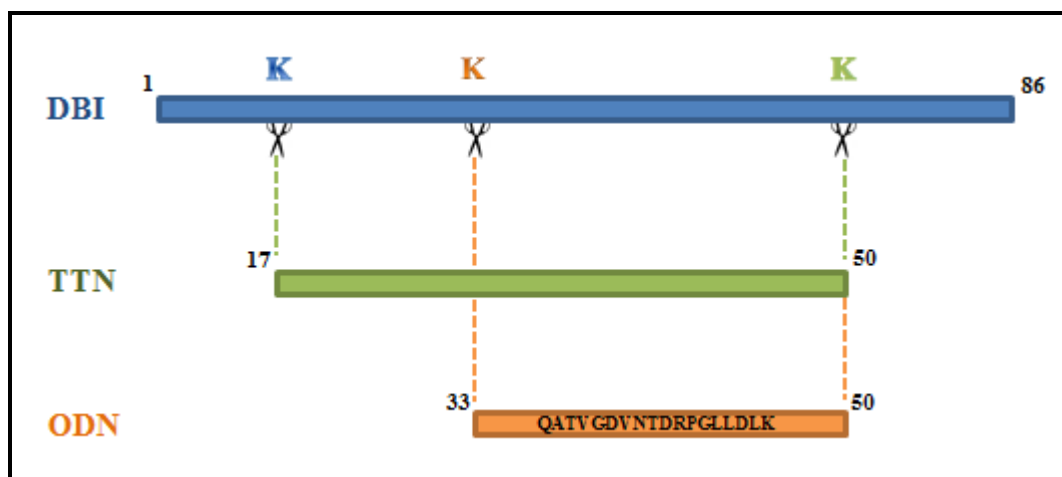


Figure 8 : Représentation schématique de maturation de DBI.

K : résidu lysine ; site potentiel de clivage protéolytique.

2.2.1.1. Structure, régulation de biosynthèse et sécrétion des endozépines

a. Structure des endozépines

A ce jour, 10 variantes de transcription du gène du DBI ont été caractérisées chez différentes espèces de mammifères avec des niveaux d'expression variables et tissus dépendants (**Ludewig et al., 2011a ; Ludewig et al., 2011b**). Les différents isoformes correspondent à des protéines de nature hydrophile, de taille variant entre 85 et 135 acides aminés dépourvues de séquence signal permettant l'adressage du DBI vers le réticulum endoplasmique puis vers l'appareil de Golgi (**Tonon et al., 1990 ; Burton et al., 2005**). Chez l'Homme, il existe 3 formes de DBI de 86, 88 et 104 acides aminés (**Nitz et al. 2005**). La protéine de 88 acides aminés diffère de la forme plus courte par ses 4 acides aminés N-terminaux et résulte de la transcription du gène à partir d'un promoteur alternatif (**Nitz et al., 2005**), tandis que la forme longue, qui présente une extension de 18 résidus en position N-terminale, résulte d'un épissage alternatif du transcrit primaire (**Kolmer et al., 1995**). La forme longue du DBI composée de 135 acides aminés est exprimée chez l'Homme et la souris. Le DBI est majoritairement exprimé dans les tissus possédant un métabolisme lipidique important,

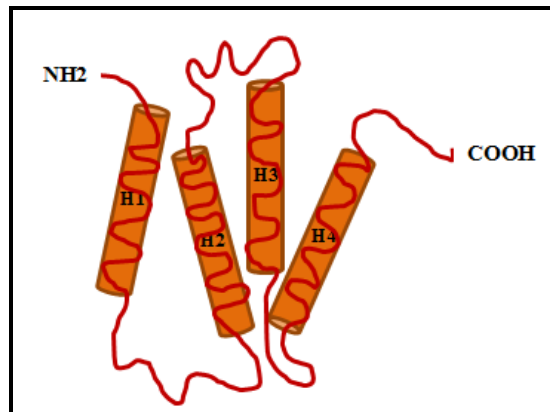


Figure 10 : Représentation schématique tridimensionnelle de la structure du DBI. Structure de quatre hélices α qui englobent des résidus, reliés par une charnière flexible, sont nommées respectivement ; H1 (Glu4-Leu15), H2 (Asp22-Val35), H3 (Gly52-Lys60) et H4 (Ser68-Tyr85).

b. Régulation de la biosynthèse et de la sécrétion des endozépines

Le DBI est une protéine dépourvue de séquence signal nécessaire à l'adressage du précurseur de TTN et ODN vers le réticulum endoplasmique ensuite vers l'appareil de Golgi, ce qui ne permet pas l'empaquetage du DBI et de ses dérivés dans des vésicules de sécrétion (Tonon *et al.*, 1990 ; Burton *et al.*, 2005). Cette constatation a été prouvée par des observations ultra-structurales révélées par la microscopie électronique montrant la diffusion de la protéine DBI dans le cytoplasme des cellules de Bergman, cellules astrogliales du cervelet (Tonon *et al.*, 1990). L'analyse par spectrométrie de masse du sécrétome des astrocytes en culture a révélé la présence des quantités substantielles d'endozépines dans les surnageants de culture (Tokay *et al.*, 2005 ; Masmoudi *et al.*, 2005 ; 2006 ; Ghouili *et al.*, 2018). L'analyse HPLC a révélé aussi que les cellules gliales cultivées libèrent au moins deux formes d'endozépines (TTN et ODN) (Patte *et al.*, 1999 ; Masmoudi *et al.*, 2003). Il est clairement démontré que la libération du DBI n'est pas affectée par l'inhibiteur de transport vésiculaire Golgien (bréfeldine A) (Lafon-Cazal, 2003). Parallèlement, l'induction de l'autophagie provoque une libération non conventionnelle de DBI par les astrocytes de rat en culture (Loomis *et al.*, 2010). Ces données indiquent que les peptides de la famille de l'ODN peuvent être libérés par un mécanisme indépendant de la voie vésiculaire d'exocytose classique.

Bien que le mode de sécrétion du DBI et de ses dérivés ne soit pas encore clairement caractérisé, la sécrétion d'EZ est régulée par de nombreux facteurs et elle est modulée dans

différentes situations physiopathologiques. Le dosage radioimmunologique à l'aide d'anticorps dirigés contre l'ODN révèle que les taux des peptides apparentés à l'ODN (ODN-LI) dans le plasma sont élevés chez les individus souffrant de choc septique (**Clavier et al., 2014**). Des études *in vitro* sur des cultures d'astrocytes corticaux montrent que la libération d'ODN-LI est un phénomène sous contrôle peptidergique où la production d'ODN-LI est régulée positivement par des neuropeptides tels que le *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) (**Masmoudi et al., 2003 ; 2006**), l'urotensine II (UII) et l' *UII-related peptide* (URP) (**Jarry et al., 2010**), le peptide β -amyloïde (**Tokay et al. 2005 ; 2008**), des cytokines (le TNF- α et l'IL1- β) (**Clavier et al., 2016**), des hormones stéroïdiennes (**Loomis et al., 2010**), ou encore des concentrations élevées en ion potassium (**Farzampour et al., 2015**), et négativement par le neuropeptide somatostatine (**Masmoudi et al., 2005**) et le neurotransmetteur GABA (**Patte et al., 1999**). Les études pharmacologiques indiquent que la libération d'EZ par les cellules astrogliales et rétinienne met en jeu l'activité des transporteurs *ATP-Binding Cassette* (ABC) dont l'activité est dépendante de leur état de phosphorylation par les protéines kinases PKA et PKC (**Masmoudi et al., 2003 ; Masmoudi et al., 2005 ; Qian et al., 2008 ; Tokay et al., 2005**). Une étude réalisée sur la levure *Dictyostelium discoideum* a montré une interaction directe entre le DBI et les transporteurs ABC sérine protéase (**Cabral et al., 2006**).

Des données récentes indiquent que le DBI libéré au milieu extracellulaire pourrait être converti en deux protéines ; TTN et ODN par une protéase semblable à la trypsine (**Loomis et al., 2010**). Bien que le mode de sécrétion du DBI et de ses dérivés soit inconnu, il a été démontré que les mécanismes de la libération des endozépinines par les cellules astrogliales sont contrôlés par plusieurs facteurs. La libération de l'ODN peut être régulée négativement par différents composés neuroactifs agissant par le biais de la voie de signalisation de l'adénylyl cyclase (AC), par les neurotransmetteurs classiques comme le neurotransmetteur GABA (**Patte et al., 1999**) et la somatostatine (**Masmoudi et al., 2005**). La libération de l'ODN peut aussi être positivement régulée par les neuropeptides PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) (**Masmoudi O et al., 2003 ; 2005**), l'urotensine II (UII) et l'*UII-related peptide* (URP) (**Jarry et al., 2010**) et la β -amyloïde (**Tokay et al., 2005 ; 2008**). De plus, cette libération peut être contrôlée par des hormones stéroïdiennes (cortisol, pregnenolone ou progestérone) (**Loomis et al., 2010**) ou encore des cytokines du type TNF- α et IL1- β (**Clavier et al., 2014 ; 2016**). Elle est modulée dans différentes situations physiopathologiques (**Qian et al., 2008 ; Ghouili et al., 2018**). Des études cliniques ont montré la libération de DBI ainsi que ses dérivés dans diverses pathologies neurologiques (**Ferrero et al., 1988 ; Roy, 1991**). Dans

ces cas, le taux des endozépines dans le plasma et le liquide céphaloraciden (LCR) peut augmenter (Ferrarese *et al.*, 1990 ; Venturini *et al.*, 1998 ; Breitling, 2004 ; Clavier *et al.*, 2014) ou diminuer (Barbaccia *et al.*, 1986; Rothstein *et al.*, 1989).

Le dosage radioimmunologique (RIA) effectué à l'aide d'anticorps dirigés contre l'ODN révèle que les taux des peptides (ODN-LI) dans le plasma sont élevés chez les individus souffrant de choc septique (Clavier *et al.*, 2014). D'autres études *in vitro* montrent que la libération d'ODN-LI est aussi régulée positivement par des neuropeptides tout comme PACAP (Masmoudi *et al.*, 2003 ; 2006) favorisant ainsi la translocation du DBI et ses dérivés dans le milieu extracellulaire (Trzeciak *et al.*, 2004). La libération de l'ODN-like d'astrocyte de rat cultivé est inhibée par un bloqueur de transporteurs ABC (Tokay *et al.*, 2008).

2.2.1.2. Distribution de l'ODN dans le SNC

Les endozépines sont principalement exprimées dans le SNC ainsi que dans divers organes et tissus périphériques (Tonon *et al.*, 2013 ; Farzampour *et al.*, 2015). Les taux en EZs sont différents selon les organes : dans les muscles squelettiques (18 pM), les gonades (126 pM) (Rhéaume *et al.*, 1990), l'intestin grêle (précisément le duodénum : 100 pM), les reins (73 pM), les glandes surrénales (15 pM), les poumons (13 pM), le cœur (30 pM), le foie (22 pM), la rate (11 pM) (Bovolin *et al.*, 1990) et au niveau du cerveau (entre 10 à 50 pM) sachant que ce dernier constitue la principale source de peptides de la famille ODN chez les vertébrés (Qian *et al.*, 2008) (Figure 11). Des études d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* ont montré que les EZs sont largement distribuées dans le cerveau (Yanase *et al.*, 2002 ; Tonon *et al.*, 2006) avec des quantités particulièrement augmentées dans certaines régions notamment au niveau du bulbe olfactif, cortex cérébral, striatum, hypothalamus, hippocampe, amygdales et cervelet (Alho *et al.*, 1989 ; Tonon *et al.*, 1990 ; Miachon *et al.*, 1991) (Figure 11).

La maturation du DBI diffère d'une région cérébrale à une autre. L'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ainsi que le dosage par (RIA) ont révélé que l'immunoréactivité détectée au niveau de l'hypothalamus correspond essentiellement au DBI (Malagon *et al.*, 1992), tandis qu'au niveau du cortex cérébral, hippocampe et striatum, des taux significatifs des dérivées du DBI ; ODN et TTN ont été détectés (Rouet-Smih *et al.*, 1992 ; Malagon *et al.*, 1993).

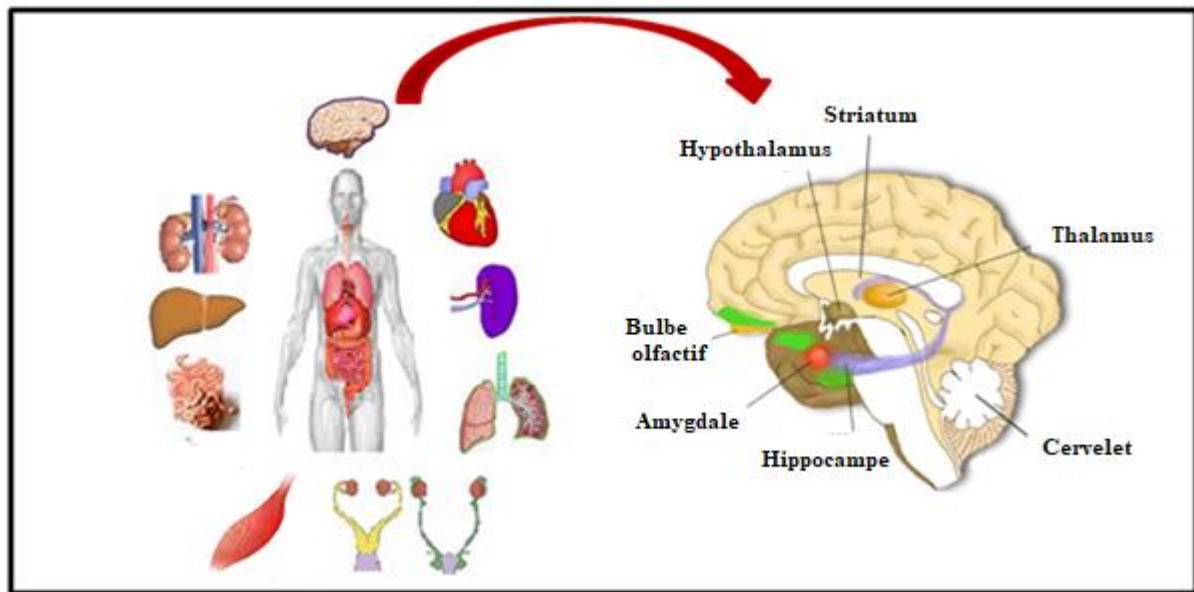


Figure 11 : Représentation schématique de la distribution des peptides de la famille de l'ODN dans différents organes et dans le SNC

Quelques études immunohistochimiques réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre le DBI ont montré une localisation des EZs dans les neurones (**Alho et al., 1985 ; Christian et al., 2013**), toutefois, la majorité des données de la littérature indique que les EZs sont principalement exprimées dans les cellules astrogliales (**Yanase et al. 2002 ; Christian & Huguenard, 2013 ; Lanfray et al., 2013**), notamment dans les astrocytes de différentes couches du cortex cérébral, de l'hippocampe, de l'amygdale et du bulbe olfactif (**Tonon et al., 1990**). Les techniques d'immunohistochimie réalisées avec un anticorps dirigé contre l'ODN et/ou le DBI montrent la présence de ces peptides au niveau des épendymocytes bordant les ventricules cérébraux, y compris les tanocytes de l'hypothalamus (**Alho et al., 1988; Tonon et al., 1990; Lanfray et al., 2013; Guillebaud et al., 2017**) et au niveau des piyucites de l'hypophyse (**Alho et al., 1988 ; Tong et al., 1991**). De plus, des études réalisées en microscopie électronique ont montré la présence de ces peptides dans les cellules de Bergmann du cervelet et au niveau des astrocytes des noyaux paraventriculaires, arqués et supraoptiques (**Vidnyánszky et al., 1994 ; Yanase et al., 2002**). Enfin, dans la rétine, les EZs sont exclusivement exprimées par des cellules gliales spécialisées, les cellules de Müller. En revanche, le développement d'anticorps dirigés contre les endozépines a permis de montrer que ces peptides sont aussi présents au niveau de la substance blanche et seules quelques cellules gliales localisées dans le *corpus callosum* sont marquées (**Alho et al., 1985**). Dans le système nerveux périphérique (SNP), l'immunomarquage du DBI et de ses dérivées ODN et TTN est associé aux cellules de Schwann (**Lacor et al., 1990**). La nature des cellules qui expriment les

endozépines montre des changements au cours de l'évolution indiquant que le DBI ainsi que ses dérivées sont présents dans les cellules gliales chez la grenouille (**Malagon et al., 1992**), alors que chez le poisson, la localisation du peptide est strictement neuronale (**Malagon et al., 1992**).

Les endozépines sont stockées aussi au niveau des organes et tissus périphériques et dans plusieurs types cellulaires tels que les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (**Steyaert et al., 1991**), les cellules de Leydig des testicules (**Bovolin et al., 1990; Rhéaume et al., 1990**), les cellules α et δ du pancréas (**Johansson et al., 1991 ; Sandberg et al., 1998**) et les cellules acineuses de la prostate (**Pelletier et al., 1991**). Au niveau de la surrénale la localisation des endozépines est strictement limitée à la zone glomérulaire du cortex (**Besman et al., 1989**).

2.2.1.3. Récepteurs et activités biologiques de l'ODN

Les endozépines forment une famille de ligands naturels endogènes susceptibles d'interagir avec les récepteurs des benzodiazépines (BZs). De nombreuses études comportementales, pharmacologiques et d'électrophysiologies suggèrent que les benzodiazépines sont capables de moduler une large partie des effets induits, par le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, l'acide γ -aminobutyrique (GABA) d'où l'existence des sites de reconnaissance spécifiques au niveau du cerveau des mammifères, saturables et de fortes affinités aux benzodiazépines (**Mohler et al., 1978**). L'activité des BZs est donc mise en évidence par la présence des récepteurs associés au complexe GABA_A / canal Cl⁻ connus sous le type de récepteur central nommé aussi *central benzodiazepine receptor* (CBR) (**Costa et al., 1983 ; Ferrero et al., 1986 ; Bormann, 1991**). Tout comme le DBI, il a été démontré que l'ODN possède la capacité de déplacer le diazépam et de moduler la transmission GABAérgique suite à une réaction allostérique (**Guidotti et al., 1983**); il peut agir soit comme un agoniste donc un modulateur allostérique positif (MAP) favorisant ainsi l'action du GABA, ou soit comme un agoniste inverse en tant que modulateur allostérique négatif (MAN) réduisant l'action de GABA, selon la composition en sous-unités du récepteur GABA_A (**Bormann, 1991; Farzampour et al., 2015**). L'analyse moléculaire du récepteur GABA_A a montré l'existence d'une structure pentamérique de sous unités ($2\alpha_2 \beta_1 \gamma_2$) (**Herb et al., 1992 ; Knoflach et al., 1992**). En effet, la transfection simultanée des ADNc codant pour les sous unités α et β induit l'expression d'un récepteur associé au canal chlore dont l'ouverture dépend du GABA et est réduite ou stimulée par les neurostéroïdes (**Puia et al., 1992**).

D'autres études ont montré que les endozépines peuvent interagir avec une autre classe de récepteurs de type périphérique ou PBR, renommés *translocator protein* (TSPO) qui sont associés à un complexe macromoléculaire formant un canal permettant le passage de cholestérol à travers la membrane mitochondriale (**Bribes et al., 2004; Papadopoulos et al., 2009**). Les recherches menées jusqu'au 1995, ont considéré que l'ODN agit comme un ligand endogène des CBR alors que le TTN agit comme un ligand spécifique pour le TSPO.

Tandis que, des études réalisées sur les astrocytes en culture ont montré que l'ODN est considéré aussi comme ligand endogène d'un récepteur métabotrope couplé à une protéine G (RCPG) dont le plan fonctionnel et pharmacologique diffère des récepteurs des BZs (**Gandolfo et al., 1997 ; Guzzi et al., 2016**). Sur des cultures d'astrocytes et des neurones en grain de cerveau de rat, il a été démontré que l'ODN est capable de stimuler le métabolisme des polyphosphoinositides (PIPs) *via* la phospholipase C (PLC) couplée à une protéine G (**Patte et al., 1995 ; Gandolfo et al., 1997 ; Kaddour et al., 2013**), capable aussi de stimuler la mobilisation du calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ *via* des pools intracellulaires par un mécanisme de type autocrine ou paracrine et indépendamment de l'activation des récepteurs de benzodiazépines, en outre, l'ODN est capable de stimuler l'activité de complexe (AC/AMPC) (**Lamacz et al., 1996 ; Gandolfo et al., 1997 ; Leprince et al., 2001**) dans les astrocytes corticaux de rat. Cette molécule stimule aussi la phosphorylation des protéines *extracellular signal-regulated Kinase* (ERK 1 et ERK 2) (**Hamdi et al., 2012 b ; Kaddour et al., 2013**). Ceci montre que l'ODN est un ligand naturel susceptible d'interagir d'une manière spécifique sur les récepteurs couplés à une protéine $G_{i/o}$ et G_s (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des propriétés pharmacologiques des récepteurs à l'ODN

Ligands	Types de récepteurs et voies de transduction	
	CBR	RCPG
ODN	• Agoniste inverse • $K_d \sim \mu M$ • Modulation de la conductance Cl^-	• Agoniste • $EC_{50} \sim 1nM$ (au niveau des astrocytes) • $EC_{50} \sim 1pM$ (au niveau des neurones) • G_s-AC-AMPC • $G_{i/o}$-PLC-IP₃-$[Ca^{2+}]$

EC₅₀ : concentration efficace 50, K_d : constante de dissociation

CBR : central benzodiazepin receptor ; RCPG : récepteur couplé à une protéine G

a. Effets de l'ODN associés à l'activation du récepteur central des benzodiazépines

Au niveau cellulaire, le DBI, réduit le courant chlore induit par l'action de GABA sur les cellules de la moelle épinière de souris (**Bormann et al., 1985**). Plusieurs études *in vivo* montrent que l'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'ODN (10 à 100 ng) chez les rongeurs induit des comportements proconflictuels, pro-convulsivants agressifs et anxiogènes (**Ferrero et al., 1986 ; Kavaliers, 1986 ; De Mateos-Verchere, 2001 ; Budry et al., 2016**). Contrairement aux benzodiazépines qui potentialisent l'action du GABA au niveau des récepteurs CBR/GABA_A « selon le phénomène de GABA-shift » exercent des effets anticonvulsivants, anxiolytiques, myorelaxants et sédatifs. En modulant négativement la transmission GABAergique, l'ODN se comporte comme agoniste inverse des récepteurs CBR d'où sa capacité de réduire la conductance chlore permettant ainsi l'augmentation de l'excitabilité neuronale (**Bormann et al., 1991**). L'administration centrale de l'ODN provoque une réduction de temps de sommeil chez les souris induite par une injection pentobarbital (**Dong et al., 1999**). Par modulation similaire sur les récepteurs GABAergiques, l'ODN réduit la prise de boisson chez les souris (**Manabe et al., 2001**). De plus, la présence des doses croissantes d'ODN (10^{-10} M et 10^{-5} M) sur des explants d'hypothalamus de grenouille montre une augmentation dose-dépendante des taux de neurostéroïdes (17-hydroxyprégnénolone), de progestérone et de dihydrotestostérone par une modulation allostérique de type MAN (**Do-Rego et al., 2001**). Alors que d'autres études plus récentes montrent que le DBI et ses dérivés sont capables de réguler l'activité du noyau réticulé du thalamus et la transmission thalamo-corticale (**Christian et al., 2013 ; Christian & Huguenard, 2013 ; Möhler, 2014**) renforçant la transmission GABAergique *via* une action de type MAP (**Christian et al., 2013**).

Au niveau cellulaire, l'ODN bloque aussi la sécrétion hormonale générée par les cellules mélanotropes de l'hypophyse de grenouille (**Tonon et al., 1989**). Sur des cultures d'astrocytes de rat, il a été démontré que l'ODN stimule l'incorporation de la thymidine tritiée et donc la prolifération cellulaire *via* l'activation des récepteurs CBR/GABA_A (**Gandolfo et al., 1997**). En accord avec ces données, des travaux réalisés chez les rongeurs adultes démontrent que l'ODN stimule la prolifération des cellules souches progénitrices de la zone germinative sousventriculaire (**Alfonso et al., 2012**) (**Figure 12**). En revanche, l'inhibition de la transcription du gène du DBI par transfection de shARN *in vivo* conduit à l'arrêt de croissance des neuroblastomes associé à la réduction de neurones néoformés au niveau du bulbe olfactif sans affecter la viabilité cellulaire (**Alfonso et al., 2012**).

L'ensemble de ces données prouve que l'ODN en tant qu'endozépine naturelle exerce un effet neurotrophique renforçant son implication dans le processus de la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire (**Figure 12**).

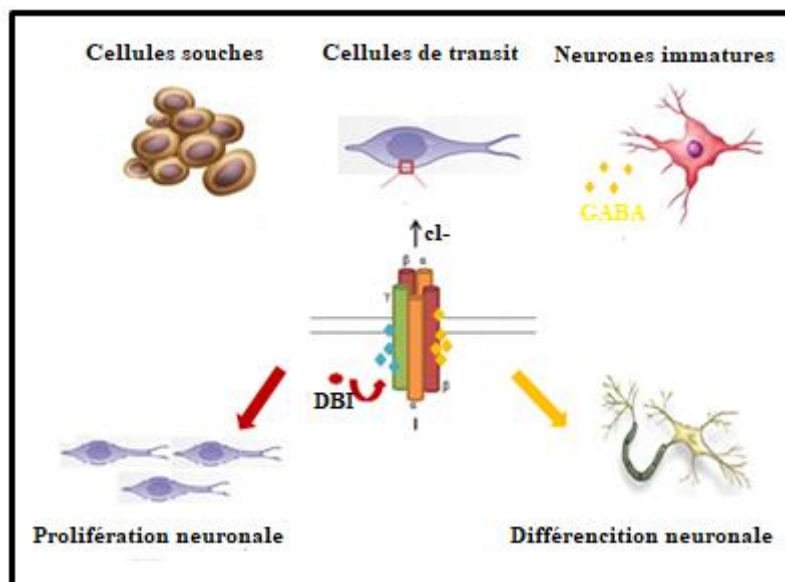


Figure 12 : Représentation schématique de l'effet de l'ODN / DBI sur les récepteurs GABA_A dans la zone subventriculaire du cerveau de souris. *Cl⁻*, ion chlore ; *DBI*, diazepam binding inhibitor ; *ODN*, octadécaneuropeptide, *GABA*, gamma-amino-butiric acid.

b. Effets de l'ODN associés à l'activation du récepteur métabotrope

Des études *in vivo* ont été réalisées montrant que l'ODN (30 à 100 ng) injecté par la voie i.c.v. provoque une anorexie accompagnée par une perte de poids chez les rongeurs et les poissons rouges (**De Mateos-Verchere et al., 2001 ; Matsuda et al., 2007 ; 2010**) en modifiant l'activité des noyaux hypothalamiques suite à une augmentation des ARNm codant pour le précurseur pro-opiomélanocortine (POMC) de peptide anorexigène nommé *α-melanocyte-stimulating hormone* (**Compere et al., 2003**), ainsi que la réduction de l'expression de neuropeptide Y (NPY) ; un neuropeptide oréxigène (**Compere et al., 2005**). Via la même voie d'injection, il a été montré que l'ODN est capable à la fois de stimuler l'expression génétique de la *corticotropin-releasing hormone* (CRH) au niveau des noyaux paraventriculaires (**Compere et al., 2005**) et aussi de réduire l'expression de la gonadolibérine (GnRH) dans les noyaux supraoptiques (**Compere et al., 2004**). Des études pharmacologiques montrent que ces différents effets de l'ODN sont indépendants des récepteurs CBR car ils ne sont ni mimés par un agoniste des récepteurs CBR ni bloqués par un antagoniste des CBR (**Tonon et al., 2013 a**) suggérant que l'ODN peut agir à travers un autre type de récepteur ; un récepteur couplé de

protéine G (RCPG) (**Lamacz et al., 1996**). Ces constatations ont conduit à un concept d'analogue cyclique formant un antagoniste métabotrope puissant de l'ODN connu sous le nom de cyclo₍₁₋₈₎ [DLeu⁵] OP (**Leprince et al., 2001**) capable de bloquer les effets du gliopeptide sur le système hypothalamique (**Matsuda et al., 2010 ; Tonon et al., 2013 b**) d'où le blocage de l'expression des NPY, CRH et GnRH. L'administration de l'antagoniste d'ODN/RCPG seul, montre une augmentation de taux d'ARNm codant pour NPY et GnRH ainsi qu'une diminution de l'expression CRH, indiquant que l'ODN endogène exerce un tonus inhibiteur ou stimulateur sur l'activité des populations neuronales hypothalamiques. Ces données mettent en évidence un effet neuroendocrinien des EZs notamment *via* l'ODN et une modulation directe de l'activité des neurones hypothalamiques.

L'ODN et son octapeptide C-terminal (OP) possèdent une activité anxiogène qui a été observée suite à une mobilisation et augmentation de taux de calcium [Ca²⁺]_i intracellulaire par un mécanisme de type autocrine ou paracrine. Cette augmentation a été détectée chez les astrocytes de rat en culture ainsi que dans divers types cellulaires comme les neutrophiles humains (**Gandolfo et al., 1997 ; Cosentino et al., 2000 ; Leprince et al., 2001**) *via* l'activation d'un récepteur couplé à la phospholipase C (PLC).

c. Effets cytoprotecteurs de l'ODN sur les cellules nerveuses

Le SNC est très sensible au stress oxydant observé dans de nombreuses pathologies notamment les maladies neurodégénératives, les accidents vasculaires et les traumatismes cérébraux à cause de la faible capacité antioxydante de cerveau devant la surproduction importantes des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Perfeito et al., 2013 ; Cobb & Cole, 2015**). Plusieurs études réalisées montrent que les astrocytes sont les cellules nerveuses les moins sensibles au stress oxydant par rapport aux neurones (**Lotharius et al., 2005 ; Infanger et al., 2006 ; Cobb & Cole, 2015**). Cette résistance astrocytaire résulte probablement par la présence des taux élevés de molécules anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (**Dringen & Hirrlinger, 2003 ; Guitart et al., 2016**). En outre, les astrocytes ont la capacité de synthétiser et de libérer des facteurs neurotrophiques et neuroprotecteurs tels que les neuropeptides (**Dejda et al., 2005 ; Ruiz et al., 2012**) notamment l'ODN. Des études *in vitro* de survie/mort cellulaire réalisées sur des astrocytes et des neurones en grain en culture ont indiqué que l'ODN, administré à des doses subnanomolaires (sur les astrocytes) et subpicomolaires (sur les neurones), est un neuroprotecteur puissant (**Hamdi et al., 2011 ; Hamdi et al., 2012 a ; Kaddour et al., 2013**). D'autres études ont montré que le surnageant des astrocytes en culture, traité par des facteurs

stimulateurs de la production de l'ODN, favorisent la survie neuronale (**Ghouili et al., 2018**). Par ailleurs, en agissant comme facteur paracrine, l'ODN augmente le taux de GSH dans les neurones en grain (**Kaddour et al., 2013**) renforçant ainsi la réponse des astrocytes face aux lésions cérébrales. Ceci suggère que l'ODN est capable de protéger les cellules astrogliales et les neurones granulaires de la mort apoptotique induite par H_2O_2 et la 6-OHDA (**Hamdi et al., 2012 a ; Kaddour et al., 2013**) en s'opposant à l'accumulation et à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires ainsi qu'à l'accumulation de produits de peroxydation lipidique et à l'oxydation des protéines (**Hamdi et al., 2015**). L'ODN bloque la surexpression de la protéine pro-apoptotique Bax qui interagit avec Bcl-2, réduisant de ce fait la chute du potentiel mitochondrial et l'activation de la caspase-3. Les effets anti-oxydants et anti-apoptotiques de l'ODN ne sont ni reproduits par les agonistes des récepteurs benzodiazépines centraux (CBR), ni abolis par le flumazénil, antagoniste des CBR prouvant ainsi que l'activité protectrice de l'ODN est dépendante des récepteurs aux benzodiazépines. Des approches pharmacologiques ont montré que les agonistes des récepteurs métabotropiques (RCPG), OP et cyclo-OP ont la capacité de reproduire l'effet protecteur de l'ODN. Les effets antioxydants et anti-apoptotiques de l'ODN sur les neurones et les astrocytes ne sont pas supprimés par le flumazénil, antagoniste des CBR, mais complètement bloqués par l'antagoniste du récepteur métabotrope, le cyclo₁₋₈[DLeu⁵] OP. De plus, deux agonistes du récepteur métabotrope de l'ODN, l'octapeptide (OP) et le cyclo OP, testés dans la même gamme de concentrations que l'ODN, reproduisent les actions protectrices de l'ODN sur les neurones et les astrocytes (**Hamdi Y et al., 2012a ; Kaddour H et al., 2013**).

Les études des voies de signalisation indiquent que l'effet glioprotecteur du neuropeptide ODN contre les dégâts oxydatifs induits par le H_2O_2 a lieu *via* l'activation du complexe de la voie de transduction AC / AMPc / PKA (**Hamdi et al., 2012 b**). L'activité protectrice de l'ODN sur les neurones en grain du cervelet s'oppose à la toxicité oxydative induite par 6-OHDA et fait intervenir la voie PLC / IP3 / PKC. Par ailleurs, l'ODN stimule la phosphorylation des protéines (ERK 1-2). L'activation de la voie de signalisation des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK / ERK) est responsable de la stimulation des activités antioxydantes, empêchant le dysfonctionnement mitochondrial et la stimulation des activités anti-apoptotiques par la voie intrinsèque (**Hamdi et al., 2012 a ; Kaddour et al., 2013 ; Hamdi et al., 2015**) (**Figure 13**).

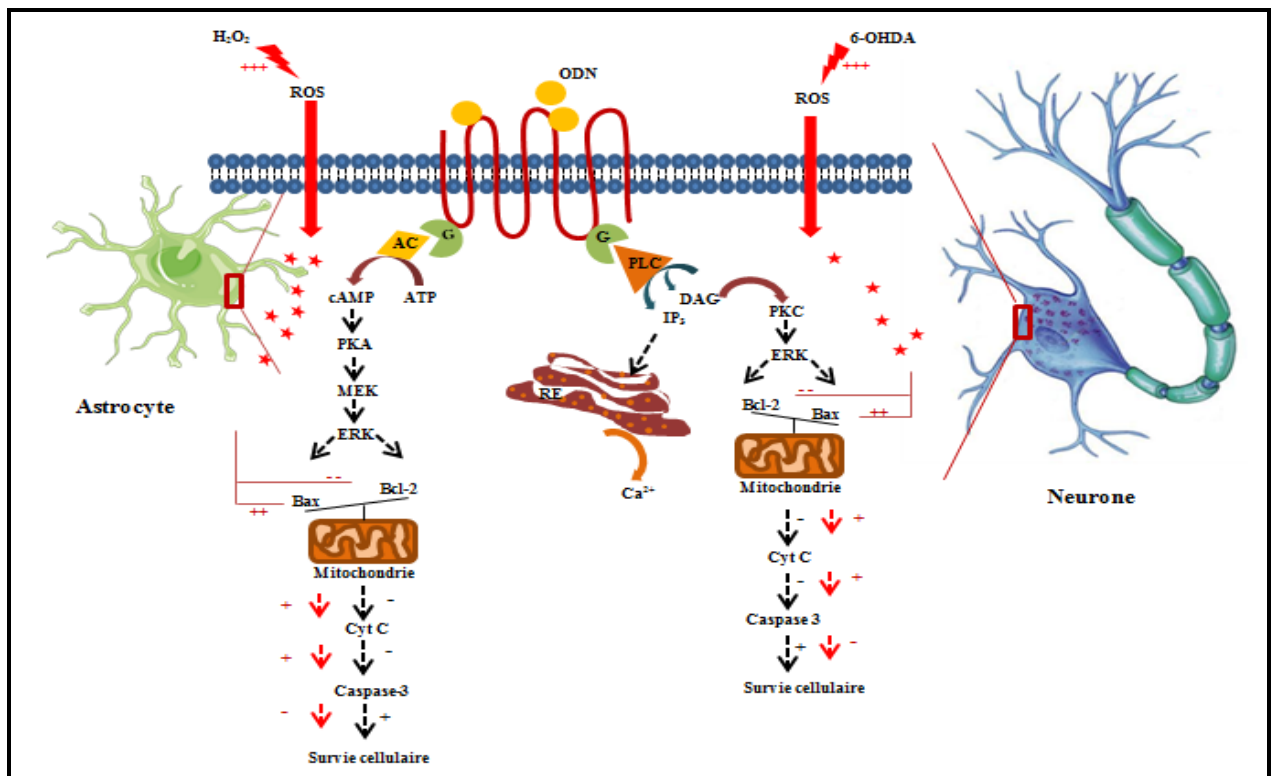


Figure 13: Schéma de l'effet protecteur de l'ODN sur les astrocytes et les neurones en grain et voies de signalisations mises en jeu. Ac, adénylate cyclase ; DAG, diacylglycérol ; ERK, extracellular signal-regulated kinase ; IP₃, inositol triphosphate ; MEK, mitogen-activated protein kinase ; PLC ; phospholipase C ; PKA, protein kinase A ; PKC, protéine kinase C ; RE, réticulum endoplasmique ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; +, activation ; -, inhibition.

2.3. Facteurs neurotrophiques exogènes : les polyphénols

Les facteurs neurotrophiques exogènes incluent des molécules naturelles nommées « polyphénols » qui sont d'origine alimentaire. Une bonne alimentation est indispensable à une bonne santé. De nombreuses études épidémiologiques ont démontré des relations entre nutrition et maladies neurodégénératives (Del Parigi *et al.*, 2006 ; Gelder, 2007 ; Canevelli *et al.*, 2016). Il a été décrit que le régime méditerranéen, très diversifié (Hoffman & Gerber, 2013), apporte l'essentiel des substances dont le corps a besoin pour se maintenir en bonne santé (Sousa *et al.*, 2015) et en réduisant de manière significative le taux de mortalité lié aux cancers (Simopoulos *et al.*, 2001 ; Norat *et al.*, 2005), aux maladies cardiovasculaires (Shubair *et al.*, 2005) et aux maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson et maladie d'Alzheimer) (Berr *et al.*, 2009 ; Sofi *et al.*, 2010).

Du fait de sa contribution à une meilleur santé, ce régime alimentaire méditerranéen dont les ingrédients sont majoritairement d'origine végétale (céréales, légumineuses, légumes et fruits riches en composés antioxydants et/ou anti-inflammatoires tels que les polyphénols (**Hartman et al., 2006**), vitamines ou flavonoïdes) pourrait jouer un rôle clé lors du vieillissement en prévenant les maladies neurodégénératives (**Joseph, 2005**).

2.3.1. Structures et classifications des polyphénols

2.3.1.1. Structures et biosynthèse des polyphénols

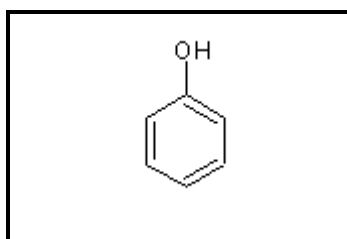


Figure 14: Structure chimique du phénol

Plusieurs études récentes ont été réalisées, et ont mis en évidence le rôle protecteur d'une alimentation riche en polyphénols. Chimiquement, ces molécules sont composées par des structures phénoliques (**Figure 14**) caractérisées par un ou plusieurs noyaux aromatiques (la phénylalanine et la tyrosine) qui peuvent être associés à un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH) (**Sun et al., 2012**). Les polyphénols sont des produits secondaires omniprésents, spécifiquement, dans le règne végétal avec des structures très diverses (**Tsao, 2010**) (**Tableau 3**). Les fruits, particulièrement les cerises, forment une source majeure de la gamme variée de composants polyphénoliques (**McDougall, 2017**). En effet, tous les organes du système végétal en comprennent, ce sont bien répartis allant des racines jusqu'aux fruits (racine, tronc, écorce, tige, feuille, fleur, fruit) (**Sun et al., 2012 ; Debbabi et al., 2016**). Parmi les polyphénols, il existe des molécules simples, telles que les acides phénoliques, et des structures complexes, formées de plusieurs hydroxyles phénoliques, hautement polymérisées comme les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins condensés (**Del Rio et al., 2013**). Dans la plupart des plantes, il a été démontré que les polyphénols sont liés à des sucres sous la forme de glycosides. En revanche, les glucides et les acides organiques peuvent être liés dans différentes positions sur le squelette des polyphénols. Par conséquent, leur absorption pourrait être augmentée et les aliments les plus riches en polyphénols pourraient être produits avec des compositions spécifiques aux rôles destinées à la cible (**Harborne, 1993 ; Tsao, 2010**).

Tableau 3: Quantité de polyphénols mesurés sur 24 variétés de fruits et 28 variétés de légumes selon le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) (CIRAD, 2007). GAE : gallic acid equivalent.

Fruits	Polyphénols totaux (mg GAE / 100 g)	Légumes	Polyphénols totaux (mg GAE / 100 g)
Fraise	263,8	Artichaut (cœur)	321,3
Litchi	222,3	Persil	280,2
Raisin	195,5	Choux de Bruxelles	257,1
Abricot	179,8	Echalote	104,1
Pomme	179,1	Brocoli	98,9
Datte	99,3	Céleri	84,7
Cerise	94,3	Oignon	76,1
Figue	92,5	Asperge	75,13
Poire	69,2	Aubergine	65,6
Nectarine blanche	72,7	Ail	59,4
Fruit de la passion	71,8	Navet	54,7
Mangue	68,1	Céleri rave	39,8
Pêche jaune	59,3	Radis	38,4
Banane	51,5	Pois	36,7
Ananas	47,2	Poireau	32,7
Citron	45	Poivron rouge	26,8
Nectarine jaune	44,2	Tomate cerise	26,4
Pamplemousse	43,5	Pomme de terre	23,1
Orange	31	Courgette	18,8
Clémentine	30,6	Poivron vert	18,2
Citron vert	30,6	Chicorée	14,7
Kiwi	28,1	Tomate	13,7
Pastèque	11,6	Fenouil	13
Melon	7,8	Chou-fleur	12,5
Résultats exprimés en équivalent d'acide gallique (GAE)		Carotte	10,1
		Haricot	10
		Avocat	3,6
		Salade	35,6

Chez les végétaux, la plupart des molécules phénoliques ont pour origine les acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, qui par désamination donne naissance au précurseur direct des phénols « l'acide cinnamique ». La biosynthèse des composés phénoliques implique plusieurs voies : la voie des esters cholinergiques avec une estérification par l'acide quinique ou l'alcool, la voie des coumarines par une cyclisation interne des molécules, la voie des lignines, la voie des flavonoïdes (**Remesy *et al.*, 1996**).

2.3.1.2. Classifications et localisations des polyphénols

Le terme polyphénol se rapporte à une grande variété de molécules qui peuvent être divisées en de nombreuses sous-classes selon leur origine, leur fonction biologique, ou leur structure chimique et deux voies métaboliques fondamentales: la voie du shikimate ou voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate (**Bravo, 1998 ; Manach *et al.*, 2004**). Actuellement, plus de 8000 structures phénoliques ont été identifiées, dont plus de 4000 appartenant à la classe des flavonoïdes dont plusieurs centaines sont produits par les plantes comestibles (**Remesy *et al.*, 1996**). Les polyphénols ont été classés en différentes catégories, selon le nombre et la structure des noyaux phénoliques ainsi que la nature des radicaux qui les lient les uns aux autres. Il existe deux principaux groupes de polyphénols: le groupe des flavonoïdes et le groupe des non-flavonoïdes (**Tableau 4**).

Tableau 4: Les deux groupes de polyphénols (Defraigne JO & Pincemail J, 2008)

Polyphénols	Familles	Principaux composés	Origines
Flavonoïdes	Flavonols	Quercétine	Câpre, piment chocolat, oignon
	Flavones	Apigénine	Persil, romarin, camomille
	Flavanones	Naringénine	Agrumes
	Flavone-3-ols	Catéchine	Thé vert
	Isoflavones	Génistéine	Soja
	Anthocyanidines	Cyanidine	Fruits rouges, raisin
	Tannins hydrosolubles ou non	Polyphénols de hauts poids moléculaire	Plantes supérieures
Non-Flavonoïdes	Acide hydroxy-benzoïques	Acide vanillique	Vanille
		Acide gallique	Feuilles de thé
	Acides hydro-cinnamiques	Acide caféique	Café
		Acide férulique	Riz, blé, asperges
		Acide cholinergique	Pelure de pomme de terre, de pomme, d'artichaut
	Stilbènes	Resvératrol	Raisin, vin
	Lignines	Lignane	Bois

Les flavonoïdes partagent une structure commune C6 – C3 – C6 du noyau. Celle-ci est formée de deux noyaux aromatiques, indiqués comme α et β reliés entre eux par trois atomes de carbones formant un hétérocycle oxygéné nommé le noyau γ (**Figure 15**). Les polyphénols peuvent être subdivisés en six sous-classes principales, en fonction du type d'hétérocycle impliqué: les flavan-3-ols, flavanes, les anthocyanidines (à l'origine des tanins condensés), les

flavones, les isoflavones et les flavanones. Les non-flavonoïdes tels que les acides phénoliques (composés dérivés de benzoïque et des acides hydroxycinnamiques) comme les stilbènes et les lignans (Del Rio *et al.*, 2013 ; Santhakumar *et al.*, 2018) (Tableau 4).

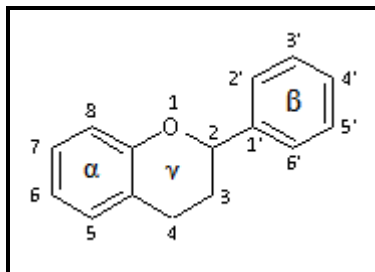


Figure 15: Structure de base des flavonoïdes

- Les flavonoïdes (Flavones) : Apigénine

L'apigénine (Figure 16) appartient à la grande famille des flavones, une sous-classe des flavonoïdes connus pour leurs bénéfices pour la santé. En effet, cette molécule présente des activités anticancéreuses *in vivo* (Birt *et al.*, 1997) ainsi que des effets antiallergiques, antimicrobiens, antiviraux et anti-inflammatoires qui sont principalement présent dans le persil (Justesen *et al.*, 1998) qui est également beaucoup consommé dans le régime méditerranéen, principalement au Moyen-Orient où il est utilisé dans la médecine traditionnelle (Farzaei *et al.*, 2013).

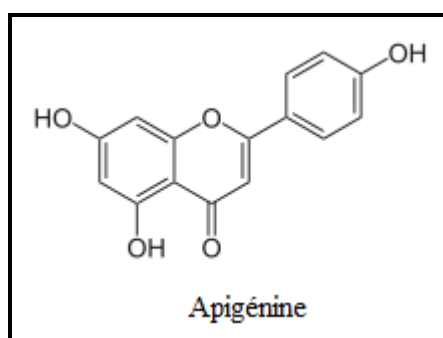


Figure 16: Structure chimique d'un exemple de flavonoïdes comme l'Apigénine

Ce flavone se trouve aussi dans le thym, le romarin, le céleri et la camomille. Il est également présent dans le miel (Khalil *et al.*, 2010) et dans l'huile d'olive (Ricciutelli *et al.*, 2017). L'apigénine est particulièrement reconnue pour ses effets antioxydants et antimutagènes *in vitro* (Kuo *et al.*, 1992 ; van Acker *et al.*, 1996) en agissant favorablement sur les enzymes impliquées dans la mort cellulaire, ainsi que dans les phénomènes de réplication de l'ADN. De

plus, cette molécule est capable de moduler la transmission GABAergique et glutamatergique dans les neurones corticaux en culture (**Losi et al., 2004**). Des études réalisées sur l'Homme ont montré que le mode d'absorption de l'apigénine, contenue entre autre dans le persil, diffère d'un individu à un autre (**Nielsen et al., 1999**).

- **Les non-flavonoïdes (Stilbènes) : Resvératrol/ trans-Resvératrol**

Le resvératrol, dont le nom chimique est 3,4',5-trihydroxystilbène faisant partie de la famille de la classe des stilbènoïdes, est un polyphénol naturel (ou phytophénol) présent dans de nombreuses familles de plantes supérieures (**Figure 17**).

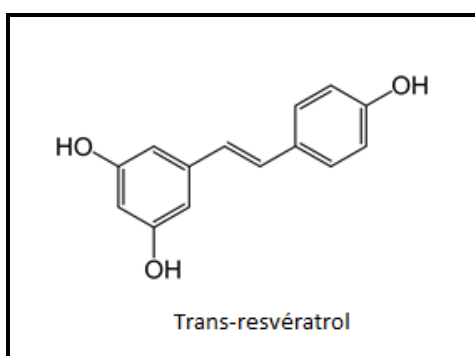


Figure 17: Structure chimique d'un exemple de stilbènes (non-flavonoïdes) comme le resvératrol

Le resvératrol est présent dans les vins rouges (**Langcake & Pryce, 1977**) et les jus de raisins broyés avec la peau, il s'accumule aussi dans les fruits tels que les myrtilles, les graines d'arachides et dans la rhubarbe. Cette molécule a des propriétés antioxydantes contre l'oxydation des LDLs (**Wu & Hsieh, 2011**), anti-inflammatoires (**Liu et al., 2015**) et anti-tumorales jouant un rôle de médiateur des défenses de la plante (phytoalexine) en induisant une cascade de réactions biochimiques. Le resvératrol exerce aussi des propriétés antibiotiques (fongicides) afin de répondre aux attaques de bactéries ou de champignons (**Latruffe & Rifler, 2013**). Dans les plantes, le resvératrol active la production de radicaux libres dirigés vers les agents infectieux et il fournit aux plantes leurs propriétés antioxydantes. Chez l'Homme, le resvératrol prévient des processus pathologiques tels que les infections, l'inflammation, la prolifération des cellules cancéreuses, la neurodégénérescence et les troubles circulatoires associés au vieillissement.

Pharmacologiquement, le passage du resvératrol à travers la membrane plasmique est basé sur un phénomène de diffusion passive (**Lançon et al., 2004**). L'absorption de cette molécule, chez l'Homme, passe par une cascade de réactions. En effet, la forme végétale de

resvératrol glycosylée (picéide) se transforme en une forme animale (aglycone), après une déglycolysation du resvératrol et des formes conjuguées synthétisées par la flore intestinale et par le tractus digestif. La forme aglycone se transforme dans le foie sous l'effet de molécules solubles dans l'eau (sulfate, glucuronate...) afin de faciliter son élimination (**Figure 18**).

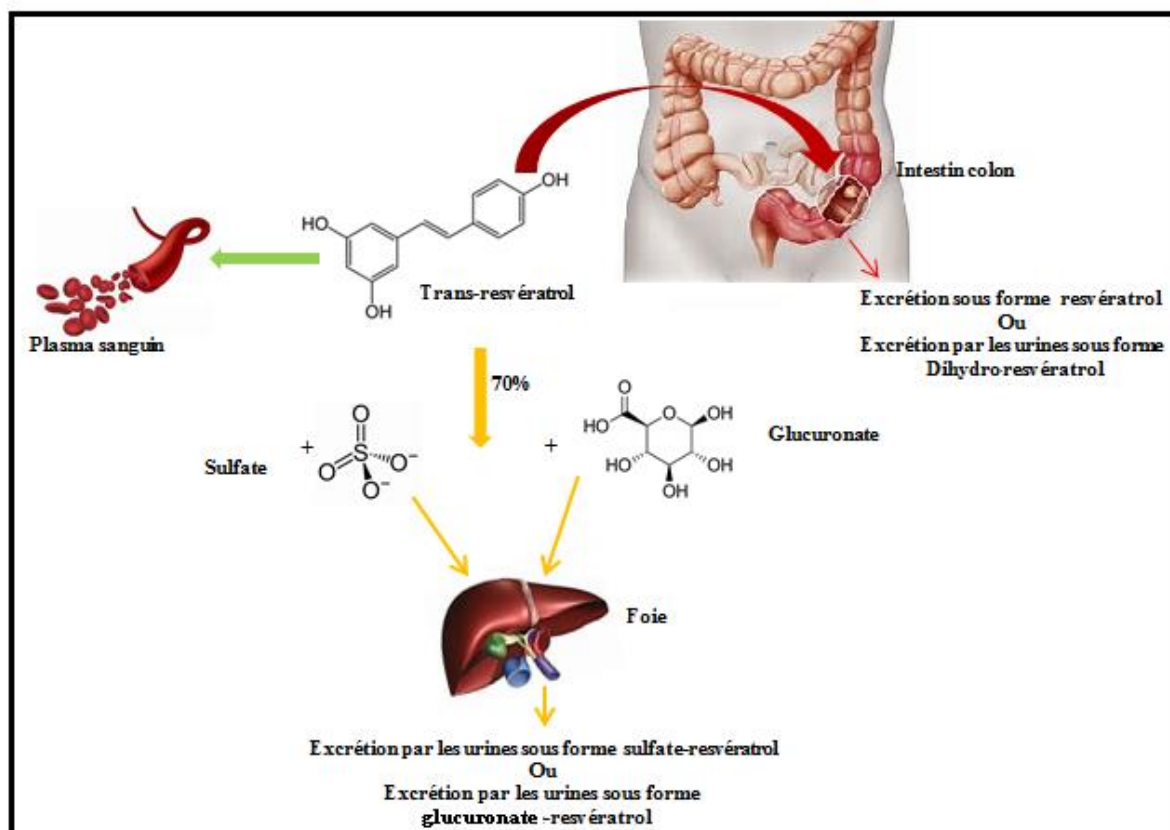


Figure 18 : Absorption, métabolisme et excrétion du Resvératrol

2.3.2. Propriétés neurotrophiques et neurodifférenciatrices

Des études expérimentales récentes ont montré que la dégradation des fonctions cognitives et la chute quantitative des neurones au cours de vieillissement cérébral sont liées à plusieurs facteurs et mécanismes physiopathologiques, tels que la neuroinflammation, l'excitotoxicité glutamatergique et le déséquilibre des défenses antioxydantes endogènes (**Jellinger & Stadelmann, 2001 ; Spires & Hyman, 2005**). Des études épidémiologiques et cliniques suggèrent qu'une alimentation riche en composés phytochimiques et bioactifs, particulièrement, les polyphénols, peut ralentir la progression des maladies liés à l'âge et améliorer les fonctions cognitives (**Letenneur et al., 2007 ; Beking & Vieira, 2011**). Plusieurs études expérimentales réalisées chez l'Homme et chez l'animal montrent que les aliments

riches en polyphénols comme le thé (**Chan et al., 2006 ; Kaur et al., 2008 ; Li et al., 2009**), le cacao (**Scholey et al., 2010 ; Field et al., 2011**) et la myrtille (**Casadesus et al., 2004 ; Williams et al., 2008**) ont des effets bénéfiques sur l'apprentissage, la mémoire épisodique (**Kesse-Guyot et al., 2012**) et les performances cognitives chez l'adulte (**Letenneur et al., 2007**) en protégeant les cellules neuronales contre les dommages induits par des neurotoxines. En effet, les myrtilles et les fraises qui sont respectivement riches en anthocyanes et en flavanols ont la capacité de ralentir les déficits liés à l'âge en modulant les fonctions motrices, la mémoire spatiale (**Joseph et al., 1999 ; Casadesus et al., 2004 ; Williams et al., 2008**), la mémoire à court terme (**Ramirez et al., 2005**) ainsi que la mémoire à long terme (**Casadesus et al., 2004**). De plus, l'action de la myrtille a été corrélée avec l'activation d'un facteur de transcription CREB jugé indispensable (**Bourtchuladze et al., 1994 ; Impey et al., 1998**) dans l'induction des modifications durables dans la plasticité synaptique et dans l'hippocampe (**Ramirez et al., 2005**). Par conséquent, les polyphénols peuvent agir d'une manière indirecte sur l'hippocampe, particulièrement, le gyrus denté, la région la plus sensible aux effets de vieillissement (**Burke et al., 2006 ; Rendeiro et al., 2013**).

Les taux de polyphénols ne dépendent pas que de l'alimentation mais aussi de leur capacité à s'accumuler dans le cerveau. Des études ont démontré que ces molécules ne sont pas dégradées dans le tractus intestinal et sont capables de traverser la barrière hématoencéphalique (BHE) (**Youdim et al., 2003 ; Figueira et al., 2017**). Il a été observé que les formes méthoxylées de la quercétine de la famille des flavonols, une sous classe des flavonoïdes, s'accumulent aussi bien dans les neurones que dans les astrocytes en sachant que leur accumulation dans des culture primaires de neurones corticaux de souris (**Spencer et al., 2001**) est plus faible que celle observée sur des cultures primaires d'astrocytes (**Spencer et al., 2004**). Par conséquent, les astrocytes accumulent et métabolisent des quantités importantes de polyphénols ce qui leur permet d'agir comme filtre pour protéger les neurones de l'exposition excessive aux polyphénols. Les polyphénols améliorent aussi la survie neuronale et favorisent la différenciation neuronale en stimulant l'excroissance des neurites (**Moosavi et al., 2015**). Il a été démontré sur une étude réalisée sur des cellules embryonnaires de souris ainsi que sur des cellules souches pluripotentes humaines, que les flavonoïdes sont capables d'induire la différenciation neuronale (**Costa et al., 2016**).

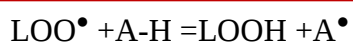
De plus, pour maintenir l'homéostasie cérébrale, il a été démontré que les polyphénols ont la capacité de moduler l'expression des gènes codant pour les facteurs neurotrophiques et des protéines cytoprotectrices. Une diminution de l'activité Nox4 (NADPH oxydase 4) a été observée sur les cellules souches humaines avec la plumbagine, un pigment jaune identifié chez

les plantes ; ce pigment réduit la production des ROS nucléaires permettant la protection contre les dommages d'ADN (**Guida et al., 2013 ; Maraldi et al., 2014**).

2.3.3. Propriétés antioxydantes

Une des propriétés fondamentales connues des polyphénols est leur pouvoir antioxydant, qui permet à l'organisme de lutter contre les espèces radicalaires à l'origine d'un grand nombre de maladies cardio-vasculaires (attaque cérébrale, infarctus) ou d'autres maladies liées au vieillissement telles que les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson). Ces espèces chimiquement agressives peuvent être soit de nature oxygénée tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), soit de nature azotée tel que le (NO) présentant un électron non apparié très réactif. Il existe d'autres agents oxydants comme les enzymes (lipoxygénase, peroxydase), les ions métalliques (fer, cuivre) et les peroxydes des lipides qui contribuent à la formation de chaînes de radicaux libres. Ces principaux agents oxydants attaquent les protéines, les acides nucléiques, les acides gras insaturés ainsi que les vitamines (**Figure 19**).

Les polyphénols contribuent à combattre les radicaux libres en interrompant la chaîne de propagation des réactions radicalaires par ; chélation des ions métalliques (**Mandel et al., 2008**), désactivation des espèces réactives de l'oxygène (**Chkhikvishvili et al., 2016**), réduction de la pression partielle de l'oxygène et inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation (**Bocco, 1997**). Leur pouvoir antioxydant puissant est dû à leur structure composée de plusieurs groupements phénols comportant des fonctions hydroxyles aromatiques conjuguées associées à une double liaison avec un cycle benzénique. Cette structure leur permet de réduire les dommages du stress oxydant en neutralisant les radicaux libres (**Visioli et al., 1998; Halliwell, 2006**). Cette structure particulière offre à la fonction phénol un caractère plus acide que l'alcool permettant la libération de proton H^+ afin de former l'ion phénoxy. L'association proton-électron conduit à la formation d'un radical fortement stabilisé, c'est grâce à cette propriété chimique que les polyphénols ont un caractère antioxydant. En effet, la perte d'un hydrogène au profit des lipides $LOO^{\cdot}$ crée une forme plus stable d'hydroperoxydes $LOOH$ permettant l'inhibition des réactions de propagation de l'oxydation. Ce mécanisme définit les espèces antiradicalaires.



Les formes $A^\bullet$ issus de A-H (polyphénols) sont capables de ralentir la réaction de propagation en formant un produit d'addition chimiquement stable avec les radicaux lipidiques formés (**Maraldi et al., 2014**).

D'autres études suggèrent que le caractère antioxydant des polyphénols pourrait ne pas être la seule origine de leur bioactivité *in vivo*. En effet, ces molécules ont la capacité de stimuler plusieurs réactions d'adaptation au stress cellulaire, nommées hormesis (**Schroeter et al., 2001 ; Schroeter et al. 2007 ; Vauzour et al., 2007**). L'activation des voies hormétiques dans les neurones conduit à la production de différents types de protéines, tels que les facteurs neurotrophiques cytoprotecteurs, des protéines chaperonnes, des antioxydants et des protéines anti-apoptotiques (**Mattson & Cheng, 2006 ; Calabrese, 2008**). Dans le SNC, ces voies impliquent un facteur de transcription appelé Nrf2 qui se lie, avec une forte affinité, à l'élément de réponse antioxydant (ARE) jouant un rôle important dans la régulation des gènes de modulation de l'état redox cellulaire ainsi que dans la protection cellulaire contre un stress oxydant (**Kraft et al., 2004 ; Lee & Johnson, 2004 ; Zhang & Gordon, 2004**).

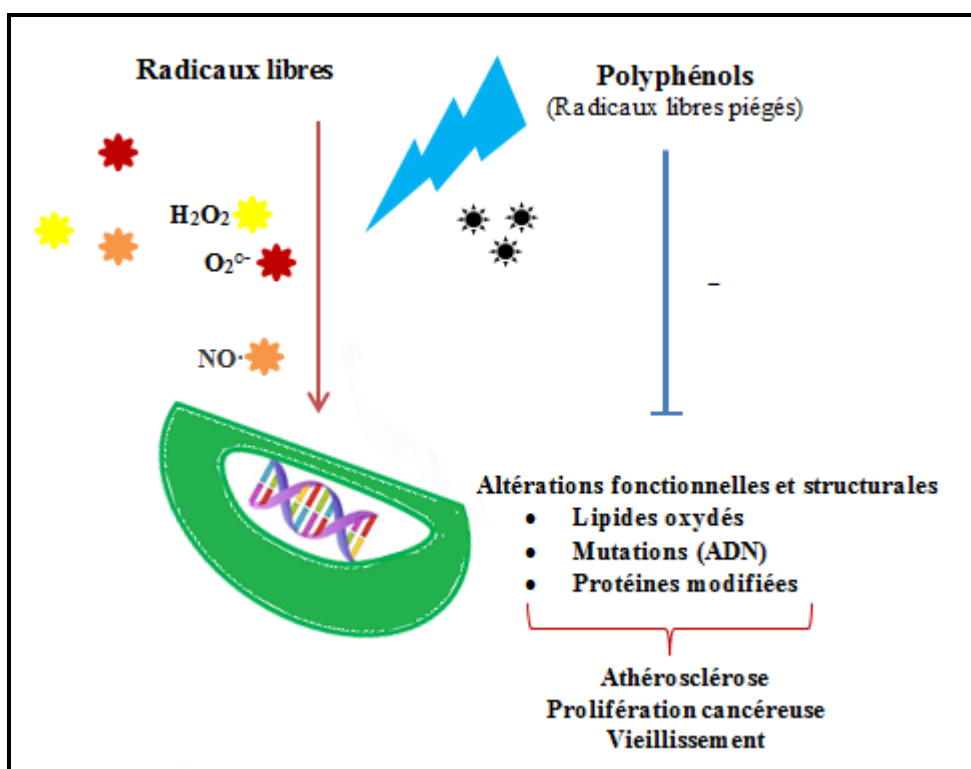


Figure 19: Neutralisation des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par les polyphénols

Ces propriétés antioxydantes se trouvent dans les flavonoïdes, essentiellement dans les flavanols présents dans les boissons tels que le thé et le vin (avec ou sans alcool) ; dans le sang ces flavonoïdes augmentent le pouvoir antioxydant du plasma (**Remesy et al., 1996**). Les flavonoïdes réagissent comme piègeurs des radicaux hydroxyles et peroxydes impliqués dans la peroxydation lipidique ; c'est le cas de la catéchine, qui piège l'oxygène singulet et du resvératrol qui est capable de protéger les cellules neuronales contre le stress oxydant (**Chen et al., 2005**). La prise en charge des espèces radicalaires s'avère primordiale dans les processus d'oxydation des *Low Density Lipoproteins* (LDLs) (**Wu & Hsieh, 2011**).

2.3.4. Propriétés anti-inflammatoires

L'inflammation est fréquemment considérée comme une des conséquences de l'oxydation. Au plan nutritionnel, il a été bien démontré que les propriétés fondamentales des polyphénols, y compris le pouvoir anti-inflammatoire, présente un bénéfice médical permettant de prévenir et de traiter les pathologies qui sont souvent liées à l'âge tel que les maladies neurodégénératives (**Shay et al., 2015 ; Upadhyay & Dixit, 2015**) (**Figure 20**). De plus, il a été largement reconnu que le processus d'inflammation stimule la mobilisation des cellules immunitaires, particulièrement les lymphocytes activés, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, et s'accompagne par la production d'une grande variété de médiateurs chimiques tels que les amines vasoactives (sérotonine et histamine), les prostaglandines, les leucotriènes les cytokines (interleukines). Dans le SNC, la neuroinflammation joue un rôle important dans le maintien des activités cérébrales. L'exposition chronique à certaines réactions inflammatoires peut déclencher, à travers l'augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'autres biomarqueurs, une cascade de réactions contribuant aux dommages neuronaux (**Pratico & Trojanowski, 2000 ; Agostinho et al., 2010**) en potentialisant la production de protéines β -amyloïdes (**Engelhart et al., 2004 ; Trollor et al., 2010**). Il a été démontré que la consommation prolongée de médicaments anti-inflammatoires de nature non stéroïdiennes, est capable de prévenir la maladie d'Alzheimer (**Szekely et al., 2004 ; Kravitz et al., 2009**) d'où l'intérêt de développer de nouveaux traitements s'opposant à la neuroinflammation. L'immunomodulation exercée par différentes molécules tels que les polyphénols représente une stratégie préventive voire thérapeutique contre des affections liées à l'inflammation (**Latruffe, 2017**). Des travaux ont montré des propriétés analgésiques du resvératrol (**Pham-Marcou et al., 2008**) ainsi que des propriétés anti-inflammatoires (**Csaki et al., 2009**) (**Figure 20**). Cette molécule est capable de réduire le taux de sécrétion des interleukines pro-inflammatoires et de *tumor necrosis factor* (TNF); ceci conduit à l'inhibition

de l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), composant clé dans le recrutement des monocytes au cours des stades précoces de l'athérosclérose (**Lotito et al., 2011**). Le resvératrol inhibe, également, les facteurs de transcription (AP-1, NFκB) ainsi que l'induction du gène de la cyclooxygénase 2 (COX-2) pro-inflammatoire. Des études ont aussi montré que ce polyphénol stilbénique module l'expression de micro-ARN, qui sont connus pour leur implication dans le processus inflammatoire (**Tili et al., 2008 ; 2010**). Cette modification peut être soit de nature anti-inflammatoire (miR-663), soit de nature proinflammatoire (miR-155) (**Latruffe et al., 2015**). Les polyphénols appartenant à la famille des flavonoides, comme la quercétine, inhibent la neuro-inflammation en atténuant la synthèse d'oxyde nitrique et l'expression du gène iNOS réduisant les cytokines inflammatoires (**Chen et al., 2005 ; Kao et al., 2010**). Les métabolites de flavonols présentent une variété d'actions anti-inflammatoires.

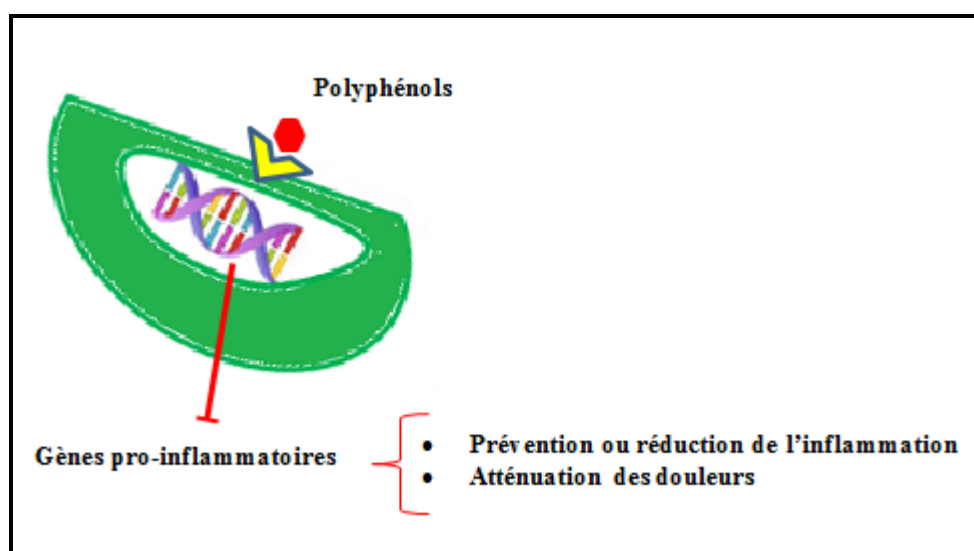


Figure 20: Représentation schématique de l'effet anti-inflammatoire des polyphénols

2.3.5. Effets sur la mort cellulaire

Des études supplémentaires ont été réalisées pour prouver les effets neuroprotecteurs des polyphénols, dans le développement des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer. La consommation des aliments riches en polyphénols est susceptible de limiter les troubles neurodégénératifs. Ces pathologies se caractérisent par une perte progressive des neurones dans certaines régions du cerveau ce qui se produit par des mécanismes apoptotiques, de nécrose (**Tsang & Chung, 2009**), ou

d'excitotoxicité (**Meredith et al., 2009**). Les propriétés pharmacologiques des polyphénols nécessitent encore d'être précisées chez l'Homme dans des conditions cliniques. Plusieurs études ont montré que les polyphénols réduisent la formation de plaques amyloïdes en inhibant l'agrégation des protéines β -amyloïdes et la formation de fibrilles (**Mandel et al., 2007 ; Amit et al., 2008 ; Mandel et al., 2008**) ou en stimulant la formation d'oligomères amyloïdes non toxiques (**Ehrnhoefer et al., 2008**). D'autres processus sont mis en jeu par l'inhibition de l'apoptose neuronale induite par les neurotoxines ou par l'agrégation des précurseurs des protéines amyloïdes, à travers la réduction de l'activité enzymatique des sécrétases (BACE-1) (**Mori et al., 2012**) ou avec la stimulation de l'activité de ces enzymes tel que ADAM10 (**Williams & Spencer, 2012**). Le resvératrol peut aussi inhiber les signaux NF κ B associés au stress oxydant induit par les protéines β -amyloïde dans la microglie et les astrocytes (**Pasinetti et al., 2015**). En plus de son effet protecteur observé dans les troubles neurodégénératifs, le resvératrol exerce une activité anti-tumorale chez la souris (**Jang et al., 1997**). Le resvératrol déclenche l'apoptose par blocage du cycle cellulaire en phase S (**Delmas et al., 2006**). L'apigénine active aussi la mort des cellules leucémiques (**Ruela-de-Sousa et al., 2010**).

Il a été démontré que les effets neuroprotecteurs des polyphénols tel que le resvératrol sont doses et temps-dépendant. Le resvératrol est considéré bénéfique à la santé, non seulement pour ses propriétés antioxydantes, mais aussi pour ses activités anti-inflammatoire et anti-tumorale. Avec différents polyphénols, des études ont été effectuées afin d'évaluer différentes voies d'administration et/ou différents conditionnements, telles que la nano-encapsulation afin d'améliorer leur concentration intracellulaire et augmenter leurs activités biologiques (**Gomes et al., 2018**).

Objectifs

❖ Objectifs et modèles d'études

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par un processus induisant la perte progressive d'une population particulière des cellules neuronales telles que les neurones cholinergiques (responsables de la maladie d'Alzheimer), les neurones dopaminergiques ainsi que les motoneurones (impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson). La neurodégénérescence peut être déclenchée par plusieurs agents toxiques et facteurs environnementaux entraînant un stress oxydant responsable de la surproduction des radicaux libres induisant des dommages cellulaires irréversibles tels que l'oxydation des biomolécules, des dysfonctionnements des mitochondries avec des altérations fonctionnelles de la chaîne respiratoire et un dysfonctionnement des peroxysomes pouvant entraîner l'accumulation d'acides gras à longue et très longue chaîne contribuant à la neurotoxicité.

Les thérapies actuelles des maladies neurodégénératives n'empêchent pas la progression de la maladie et l'efficacité de ces traitements diminue au cours du temps, ce qui conduit inexorablement à la mort du patient d'où la nécessité de développer des thérapies basées sur la neuroprotection et la neuro-restauration.

Une approche pour la neuroprotection serait d'identifier des facteurs neurotrophiques et/ou neuroprotecteurs capables de stopper ou limiter des processus menant à la mort cellulaire tels que le stress oxydant et l'apoptose.

En raison de leur capacité à agir directement sur les mécanismes d'apoptose des neurones dopaminergiques, les facteurs neurotrophiques sont des candidats sérieux pour le développement de stratégies de neuroprotection.

Par conséquent, il est important d'identifier des molécules endogènes et exogènes à pouvoir neurotrophique permettant la protection, la prolifération, la survie, la différenciation et la maturation des neurones. L'ODN a été choisi comme molécule endogène alors que deux polyphénols (resvératrol, apigénine) ont été sélectionnés comme molécules exogènes.

L'ODN est un peptide qui présente un potentiel protecteur puissant contre les dommages causés par le stress oxydant tant sur les neurones que sur les astrocytes en culture. Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ont établi la capacité de l'ODN à prévenir la surproduction des espèces réactives de l'oxygène, les dommages oxydants des constituants cellulaires, le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose induits par le stress oxydant (**Kaddour *et al.*, 2013 ; Hamdi *et al.*, 2015**). A ce jour, aucune étude n'a été réalisée afin de mettre en évidence les effets neurotrophiques de l'ODN notamment sur l'induction de la différenciation neuronale et la croissance neuritique.

Mon travail a aussi consisté à étudier les effets neurotrophiques de deux polyphénols (resvératrol, apigénine) présents en quantité abondantes dans le régime méditerranéen. Pour ces différentes molécules, leurs propriétés antioxydantes ont été bien démontrées tant *in vitro* que *in vivo*. Leurs propriétés différenciatrices sont peu étudiées et leurs capacités neurotrophiques sont peu connues.

Les objectifs du travail de recherches ont consisté à:

- Etudier l'effet cytoprotecteur de l'ODN contre un stress oxydant induit par H₂O₂ sur des cellules de neuroblastome murin N2a, des cellules de neuroblastome humain (SK-N-BE), des cellules microgliales murines (BV-2), des cellules de gliome murin (C6) et des astrocytomes humain (CCF-STTG1). La nature du récepteur associé à l'effet cytoprotecteur de l'ODN ainsi que les voies de signalisations associées aux effets de l'ODN a été étudiée.
- Evaluer et caractériser l'effet différenciateur du neuropeptide « ODN », du resvératrol et de l'apigénine sur les cellules neuronales N2a. Les voies de signalisation mises en jeu dans les effets différenciateurs ont été étudiées.
- Déterminer l'effet de l'ODN ainsi que du resvératrol et de l'apigénine sur la biogénèse des neurites (axones et dendrites), sur les modifications topographiques des mitochondries et des peroxysomes, sur la répartition de ces organites dans les neurites et sur le métabolisme lipidique (cholestérol, acides gras).

Méthodologie

Matériels et méthodes

Les expérimentations de ce travail de Thèse sont réalisées sur des cultures de cellules neuronales de différentes origines (souris, rat, homme) établies lignées.

1. Lignées cellulaires et culture de cellules

- **Cellules microgliales murines BV-2** : La lignée cellulaire murine BV-2 est issue de cerveaux de souris C57/BL6. Ce sont des cellules microgliales murines (Banca-Biologica Cell Factory (ICST, Italy), semi-adhérentes. Ces cellules microgliales ont été choisies en raison de leur contribution à la neurodégénérescence.
- **Cellules de gliome de rat C6**: Cette lignée de cellules gliales C6 (ATCC[®] CCL-107TM) a été isolée à partir d'une tumeur gliale de rat induite par le N-nitrosométhylurée.
- **Cellules de neuroblastome humain SK-N-BE** : Ce sont des cellules de neuroblastome immortalisées. Ces cellules sont souvent utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires associés à la maladie d'Alzheimer ; elles permettent d'aborder l'amyloïdogénèse et la tauopathie.
- **Cellules d'astrocytome humain CCF-STTG1** : Cette lignée (ATCC[®] CRL-1718TM) a été établie à partir d'un astrocytome de grade IV provenant d'une femme caucasienne de 68 ans.
- **Cellules de neuroblastomes murines N2a** : La lignée de neuroblastomes de souris neuro-2a (N2a) (ATCC[®] CCL-131TM) correspond au modèle expérimental le plus utilisé dans ce travail de Thèse

Toutes ces cellules sont cultivées dans un milieu de culture composé d'un mélange de *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) contenant des taux élevés de glucose (4,5 g/L) supplémenté avec de la glutamine stable et du pyruvate de sodium (Dominique DUTSCHER, Brumath, France) additionné de 10 % (v/v) de sérum bovin fœtal (FBS, Pan Biotech, Aidenbach) contenant 1 % (v/v) d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 mg/mL de streptomycine) (Pan Biotech). Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri à une densité de 34 000 cellules/cm² et placées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide et à 5% de CO₂. Les cellules sont entretenues 2 fois par semaine. Le détachement des

cellules lors des passages est réalisé par l'action conjuguée de trypsine (0,5 mg/mL) / EDTA (0,2 mg/mL) (Pan Biotech). A confluence cellulaire, le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est rincé avec du PBS (*Phosphate Buffered Saline*) afin d'éliminer toute trace d'inhibiteurs de trypsine présente dans le sérum. Après avoir ajouté la trypsine, 3 mL par boîte de Pétri (100 x 20 mm, BD Biosciences), les boîtes sont placées à 37°C pendant 2-3 min ; ensuite les cellules sont dispersées dans du milieu de culture complet, puis récupérées par centrifugation (300 g ; 5 min). Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont alors resuspendues dans 4 mL de milieu complet, puis comptées sur une cellule de Malassez. Une partie de la suspension cellulaire sera réensemencée dans de nouvelles boîtes de Petri à raison de 34 000 cellules/cm².

2. Caractérisation et quantification des cellules différenciées selon des critères morphologiques

Afin d'évaluer la différenciation neuronale (**Gonzalez *et al.*, 1997**) des critères morphologiques ont été utilisés. Les cellules ont été observées par microscopie en contraste de phase sous un microscope Zeiss inversé (Primovert, Jena, Allemagne) à un grossissement de x 20 (objectif: LD plan-achromat, Ref: 415500-1614-000). Les images numérisées ont été obtenues avec un appareil photo Zeiss (5MP HD IP). La différenciation neuronale a été déterminée sur 20 images correspondant à 20 champs microscopiques (5 × 4) pris au centre du puits de culture. La différenciation des cellules N2a a été quantifiée par l'excroissance des neurites (dendrites et/ou axones). Les pourcentages de cellules non différenciées et différenciées avec des neurites ont été déterminés.

3. Visualisation des neurites par coloration à la Sulforhodamine 101

La Sulforhodamine 101 (SR101) est un colorant fluorescent rouge utilisé en neurophysiologie qui permet de visualiser les neurites (**Nimmerjahn *et al.*, 2004**).

Les cellules N2a ont été cultivées sur des lames en verre traitées par la polyL-lysine pour assurer l'adhésion cellulaire puis placées dans des plaques 6 puits. À la fin du traitement, les cellules ont été fixées avec de l'éthanol 70% (15 min, 4°C). Après 3 lavages en PBS 1X, les cellules ont été incubées avec la SR101 à une concentration de 0,5 µg/mL (**Schnell *et al.*, 2012**) pendant 30 min à 4°C. Ensuite, les noyaux ont été contre-colorés avec du Hoechst 33342 (1 µg/mL) qui est un fluorochrome intercalant de l'ADN (bases A-T). Les cellules ont ensuite été montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage (DakoCytomation, DAKO,

Copenhague, Danemark), et stockées dans l'obscurité à 4°C jusqu'à l'observation avec un microscope à fluorescence couplé à un système ApoTome (Imager m2, Zeiss, Jena, Allemagne). La fluorescence a été analysée avec le logiciel ZEN (Zeiss).

4. Observation simultanée des mitochondries et des peroxysomes par microscopie à fluorescence

In situ, les mitochondries ont été révélées par coloration avec le MitoTracker Red (Thermo Fischer Scientific) et les peroxysomes ont été détectés par immunofluorescence indirecte avec un anticorps dirigé contre le transporteur peroxysomal (ABCD3) majoritairement présent au niveau de la membrane peroxysomale. Les cellules N2a ont été cultivées sur des lamelles en verre traitées par la poly-L-Lysine et placées dans des plaques 6 puits. À la fin du traitement, les cellules ont été lavées une fois avec du DMEM, puis incubées en atmosphère humide 5 % de CO₂ avec du milieu de culture 37°C sans SVF contenant le MitoTracker Red (100 nM; 30 min; 37°C). Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS filtré (0,2 µm) et fixées avec du paraformaldéhyde filtré (PFA: 4 %; 15 min, température ambiante). Après lavage en PBS, les cellules adhérentes ont été perméabilisées en (PBS 0,05 % saponine 10 % FBS) appelé tampon PFS (30 min, RT), et incubées avec l'anticorps polyclonal de lapin ABCD3 (# 11523651, Pierce/Thermo Fisher Scientific) dilué (1/500) dans le tampon PFS (1 h, température ambiante). Les cellules ont ensuite été lavées en PBS et incubées avec un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa-488 dilué au 1/500 dans le tampon PFS (30 min dans l'obscurité, température ambiante). Après un lavage avec du PBS filtré, les cellules ont été contre-colorées avec du Hoechst 33342 (1 µg/mL). Les cellules ont ensuite été montées avec un milieu de montage (DakoCytomation), et stockées à l'obscurité à 4°C jusqu'à observation sous un microscope fluorescent couplé à un système ApoTome (Zeiss). La fluorescence a été analysée avec le logiciel ZEN (Zeiss).

5. Etude de l'ultrastructure cellulaire par microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission (MET) utilise un faisceau d'électrons concentré par des lentilles électrostatiques et électromagnétiques. Ce faisceau est transmis sur une cible fine comportant des informations sur l'ultrastructure de l'échantillon qui sera amplifié par la suite par le système de lentilles de l'objectif du microscope. L'interaction entre les électrons, la cible et le système de lentilles donne naissance à une image dont la résolution est de l'ordre du nanomètre (**Figure 21**). Dans notre travail, la microscopie à transmission

électronique a été utilisée pour visualiser les mitochondries et les peroxysomes durant la différenciation. Les échantillons ont été fixés pendant 1 h à 4°C avec le glutaraldehyde 2.5 % dilué en tampon cacodylate (0.1 M pH 7.4), rincés deux fois dans le tampon cacodylate, puis post-fixés au tétroxyde d'osmium 1 %, dilué dans le sodium cacodylate (0.1 M, pH 7.4) pendant 1 h à température ambiante dans l'obscurité et lavés deux fois dans le tampon cacodylate. Les préparations ont ensuite été déshydratées par des bains d'éthanol croissants (50, 70, 90 et 100 %) puis incluses en résine époxy à base de bisphénol contenant une qualité commerciale d'éther de n-butyle glycidyle (EPON). Des sections ultrafines ont été réalisées avec un ultramicrotome diamant. Les coupes ont été colorées pendant plusieurs minutes avec une solution aqueuse alcoolisée d'acétate d'uranyle pour contraster différenciellement les différentes structures puis avec du citrate de plomb et enfin examinées au microscope électronique H7500 (Hitachi).

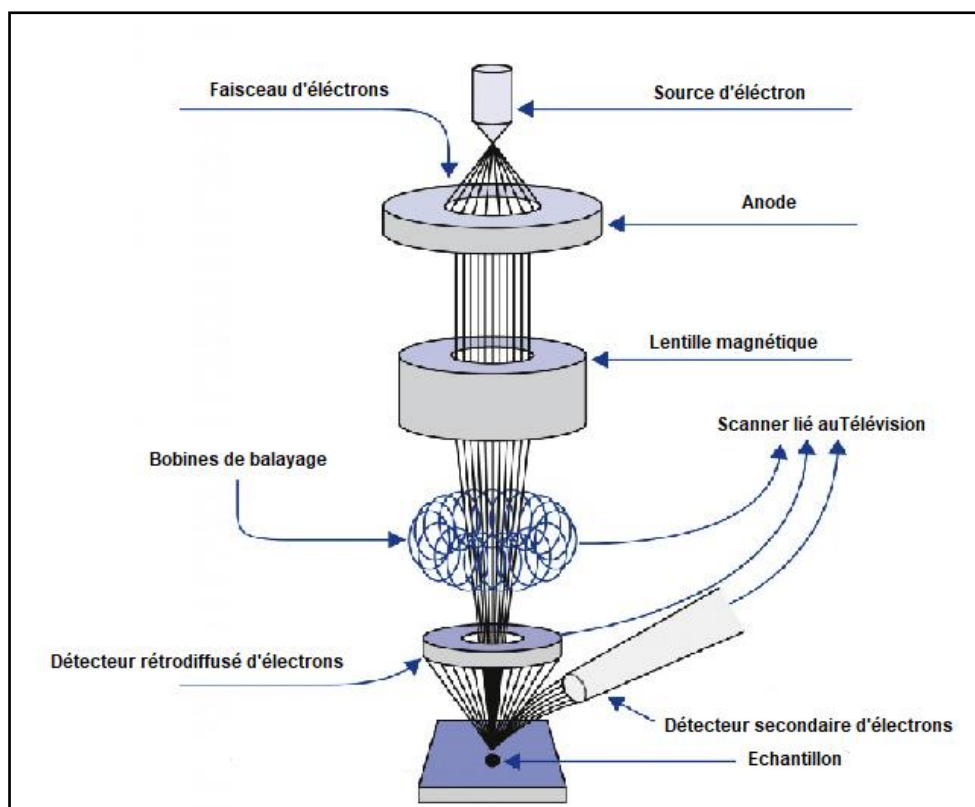


Figure 21: Schéma d'une colonne de microscope électronique à transmission

(<http://www.monospektra.com/positioning/applications/drives-positioning-systems-electron-microscopes/>)

6. Mesure de la viabilité cellulaire

a. Comptage des cellules au bleu de trypan

Le bleu de trypan est un chromophore de couleur bleu chargé négativement qui permet de compter le nombre total de cellules mortes. La molécule de bleu trypan ne s'accumule pas dans les cellules vivantes qui sont réfringentes au microscope, alors que les cellules mortes sont colorées en bleu. Après traitements, les cellules adhérentes et non adhérentes sont récupérées par centrifugation (200 x g, 5 min). Le culot est resuspendu dans 1 mL de milieu de culture. La coloration au bleu trypan est effectuée (v/v) en mélangeant 25 µL de suspension cellulaire avec 25 µL de la solution de bleu de trypan. Le comptage est réalisé sur cellule de Malassez.

b. Etude de la densité cellulaire par coloration au Crystal violet

Le crystal violet colore les noyaux d'une couleur violet foncé aidant à la visualisation des noyaux et permettant ainsi d'évaluer la confluence cellulaire ainsi que la morphologie cellulaire. Après culture et traitements des cellules N2a et afin de visualiser l'aspect morphologique des cellules, les plaques de culture ont été rincées 2 fois avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes, puis 500 µL de la solution de coloration (crystal violet 0.5 %, méthanol 25 %) a été ajouté dans chaque puits. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'excès de colorant a été éliminé en effectuant 3 lavages des cellules avec du PBS. Les puits sont séchés (10 min, température ambiante) et ensuite observés sous un microscope inversé. Afin de quantifier la viabilité cellulaire, la solution de dissolution (citrate de sodium 0.1 M, éthanol 50 %) du crystal violet a été ajoutée pendant 10 min à température ambiante puis l'absorbance a été mesurée à 570 nm avec un spectrophotomètre lecteur de plaques (MRX Revelation, Dynex Technologies).

c. Mesure de l'activité estérase : test FDA

La viabilité cellulaire a été quantifiée grâce à l'activité estérase détectée par la fluorescéine diacétate (FDA ; Sigma-Aldrich). À la fin de la période de traitement, les cellules ont été incubées à l'obscurité (37°C) pendant 8 min avec 15 µg/mL de FDA, qui reste séquestré dans le compartiment cytosolique et qui fluoresce en vert dans les cellules vivantes (**Figure 22**). Après incubation, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS (0,1 M, pH 7,4) puis lysées avec un tampon Tris/HCl contenant 1 % de dodécylsulfate de sodium (SDS). L'intensité

de la fluorescence a été mesurée (λ Excitation = 485 nm ; λ Emission = 528 nm) avec un lecteur de plaque (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France) afin de quantifier les cellules vivantes.

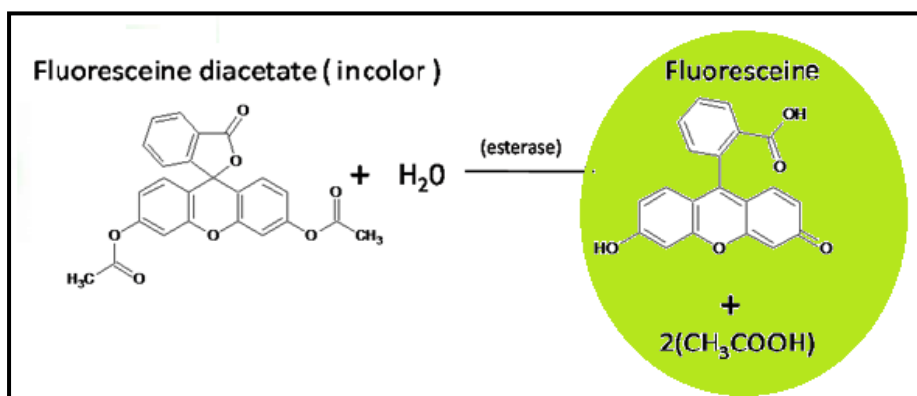


Figure22 : Réaction enzymatique transformant la fluorescéine diacétate en fluorescéine

d. Mesure de l'activité de l'enzyme succinate déshydrogénase : test MTT

Le test MTT a été utilisé pour évaluer les effets des traitements sur la densité cellulaire et/ou l'activité mitochondriale. C'est un test de viabilité cellulaire. Le MTT (Sigma-Aldrich) est réduit en sel de formazan par l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase (SDH), dans les cellules métaboliquement actives. Cette enzyme correspond à la succinate-coenzyme Q/complexe respiratoire II localisée sur la membrane mitochondriale interne (**Mosmann, 1983**). La SDH produit des cristaux de formazan violets à partir du MTT [3-(4,5-diméthyl – thiazol-2-yl) -2,5-diphényle-Tetra-zolium bromure] (**Comley 1989**) (**Figure 23**) ; ces derniers sont dissous dans du DMSO. L'absorbance de cette solution violette peut être quantifiée en la mesurant à une longueur d'onde de 570 nm avec un lecteur de microplaques – Tecan Sunrise (Tecan).

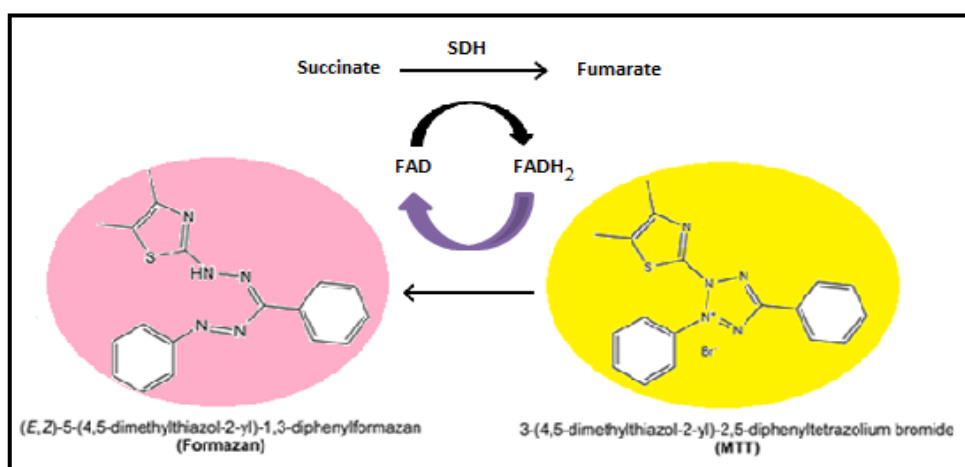


Figure 23: Métabolisation du MTT en bleu de formazan par les cellules vivantes

e. Mesure de la perméabilité de la membrane plasmique par l'Iodure de propidium

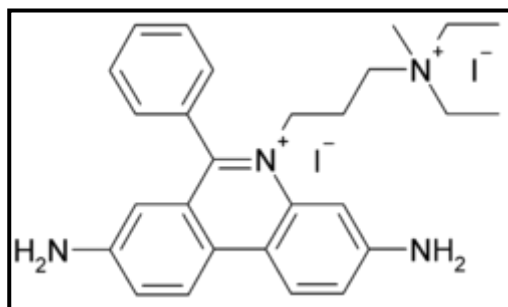


Figure 24 : Structure chimique de l'Iodure de Propidium

Les cellules ayant une membrane plasmique perméabilisée sont considérées comme des cellules mortes. L'iodure de propidium (IP) est une molécule cationique hydrophile utilisée pour quantifier les cellules mortes (**Figure 24**). L'IP s'intercale entre les acides nucléiques (ADN, ARN) produisant une fluorescence orangée / rouge. La solution mère d'IP, stockée à +4°C à l'abri de la lumière, est préparée dans de l'eau milliQ à la concentration de 1 mg / mL. Afin de quantifier la mortalité cellulaire, les cellules sont reprises dans une solution d'IP à 1 µg / mL dans le PBS, et incubées à 37°C pendant 15 min. Le pourcentage de cellules mortes correspond au pourcentage de cellules IP positives. Les analyses sont faites en cytométrie en flux en prenant en compte 10 000 cellules. L'intensité de fluorescence de l'IP ($\lambda_{Ex} \text{ Max} = 538 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} \text{ Max} = 617 \text{ nm}$) est mesurée en utilisant un filtre passe-bande $590 \pm 20 \text{ nm}$. Les données sont ensuite analysées à l'aide des logiciels Flomax (Partec) ou Flowjo (Tree Star Inc.).

7. Mesure du stress oxydant

a. Mesure des anions superoxydes par la dihydroéthidine

La dihydroéthidine (DHE ; (Molecular Probes / Invitrogen).) est un composé non fluorescent qui a la capacité de traverser la membrane cellulaire et qui est oxydé par les anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) en hydro-éthidium (HE) (**Figure 25**). L'HE se fixe de façon non covalente au niveau des bases l'ADN permettant sa rétention dans la cellule ou il émet une fluorescence orange / rouge en réponse à une excitation bleue ($\lambda_{Ex} \text{ Max} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} \text{ Max} = 575 \text{ nm}$) (**Rothe & Valet, 1990**).

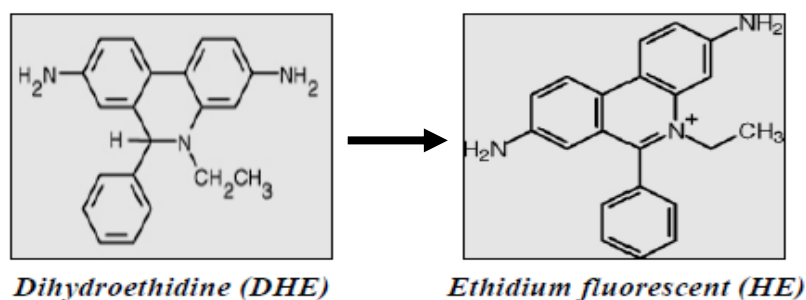


Figure 25: Schéma d'oxydation de DHE en HE

La solution mère de DHE a été préparée dans du DMSO à une concentration de 1.6 mM. Ce fluorochrome a été utilisé sur des cellules mises en suspension dans 1 mL de PBS à une concentration finale de 2 μ M et incubées par la suite pendant 15 min à 37°C. La fluorescence orange / rouge de l'HE a été mesurée avec un filtre passe-bande 580 nm, sur une échelle logarithmique en prenant en compte 10 000 cellules. Les données ont été analysées avec les logiciels Flomax et FlowJo.

b. Mesure du peroxyde d'hydrogène par la dihydrorhodamine 123

La Dihydrorhodamine 123 (DHR123) est un indicateur de production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Richardson *et al.* 1998**). Ce composé a la capacité de diffuser passivement au niveau de membrane plasmique pour être ensuite oxydé en présence de H_2O_2 et pour former la Rhodamine 123 (RH 123) ($\lambda_{Ex} \text{ Max} = 505 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} \text{ Max} = 529 \text{ nm}$) (**Figure 26**). La solution mère de DHR 123 (Sigma-Aldrich) a été préparée à 2 mM dans du DMSO.

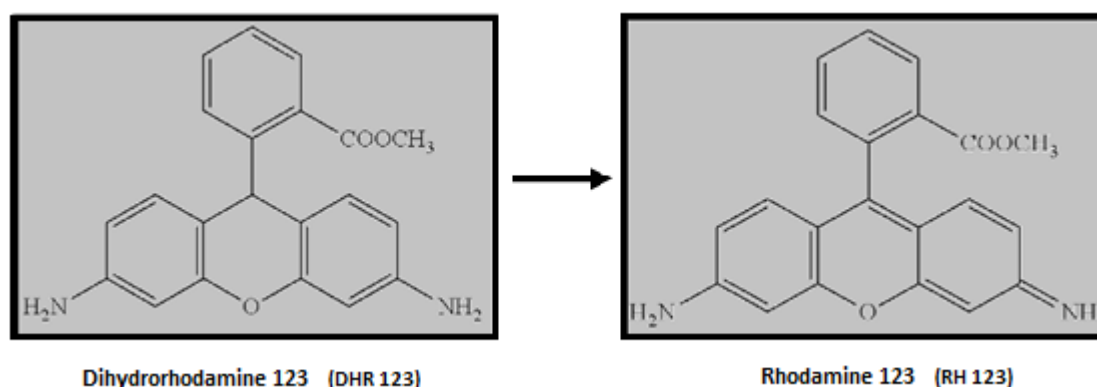


Figure 26: Schéma d'oxydation de DHR 123 en RH 123

Les cellules traitées ont été trypsinées et mises en suspension dans 1 mL de PBS contenant du DHR 123 à une concentration finale de 6 μ M. Après 15 min d'incubation à 37°C, les cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence verte

a été collectée avec un filtre passe-bande 520 ± 20 nm en prenant en compte 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. Les données ont été analysées avec le logiciel FloMax.

8. Analyse des organites (mitochondrie, lysosome)

a. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par le DiOC₆(3)

La mitochondrie est un organe présent à l'intérieur des cellules eucaryotes ; elle fournit de l'ATP pour assurer l'énergétique cellulaire. Le potentiel mitochondrial est le résultat de mouvement de protons transmembranaires créant un gradient électrochimique ($\Delta\Psi_m$) de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. La mesure du potentiel membranaire est utilisée pour caractériser précocement l'activité métabolique mitochondriale et la viabilité cellulaire. Le DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) (**Figure 27**) est un fluorochrome utilisé pour évaluer le $\Delta\Psi_m$ par cytométrie en flux. L'intensité de fluorescence du DiOC₆(3) ($\lambda_{Ex} \text{ Max} = 488$ nm ; $\lambda_{Em} \text{ Max} = 501$ nm) est proportionnelle au ($\Delta\Psi_m$). Les cellules traitées, par différentes substances et dans différentes conditions, sont mises en suspension dans 1 mL de PBS. Afin d'effectuer la coloration en présence de DiOC₆(3), la solution mère de ce fluorochrome initialement préparée dans du DMSO à une concentration de 1 mM, est par la suite diluée dans de l'eau distillée à une concentration de 20 μM afin d'être utilisée à une concentration finale de 40 nM (suspension cellulaire ajustée à 10^6 cellules / mL). Après 15 min d'incubation à 37°C, les cellules ont été analysées extemporanément sur un cytomètre en flux Galaxy / Partec en prenant en compte 10 000 cellules. Le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées (faible $\Delta\Psi_m$), correspond au pourcentage de cellules DiOC₆(3) négatives ; il est quantifié sur une échelle logarithmique de fluorescence.

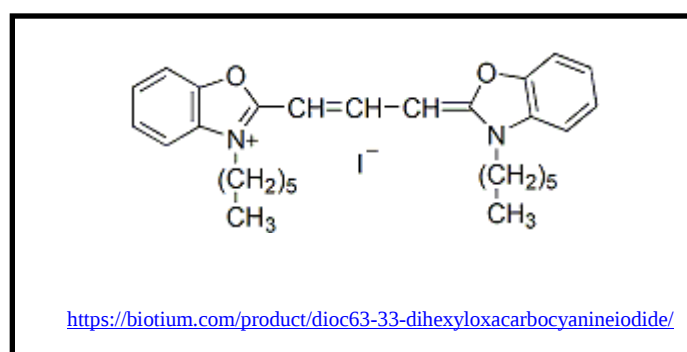


Figure 27 : Structure chimique du DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide)

b. Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes par l'acridine orange

L'acridine orange (AO) composé lysosomotropique et métachromatique, est un fluorochrome qui en fonction du pH émet la fluorescence à deux longueurs d'onde différentes produit différents types de fluorescence (composé lysosomotropique et métachromatique). A pH acide, l'acridine orange produit une fluorescence orange et à pH neutre une fluorescence jaune / verte sous excitation à la longueur d'onde 488 nm. Les lysosomes fonctionnels normaux, de petites vésicules acides seront ainsi marqués en orange par ce fluorochrome. L'acridine orange permet donc d'évaluer la fonctionnalité des pompes à protons lysosomale (**Yuan P et al., 2000**). La perte de l'intégrité membranaire lysosomale perturbe la pompe à proton entraînant une diminution de pH intra-lysosomale et la fluorescence émise par l'AO se décale alors de l'orange vers la fluorescence jaune / verte.

Les cellules traitées ont été trypsinées et centrifugées (5 min ; 200 x g), le culot cellulaire est repris dans 1 mL de PBS (37°C) contenant 2 µg / mL d'AO puis incubé à 37°C pendant 15 min à l'obscurité. Les cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence verte a été collectée par un filtre passe-bande 520 ± 20 nm en prenant en compte 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. Les données ont été analysées avec le logiciel FloMax.

9. Analyse du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est évalué par cytométrie en flux permettant ainsi de détecter trois phases principales qui constituent et délimitent le cycle cellulaire (**Figure 28A**); la première phase nommée (G0/G1) inclut des cellules quiescentes (G0) et des cellules en cycle (G1). Au cours de cette phase G1, il y a synthèse des protéines permettant l'entrée en division cellulaire. La seconde phase est la phase de synthèse de l'ADN ; elle est nommée phase (S). Dans la troisième phase du cycle (G2/M) les cellules (G2) ne se distinguent pas des cellules en mitose (M) conduisant à la division cellulaire.

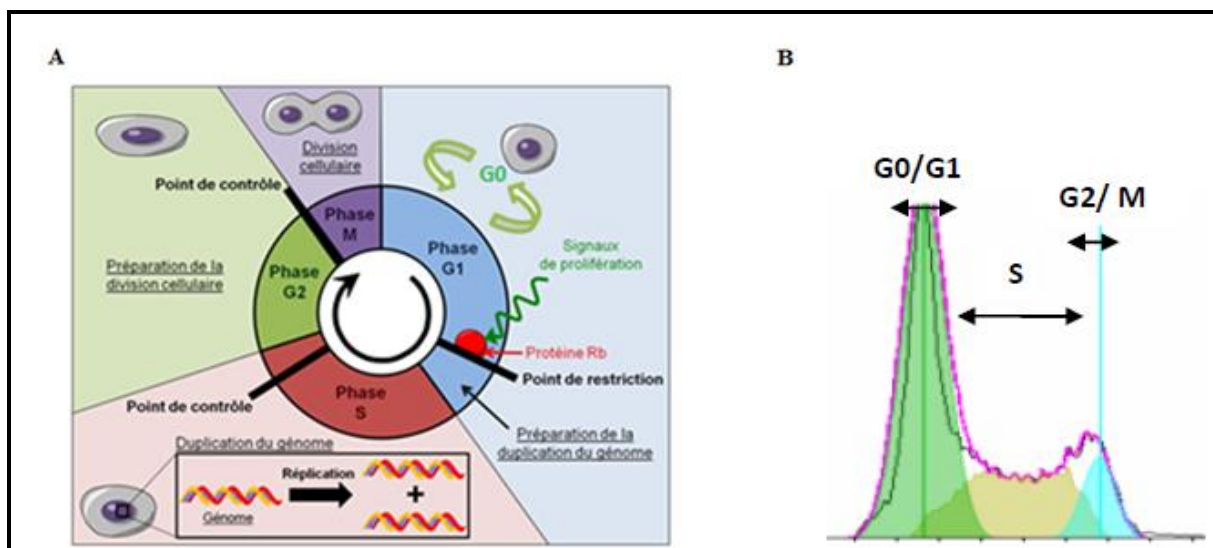


Figure 28: Représentation du cycle cellulaire (A) et analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle par cytométrie en flux suivie d'une analyse selon le modèle de Dean & Jett (B)

L'analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire est effectuée par coloration des noyaux cellulaire avec l'iodure de propidium (IP). L'IP s'intercale de manière stœchiométrique entre les acides nucléiques en émettant une fluorescence orange / rouge. Les cellules ont été détachées à l'aide de la trypsine ; après un double rinçage au PBS, les cellules ont été resuspendues dans l'éthanol (80 %) froid (-20°C) pendant 2 h. Ces cellules fixées ont ensuite été lavées en PBS et resuspendues dans 300 µL de PBS contenant 80 µg/mL d'IP et 200 µg/mL de RNase type I (Sigma-Aldrich). Après 1 h d'incubation à 37°C, la quantification de la fluorescence de l'IP a été réalisée avec un cytomètre en flux Galaxy (Partec) en prenant en compte 10 000 cellules. La fluorescence a été collectée à l'aide d'un filtre passe-bande 590/10 nm et mesurée sur une échelle linéaire. Les données ont été analysées avec le logiciel Flomax selon le modèle de Dean-Jett Fox (**Figure 28B**). Ce modèle aussi appelé « SOBR (Sum of Broadened Rectangle) method » repose sur des algorithmes sophistiqués évaluant les phases (G0 / G1) et (G2 / M) par des courbes gaussiennes et la phase S par un polynôme.

10. Mesure taux du calcium intracellulaire

Les augmentations de concentrations de calcium libre intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ ont été déterminées par la méthode de **Dramane (2012)**. Les cellules neuronales N2a ont été cultivées dans des puits de type Willico-Dish, puis incubées 30 min avec une solution de la sonde calcique Fura-2/AM (1µM) préparée dans un tampon contenant le mélange suivant : NaCl (110 mM), KCl (5,5 mM), $NaHCO_3$ (25 mM), $MgCl_2$ (0,8 mM), KH_2PO_4 (0,4 mM), Na_2HPO_4

(0,33 mM), HEPES (20 mM), CaCl_2 (1,2 mM), ajusté à un pH de 7,4. Les mouvements calciques ont été suivis sous microscope Nikon (TiU) équipé d'une caméra EM-CCD (Luca-S). Les enregistrements de fluorescence ont été obtenus en temps réel en utilisant l'objectif d'immersion à huile de S-fluor 40X (Nikon, Tokyo, Japon). Les modifications de taux de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ont été exprimées en Δ ratio qui est égale à la différence entre F340/F380 (indicateur de concentrations intracellulaires de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$). Lors des enregistrements, la molécule à tester a été ajoutée sans interruption en petits volumes.

11. Analyse des lipides

a. Mesure des lipides neutres et polaires par coloration au Nile Red (NR)

La quantification des lipides neutres et polaires dans les cellules vivantes a été réalisée par coloration au Nile Red (NR) 9-diéthylamino-5H-benzo [α] phénoxazine-5-one. C'est une excellente molécule lipidique fluorescente. Dans la plupart des solvants polaires, le NR n'est pas fluorescent; cependant, dans un environnement riche en lipides il est intensément fluorescent avec des couleurs variées. Il colore les lipides neutres en jaune ($\lambda_{\text{Ex Max}} = 488$; $\lambda_{\text{Em Max}} = 570$ nm) et les lipides polaires en orange-rouge ($\lambda_{\text{Ex Max}} = 532$ nm ; $\lambda_{\text{Em Max}} = 590$ nm).

Les cellules traitées ont été trypsinées puis récupérées dans un tube à hémolyse et centrifugées 5 min à 300 g. Le culot cellulaire est repris dans 1 mL de PBS 1X contenant 0,1 μg / mL de Nile Red puis incubé (15 min, 37°C). La quantification des lipides neutres et polaires a été réalisée au cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence jaune a été mesurée avec un filtre passe-bande 580 ± 10 nm et la fluorescence orange / rouge avec filtre passe-long de 630 nm. L'intensité de fluorescence a été mesurée sur une échelle logarithmique. Pour chaque échantillon, le rapport de la fluorescence ((orange/rouge) / jaune) a été quantifié. L'acquisition et l'analyse des données ont été faites avec le logiciel Flomax.

b. Evaluation et quantification des acides gras et du cholestérol par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

i. Extraction des lipides totaux

Les cellules ont été trypsinées et comptées sur cellule de Malassez. Les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG / SM). Les culots cellulaires ont été décongelés puis placés dans des tubes en verre avec 10 μL de diheptadecanoylphosphatidylcholine à une concentration de 1

mg / mL puis dilués dans le chloroforme. Cette solution servira comme standard interne. 4 mL de mélange de chloroforme/méthanol (2/1, v/v) contenant 50 mg/mL de BHT et 1 mL de NaCl (150 Mm) ont été ajoutés aux échantillons. Les tubes ont été agités pendant 30 min puis centrifugés (5 min, 2000 g) et deux phases sont apparues : la phase organique inférieure est celle qui a été utilisée et évaporée à sec sous azote pour l'analyse lipidique. L'extrait sec a été ensuite repris avec 500 µL de chloroforme.

ii. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse appliquée à l'analyse des acides gras

Le dosage des acides gras a été réalisé selon la méthode décrite par (**Takemoto *et al.*, 2003**). Dans un tube en verre, 100 µL de l'extrait chloroformique et 100 µL de C17:0, utilisé comme un standard interne, ont été mélangés avec 2 mL d'acide hydrochlorique contenant 5 % de méthanol. Après agitation, le mélange a été incubé 2 h à 100°C. Après refroidissement, les dérivés méthylés ont été extraits deux fois avec 2 mL de n-hexane, ensuite séchés sous un flux d'azote et dissous dans 60 µL de n-hexane. 1 µL de l'extrait ainsi obtenu a été injecté dans le système de CPG/SM (Hewlett Packard 5890 Series II Gaz Chromatograph / Hewlett Packard 5972 MS) équipé du programme informatique HP Chemstation et d'une colonne HP-INNOWAX (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) de diamètre interne 250 µm, de longueur 30 m et d'épaisseur de film 0,25 µm. Les analyses ont été pratiquées dans les conditions suivantes: gaz vecteur : hélium - débit colonne : 1,1 mL /min, mode d'injection : Split et rapport de Split: 1/10. Le programme du four était comme suit ; la température initiale du four est à 100°C, 15°C/min jusqu'à 240°C pendant 10 min. La mise en évidence de chaque pic obtenu a été faite en se basant sur les spectres enregistrés dans la base de données.

12. Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR

i. Extraction des ARN

Les effets de l'ODN, l'apigénine et le resvératrol sur l'expression des neuropeptides connus par leurs activités neurotrophiques; le précurseur de l'ODN (DBI) et les facteurs de croissance (NGF, BDNF), ont été évalués par la technique de RT-PCR quantitative (RT-qPCR).

Les cellules N2a ont étéensemencées dans des boîtes de Petri 35 mm incubées à 37°C en présence ou en absence des substances à tester. Après 48h de traitement, les cellules N2a ont

été trypsinées, récupérées ensuite transférées dans des tubes Eppendorf et lavées au PBS puis 300 µL de tampon de lyse (buffer RLT) à 1 % d'éthanol à 70 % a été ajouté pour l'homogénéisation. L'extraction des ARN a été réalisée avec un Mini Kit RNeasy (Qiagen, Courtaboeuf, France). Le lysat cellulaire obtenu a été alors passé sur une colonne RNeasy spin placée dans un tube de 2 mL puis centrifugé 30 s à 800 g afin de retenir l'ARN dans la colonne. Après deux lavages avec le tampon RW1 (RNA Wash Buffer 1) effectués sur les colonnes, les ADN ont été digérés par la DNase pendant 15 min à température ambiante. Après cette incubation, deux nouveaux lavages ont été réalisés avec le tampon RPE. Afin de bien laver la colonne deux cycles de centrifugation ont été réalisés le premier dure 30 s à 8000 g afin de laver la colonne, le deuxième dure 1 min à 12 000 g permettant le séchage de la colonne qui a été, à son tour, placée dans un nouveau tube Eppendorf. Une dernière centrifugation a été faite, après l'ajout de 30 µL d'eau ultra pure (DNase et RNase free), durant 1 min à 800 g permettant ainsi de récupérer les ARN totaux.

ii. Dosage d'ARN

Les ARN totaux (40 µg/mL) ont été quantifiés avec un spectrophotomètre (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm. Le rapport DO 260/DO 280 permet de calculer la pureté des ARN. Ce rapport doit être compris entre 1,80 et 2,00 unités d'absorbance car en dessous de 1,80 il y a un risque de contamination protéique et au-dessus de 2.00 l'ADN génomique risque d'être contaminé.

iii. Transcription inverse

Les ARN totaux ont été transcrits en ADN complémentaires à l'aide du Kit « i Script CDNA Synthesis » (BioRad, Marne la Coquette, France), dans un thermocycleur « Gene AMP PCR System 2400 » (Perkin Elmer). C'est l'étape de la reverse transcriptase. Pour cela, les ARN totaux ont été dilués dans un volume total de 30 µL d'eau stérile ; par la suite, un volume de 1 µL d'enzyme (Transcriptase Reverse) et 4 µL de tampon de RT ont été ajoutés par tube. Le thermocycler permet aux échantillons de passer par plusieurs cycles à des températures différentes. Les échantillons incubés 5 min à température ambiante permettent l'hybridation des amorces. L'étape d'élongation du brin d'ADNc a été faite à 42°C pendant 40 min, suivie d'une étape de 5 min à 85°C permettant la dénaturation des brins nouvellement synthétisés. Enfin, les échantillons ont été maintenus à + 4°C afin de stopper la réaction et de conserver les ADNc.

iv. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

L'amplification a été effectuée sur l'ADNc à l'aide du kit «FG Power SYBR Green (Thermo Fischer Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) dans un thermocycleur iCycler IQ (Biorad). La réalisation de PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel permet de mesurer de façon indirecte l'impact des traitements sur l'expression des gènes cibles (**Tableau 5**). Le fluorophore SYBR green utilisé, est un agent intercalant des acides nucléiques doubles brins et qui se fixe au niveau du petit sillon. Ce fluorophore a la capacité d'émettre de la fluorescence dans le vert lorsqu'il est excité par les UV. Cette fluorescence est proportionnelle à la quantité de SYBR green fixé, donc à la quantité d'ADN dans l'échantillon. La qPCR a été réalisée dans des plaques 96 puits où 20 μ L de mix de qPCR (contenant le SYBR green, les dNTPs, l'enzyme « Hot Start », et d'autres éléments nécessaires à la réaction (comme $MgCl_2$) et 5 μ L d'ADNc ont été introduits, la dilution pouvant aller de 1 /10ème à 1 /100ème selon la quantité d'ADNc disponible auxquels ont été ajoutés des amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt 'forward' and 'reverse' mouse primers (Eurogentec, Liège, Belgium) à 100 μ M final chacun. La plaque 96 puits a été centrifugée 1 min à 1000 rpm puis insérée dans l'iCycler. Le programme utilisé comprend trois cycles : la première phase 30 s à 25°C, la seconde phase (phase d'activation de l'enzyme) 2 min à 95°C, et la troisième phase elle-même découpée en 3 étapes: la dénaturation des acides nucléiques 30 s à 94°C, l'hybridation avec les amorces 30 s à 60°C et l'élongation 30 s à 72°C. Cette dernière phase est répétée sur 40 cycles. La fluorescence est mesurée à chaque fin de phase d'élongation, permettant donc d'obtenir une courbe de fluorescence comprenant trois phases : la phase d'initiation durant laquelle la quantité de produit de PCR est faible pour être mesurée ce qui correspond au bruit de fond, la phase exponentielle durant laquelle en théorie le nombre de produits de PCR est doublé à chaque cycle, et la phase 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. Elle permet d'établir une courbe de fusion mesurée avec une montée de température de l'ordre de 0,5 °C toutes les 5 s (de 70 à 95°C). Chaque produit de PCR est caractérisé par sa température de fusion ou Melting Température (TM) qui est proportionnelle à la séquence du produit et à sa taille. Pour déterminer le TM, il suffit de regarder à quelle température nous obtenons la moitié de la fluorescence maximale, c'est-à-dire la moitié des molécules sous forme de double-brin. Sur la courbe dérivée dF/dT en fonction de la température, le TM correspond à la température à laquelle on obtient un pic, là où la variation de fluorescence est la plus importante. Il suffit

ensuite de vérifier que la température de fusion obtenue pour chaque puits concernant un même gène unique et identique. Les dimères d'amorces forment des pics à des températures plus basses que les amplicons dont les tailles varient entre 75 et 120 paires de bases. La quantité d'ADNc dans chaque échantillon est calculée, en utilisant la méthode de comparaison du cycle seuil ou Ct (cycle threshold). Le ΔCt qui correspond à la différence entre le Ct du traité et le Ct du témoin a été calculé en fonction du gène d'intérêt et du gène de référence.

Tableau 5 : Séquences des amorces des gènes étudiés

Gènes d'intérêt	DBI	Sens (5'-gaagcgcctcaagactcagc-3')
		Anti-sens (5'-ttcagcttggtccacgagtc-3')
	NGF	Sens (5'-acactctgatcactgcgttttg-3')
		Anti-sens (5'-ccttctgggacattgctatctgt-3')
	BDNF	Sens (5'-atggttatttcatactcgggtgca-3')
		Anti-sens (5'-agctgggtaggccaagttg-3')
Gène de référence	36B4	Sens (5'-gcgacctggaagtccaacta-3')
		Anti-sens (5'-atctgcttgagcccacat-3')

13. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism5 (San Diego, CA, USA). Un test d'ANOVA suivi d'un test de Mann-Whitney a été utilisé. Une valeur de p de 0,05 ou moins a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Les résultats obtenus dans ce travail de recherche doctorale se subdivisent en deux parties principales:

✓ **Partie I : Etude de l'effet neurotrophique du neuropeptide ODN**

➤ Dans cette première partie du travail nous avons cherché à mettre en évidence les effets cytoprotecteurs de l'ODN contre les dommages cellulaires induits par le stress oxydatif. Nous avons aussi étudié ses effets différenciateurs. Pour cela nous avons étudié :

- La capacité de l'ODN ainsi que ses analogues synthétiques à promouvoir la survie des cellules neuronales N2a cultivées en présence de H₂O₂.
- L'effet de l'ODN et de ses analogues synthétiques dans l'induction de la différenciation neuronale *via* la formation de neurites (dendrites et/ou axones)
- L'effet de l'ODN sur le métabolisme lipidique en étudiant le profil lipidique et la biosynthèse du cholestérol
- Le type de récepteurs et les voies de signalisation intracellulaires mis en jeu dans les effets neuroprotecteurs et neurotrophiques de l'ODN.

✓ **Partie II : Evaluation des effets neurotrophiques de polyphénols (apigénine, resvératrol)**

➤ Dans un contexte nutritionnel associé au régime méditerranéen riche en polyphénols, nous avons abordé l'activité neurotrophique du resvératrol et de l'apigénine qui ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. Dans cette partie des résultats, nous avons :

- Etudié les modifications morphologiques induites par apigénine et resvératrol (formation de neurites : axones et dendrites)
- Caractérisé le(s) récepteur(s) ainsi que les voies de signalisation impliqués dans le phénomène de différenciation induit par apigénine et resvératrol



1. Effets cytoprotecteurs de l'ODN contre les dommages oxydatifs sur les cellules N2a

1.1. Choix de la concentration optimale cytoprotectrice de l'ODN

Afin d'étudier l'implication potentielle de l'ODN dans les processus de protection cellulaire des neurones N2a, la première étape de notre travail a consisté à mettre au point les conditions expérimentales permettant d'induire un stress oxydant aigu en utilisant le H_2O_2 . L'étude de la survie cellulaire, en utilisant la sonde de viabilité cellulaire (FDA), montre que l'incubation des cellules N2a en présence de doses croissantes de H_2O_2 (30 μM à 500 μM) pendant 1 h provoque une diminution dose-dépendante de la proportion de cellules vivantes, et que l'effet cytotoxique du H_2O_2 est significatif pour des concentrations supérieures à 300 μM (Figure 29).

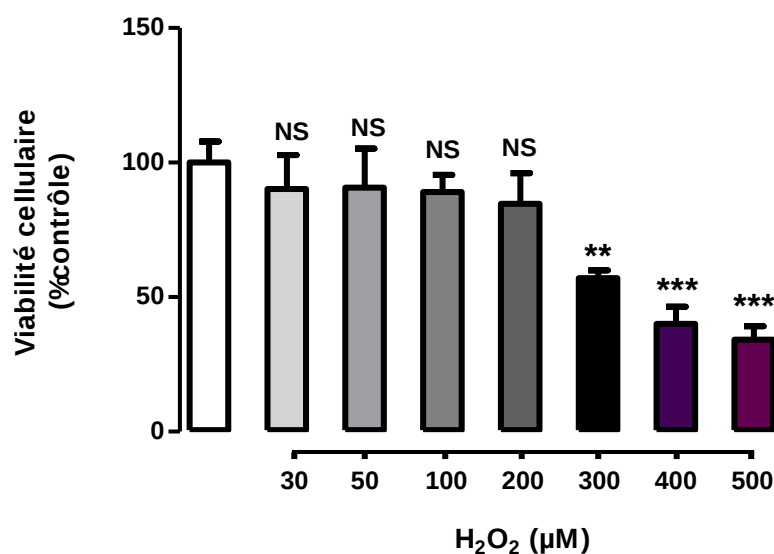


Figure 29: Effet-dose de H_2O_2 sur les cellules N2a après 1 h de traitement. La viabilité cellulaire est quantifiée par mesure de l'intensité de la fluorescence du FDA. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, ($n=5$). ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. * $p < 0,001$; ### $p < 0,001$; NS: non significatif par rapport au contrôle**

Cette étude a consisté à étudier l'effet cytoprotecteur de l'ODN en présence d'un stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Afin de valider ce modèle de

dégénérescence *in vitro*, des expériences ont été réalisées pour mettre au point un protocole expérimental qui permet de modéliser le stress oxydant. Les cellules N2a ont été incubées en présence de concentrations croissantes de H₂O₂ (30 - 500 µM). Après une heure d'incubation, ce traitement a montré une diminution dose-dépendante de la viabilité avec une EC₅₀ (EC : efficient concentration 50) de l'ordre de (300 µM) mesurée par la fluorescéine diacétate (FDA) (**Figure 29**). La concentration 300 µM de H₂O₂ qui a provoqué 50 % de mort de la population cellulaire au bout de 1 h d'incubation a été utilisée dans toutes les expériences ultérieures afin d'évaluer l'effet bénéfique de l'ODN lors d'un stress oxydatif aigu.

1.2. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur la mort et l'adhésion cellulaire

Le protocole expérimental adopté est décrit dans la figure 30. Le prétraitement des cellules N2a parvenues à subconfluence, en présence de très faibles concentrations subnanomolaires d'ODN (10⁻¹⁵ M à 10⁻¹⁰ M) prévient de manière dose-dépendante la mort des cellules induite par le H₂O₂ (300 µM ; 1 h) (**Figure 30**).

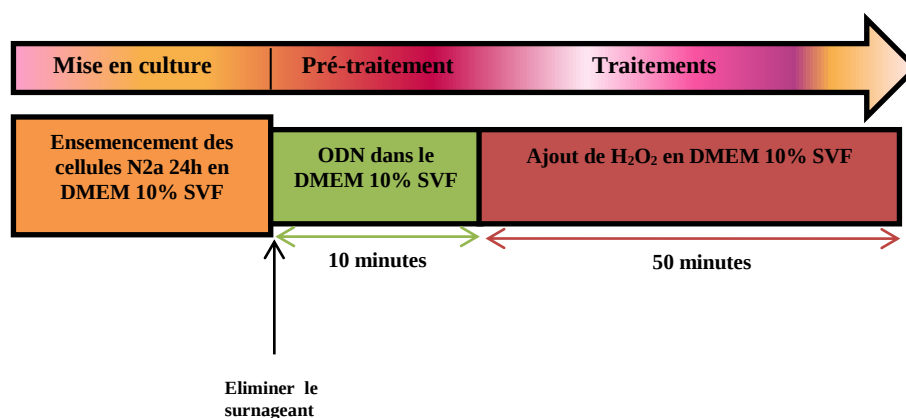


Figure 30: Protocole expérimental pour évaluer l'effet cytoprotecteur de l'ODN contre le stress oxydant induit par H₂O₂

L'ODN prévient totalement la perte neuronale pour toutes les doses testées avec une légère atténuation de son action neuroprotectrice (~85%, ****P* < 0.001) pour la concentration 10⁻¹⁰ M (**Figure 31**).

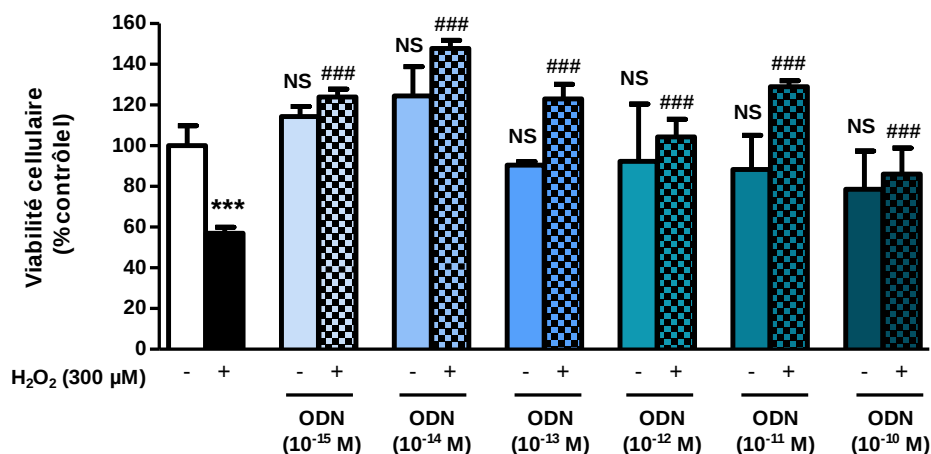


Figure 31: Effet cytoprotecteur de l'ODN sur les cellules N2a en présence de H₂O₂ (300 µM) après 1 h de pré-traitement. La viabilité cellulaire est quantifiée par la mesure de l'intensité de fluorescence du FDA et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM, (n=5). ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. ***p<0.001; ###p < 0,001; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Ces résultats montrent un **effet cytoprotecteur de l'ODN vis-à-vis d'un stress oxydant induit par H₂O₂ sur les cellules N2a**. La protection maximale est observée avec l'ODN (10⁻¹⁴M). Cette concentration sera utilisée pour les études ultérieures.

1.2.1. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur l'adhésion cellulaire

Le prétraitement des cellules N2a par l'ODN (10⁻¹⁴ M) pendant 10 min prévient l'effet du H₂O₂ (300 µM) sur les modifications morphologiques. Ces changements morphologiques ont été mis en évidence par microscopie optique en contraste de phase. Associée à ces modifications, le traitement par H₂O₂ (300 µM, 1 h) réduit la densité et la confluence cellulaire mis en évidence par coloration au crystal violet (**Figure 32A et B**). Le prétraitement des cellules par l'ODN (10⁻¹⁴ M), dépourvu par lui-même d'effet sur la morphologie et la densité cellulaire, empêche l'induction des perturbations provoquées par H₂O₂ (300 µM) sur l'aspect morphologique et la confluence cellulaire (**Figure 32A et B**).

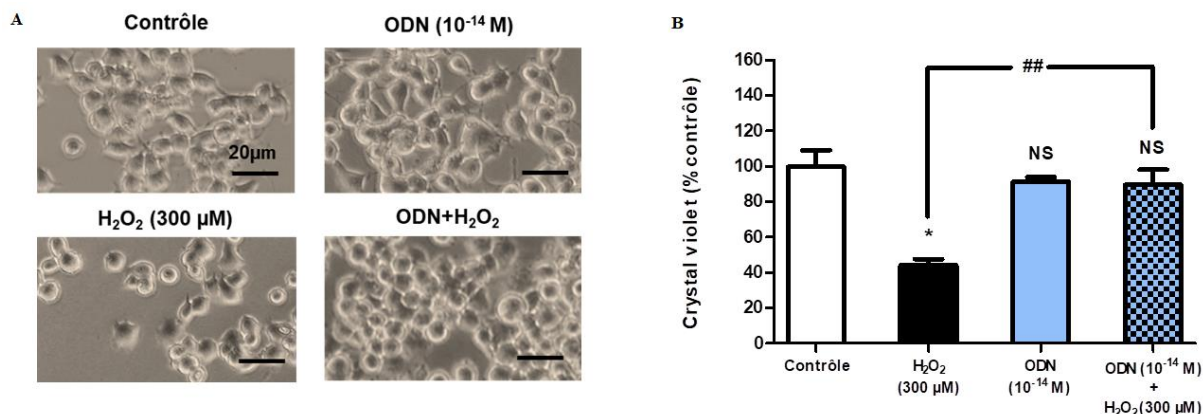


Figure 32: Effet protecteur de l'ODN. (A) Images en contraste de phase illustrant l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur les cellules N2a exposées à un stress oxydant induit par H₂O₂ (300 µM). (B) quantification de la confluence et de l'adhésion cellulaire mesurée par coloration au Crystal violet. Les résultats sont obtenus sous forme de pourcentage par rapport au contrôle. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM, (n=5). ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. *p<0.05; ##p < 0.01; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Ces résultats indiquent que **l'ODN s'oppose aux modifications morphologiques induites par H₂O₂ ainsi qu'à la perte d'adhésion et à la diminution de confluence.**

1.2.2. Effet de l'ODN sur la survie cellulaire

Etant donné que le H₂O₂ induit une mort cellulaire par stress oxydant, nous avons émis l'hypothèse que l'activité mitochondriale pouvait être impliquée dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN. La cytotoxicité de H₂O₂ (300 µM) a été évaluée par le test MTT sur les cellules N2a prétraitées ou non par ODN (10⁻¹⁴ M). Le pourcentage des cellules MTT positives reflète la proportion des cellules capables de réduire le MTT en formazan sous l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale, et donc possédant des mitochondries actives.

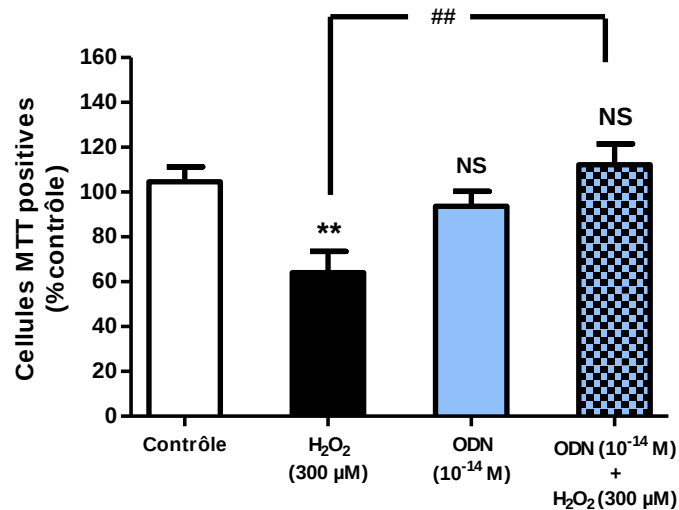


Figure 33: Evaluation de l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur la prolifération et le métabolisme mitochondrial avec le test MTT. Les cellules N2a ont été pré-incubées en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) avec ou sans H₂O₂ (300 µM) pendant 1 h. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=5) par rapport au contrôle. L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. ** $p < 0.01$; ## $p < 0.01$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

L'incubation des cellules N2a pendant 1 h avec H₂O₂ (300 µM) a induit une nette diminution du pourcentage (~ 50%) de cellules MTT positives. En revanche, le prétraitement des cellules N2a par ODN (10^{-14} M, 10 min) contrecarre l'action du H₂O₂ néfaste sur la viabilité cellulaire ce qui démontre que **l'ODN prévient les dysfonctions mitochondriales (Figure 33)**.

1.2.3. Effet de l'ODN sur l'intégrité de la membrane plasmique

L'intégrité de la membrane plasmique a été évaluée avec l'iodure de propidium (IP); un fluorochrome, intercalant à l'ADN, qui ne peut pas franchir les membranes cellulaires et donc ne pourra pénétrer que dans les cellules dont la membrane plasmique est désintégrée par endommagement cellulaire. La perméabilisation de la membrane cytoplasmique se caractérise par une augmentation de la fluorescence orange/rouge émise par les cellules qui accumulent l'IP. Les cellules N2a ont été pré-traitées en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) avec ou sans H₂O₂ (300 µM) (**Figure 34**).

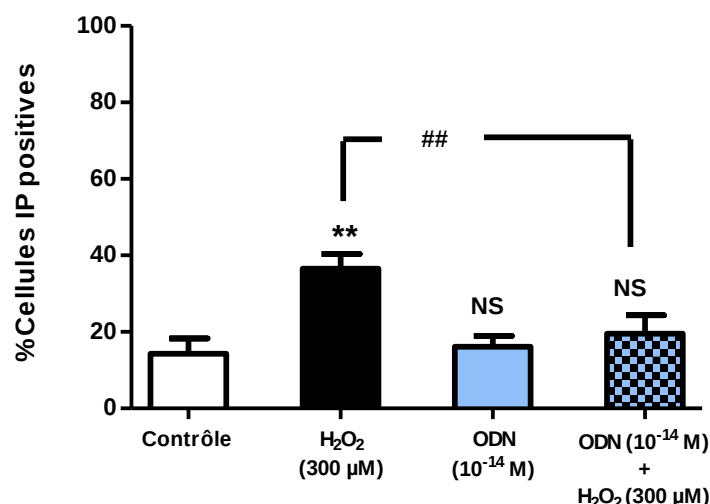


Figure 34: Evaluation de l'effet cytoprotecteur de l'ODN associé ou non à H₂O₂ sur l'intégrité de la membrane plasmique. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules fluorescentes. Chaque valeur représente la moyenne du pourcentage de cellules fluorescentes ± SEM, (n=5). L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. **p<0.01; ##p < 0.01; NS: non significatif par rapport au contrôle.

L'analyse de la fluorescence émise par l'IP est réalisée par cytométrie en flux montrant que le traitement par le H₂O₂ augmente fortement le pourcentage (40 %) de cellules positivement marquées par l'IP et donc avec des membranes cellulaires altérées. Alors que le prétraitement des cellules N2a par l'ODN réduit ce pourcentage pour le ramener à la même valeur obtenues avec les cellules témoins (**Figure 34**). Ces résultats démontrent que **l'ODN prévient la perte de l'intégrité de la membrane plasmique induite par H₂O₂**.

1.3. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur la surproduction des espèces réactives de l'oxygène

L'effet toxique de H₂O₂ est lié principalement à une surgénération de ROS (H₂O₂ et O₂^{•-}). L'effet cytoprotecteur de l'ODN (10⁻¹⁴ M) sur la formation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'anion superoxyde (O₂^{•-}) catalysé par H₂O₂ a été mesuré respectivement avec la Dihydrorhodamine 123 (DHR123) et la Dihydroethidine (DHE). La coloration à la DHR123 a été réalisée sur les cellules N2a mises en suspension ; la mesure de l'intensité de fluorescence a été mesurée et analysée par cytométrie en flux (**Figure 35**).

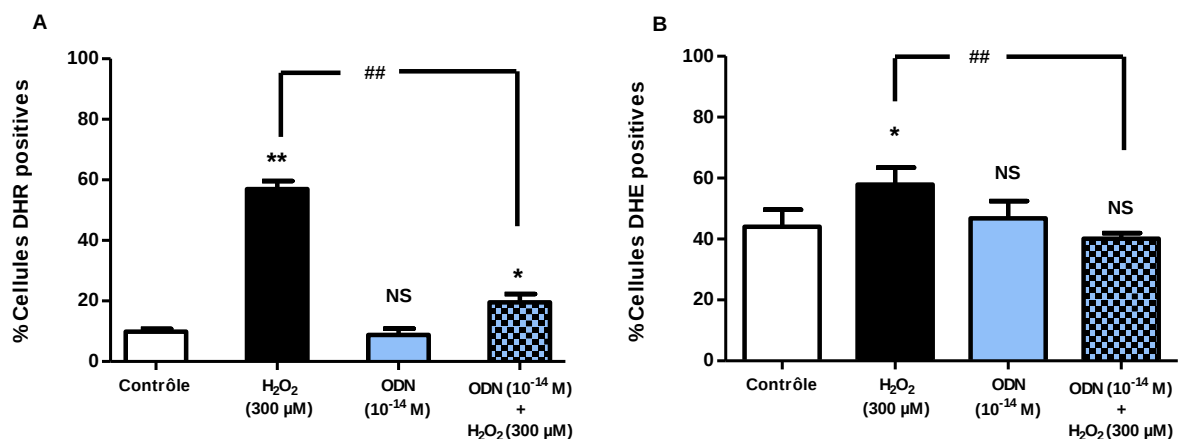


Figure 35: Mesure de la production des ROS. Les cellules N2a ont été prétraitées 10 min en présence ou absence d'ODN (10^{-14} M) avec ou sans H₂O₂ (300 µM). Après 1 h de traitement, deux colorations indépendantes ont été réalisées ; **(A) une coloration à la DHR123** et **(B) une coloration à la DHE** permettant de quantifier respectivement H₂O₂ et O₂^{•-}. Une analyse par cytométrie en flux a été réalisée. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules fluorescentes. Chaque valeur représente la moyenne du pourcentage de cellules fluorescentes $\pm$ SEM, (n=5). ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ## $p < 0.01$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Le traitement des cellules N2a avec H₂O₂ (300 µM) pendant 1 h conduit à une augmentation importante (60 %) du taux des peroxydes intracellulaires de cellules DHR123 positives (surproduisant H₂O₂), alors que le pré-traitement des N2a par l'ODN (10^{-14} M) réduit cette surproduction où environ 20 % environ de cellules DHR123 positives sont identifiées (**Figure 35A**). De plus, une augmentation du pourcentage de cellules produisant l'anion superoxyde est observée après coloration par la DHE. L'ODN (10^{-14} M) s'oppose à la surproduction de superoxydes induite par H₂O₂ (300 µM) (**Figure 35B**). Les cellules pré-traitées par l'ODN (10^{-14} M) ont un niveau de fluorescence de DHE comparable au contrôle (**Figure 35B**). Dans leur ensemble ces résultats démontrent que **l'ODN s'oppose à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène**.

1.4. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur l'activité des organites (lysosome, mitochondrie)

1.4.1. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur l'intégrité lysosomale

Les cellules N2a ont été pré-traitées en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) avec ou sans H_2O_2 (300 μ M). Après une heure de traitement, une coloration à l'acridine orange a été effectuée sur cellules mises en suspension en vue d'évaluer l'activité lysosomale. L'analyse des résultats a été réalisée par cytométrie en flux (**Figure 36**).

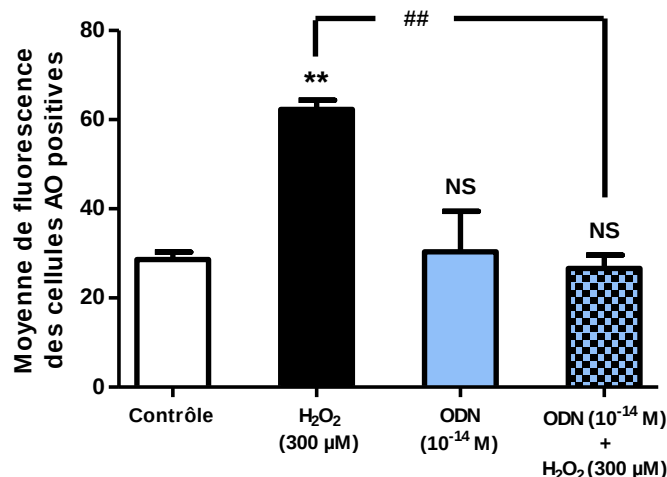


Figure 36: Evaluation de l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur la déstabilisation des lysosomes induite par un stress oxydant. Chaque valeur représente le pourcentage de cellules acridine orange (AO) positives $\pm$ SEM, ($n=3$). L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. ** $p < 0.01$; ## $p < 0.01$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Les résultats observés n'ont révélé aucune différence significative entre le contrôle et les cellules traitées ou pré-traitées par ODN (10^{-14} M). Par contre, une déstabilisation fortement significative des lysosomes a été observée sur cellules N2a traitées par H_2O_2 (300 μ M). Le pourcentage des cellules avec lysosomes déstabilisés représente environ 62 %, alors que sur cellules pré-traitées 10 min par ODN (10^{-14} M) ce pourcentage est rapporté à 29 %, valeur proche du contrôle (**Figure 36**). Par conséquent, **l'ODN protège contre la déstabilisation lysosomale induite par H_2O_2** .

1.4.2. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

Il est important de mesurer le potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) afin de caractériser l'altération de l'activité métabolique mitochondriale. Le $\Delta\Psi_m$ a été mesuré par coloration au DiOC₆(3). L'accumulation de ce fluorochrome dans la mitochondrie dépend de la valeur du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$. La diminution de $\Delta\Psi_m$ s'accompagne d'une diminution de la fluorescence associée à DiOC₆(3).

L'incubation des cellules N2a pendant 1 h avec H₂O₂ (300 μ M) et leur analyse par cytométrie en flux après coloration avec le DiOC₆ (3) montre une augmentation marquée du pourcentage des cellules avec des mitochondries ayant subies une chute du $\Delta\Psi_m$ moins dépolarisées, donc avec un $\Delta\Psi_m$ encore moins élevé que dans le contrôle (**Figure 37**).

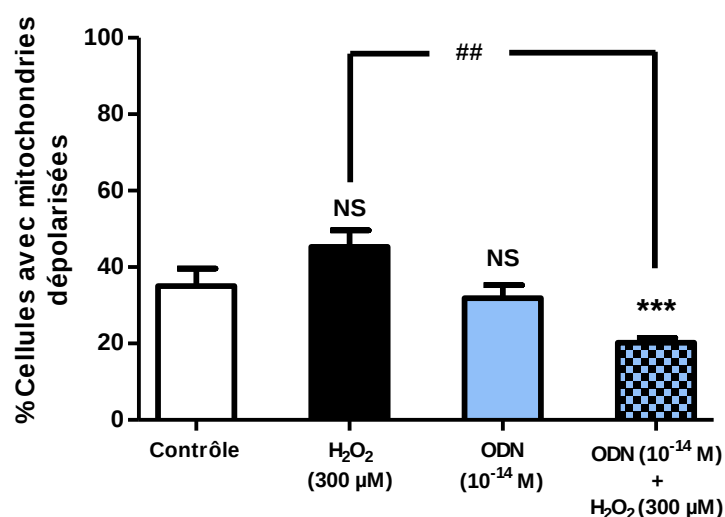


Figure 37: Evaluation de l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur le potentiel transmembranaire mitochondriale. Les cellules N2a ont été pré-incubées en présence ou en absence d'ODN (10⁻¹⁴ M) avec ou sans H₂O₂ (300 μ M) pendant 1 h. Le potentiel transmembranaire mitochondrial a été mesuré après coloration avec le DiOC₆(3) afin de quantifier le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées. Chaque valeur représente le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées $\pm$ SEM, (n=3). L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. ***p < 0.001; ##p < 0.01; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Sur cellules traitées avec ODN (10⁻¹⁴ M), on observe une diminution significative du pourcentage de cellules DiOC₆ (3) négatives ayant des mitochondries dépolarisées (**Figure 37**). Sur des cellules traitées par H₂O₂, **l'ODN prévient la chute de $\Delta\Psi_m$** .

1.5. Effet de l'ODN sur l'activation cellulaire : mobilisation du calcium

Le calcium est connu comme acteur clé dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires : interaction ligand-récepteur, induction de mort cellulaire, différenciation. Une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire peut être due à une entrée de calcium ou à un relargage à partir des mitochondries ou du réticulum endoplasmique. Compte tenu de l'impact de l'ODN sur la prévention de la mort cellulaire et sur l'atténuation des dysfonctions mitochondriales, nous avons émis l'hypothèse que l'ODN pourrait également agir sur la dynamique calcique.

Les cellules N2a cultivées (2×10^5 cellules/ puits de plaque 96 puits) ont été incubées avec la sonde calcique du Fura-2 / AM. Après 30 min d'incubation, avec du milieu de culture l'ODN (10^{-14} M) a été directement ajouté au voisinage des cellules. Les mouvements calciques ont été enregistrés en temps réel en utilisant un objectif à immersion à huile S-fluor 40X (Nikon, Tokyo, Japon). Les modifications de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ont été exprimées en Δ Ratio (F340 / F380) (**Figure 38A**). Les résultats présentés dans les Figures 38A(a) et 38A(d) montrent que l'ODN (10^{-14} M) induit une augmentation significative dose-dépendante du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules neuronales (**Figure 38A(a) et (d)**). Par ailleurs, l'ajout de U73122; inhibiteur de phospholipase C (PLC), a totalement supprimé les augmentations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induites par l'ODN (10^{-14} M) montrant que le mécanisme d'action de l'ODN stimule le métabolisme des polyphosphoinositides triphosphates IP_3 (**Figure 38A(b)**) et met en jeu la mobilisation des pools intracellulaire. En revanche, une augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]$ libre intracellulaire résulte d'une entrée de calcium de l'environnement extracellulaire *via* des canaux $[\text{Ca}^{2+}]$ appelés (SOC) qui permettent de remplir le pool intracellulaire de $[\text{Ca}^{2+}]$. L'incubation des cellules N2a avec l'éconazole, bloqueur de la voie SOC, a considérablement diminué les augmentations de Ca^{2+} (**Figure 38A(c)**).

Les mouvements de $[\text{Ca}^{2+}]$ nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP afin de maintenir l'homéostasie de calcium au niveau cellulaire. Par conséquent, les cellules N2a ont été incubées en présence de Thapsigargine; inhibiteur de l'ATPase du réticulum sarcoplasmique-endoplasmique (SERCA). La Thapsigargine bloque SERCA et prive le réticulum endoplasmique de son pool en $[\text{Ca}^{2+}]$, entraînant une augmentation rapide de taux de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (**Figure 38B**). L'ajout de l'ODN (10^{-14} M) en premier et de Thapsigargine en second, ou vice versa, au cours d'une réponse maximale de $[\text{Ca}^{2+}]$ ne conduit pas à une réponse additive.

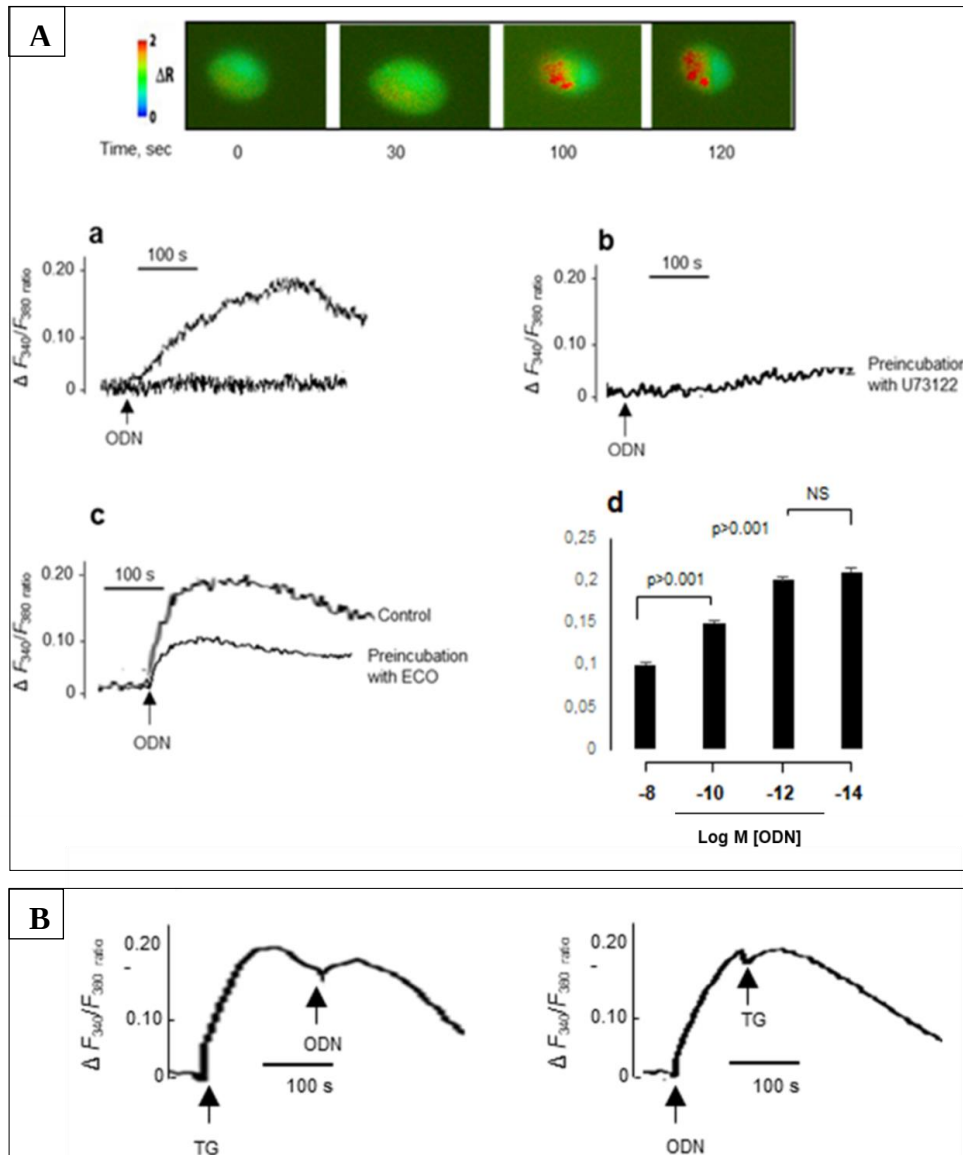


Figure 38: Effets de l'ODN sur la signalisation du $[Ca^{2+}]$ dans les cellules N2a. (A) Images pseudo-colorées montrant les modifications de $[Ca^{2+}]$ évoquées par l'ODN (10^{-14} M). En (a), (b) et (c), les cellules ont été pré-incubées en présence ou en absence des agents suivants: ODN (10^{-14} M), U73122 ($14 \mu M$) ou éconazole (ECO : $10 \mu M$). (d) Effet de différentes concentrations d'ODN sur les modifications des taux de calcium. (B) Effets de la Thapsigargine ($5 \mu M$) sur la signalisation de $[Ca^{2+}]$ induite par l'ODN dans les cellules N2a. Chaque valeur représente la moyenne ($\pm$ SEM, $n=5$). L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. NS: non significatif par rapport au contrôle.

Ces résultats montrent que **l'ODN favorise le recrutement de calcium au niveau cellulaire (Figure 38B).**

1.6. Effet de l'ODN sur le statut lipidique cellulaire (lipides neutres, lipides polaires)

L'effet de l'ODN sur la composition des lipides membranaires (neutres et polaires) a été évalué par le Nile Red (NR); qui est un colorant phénoxazine utilisé sur les cellules vivantes permettant de localiser et de quantifier les lipides neutres (fluorescence jaune sous excitation bleue) et polaires (fluorescence orange/rouge sous excitation bleue). Les cellules N2a ont été pré-traitées en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) avec ou sans H_2O_2 (300 μ M). Après 1 h de traitement, une coloration au NR a été effectuée sur les cellules mises en suspension. L'analyse des résultats est réalisée par cytométrie en flux (**Figure 39**).

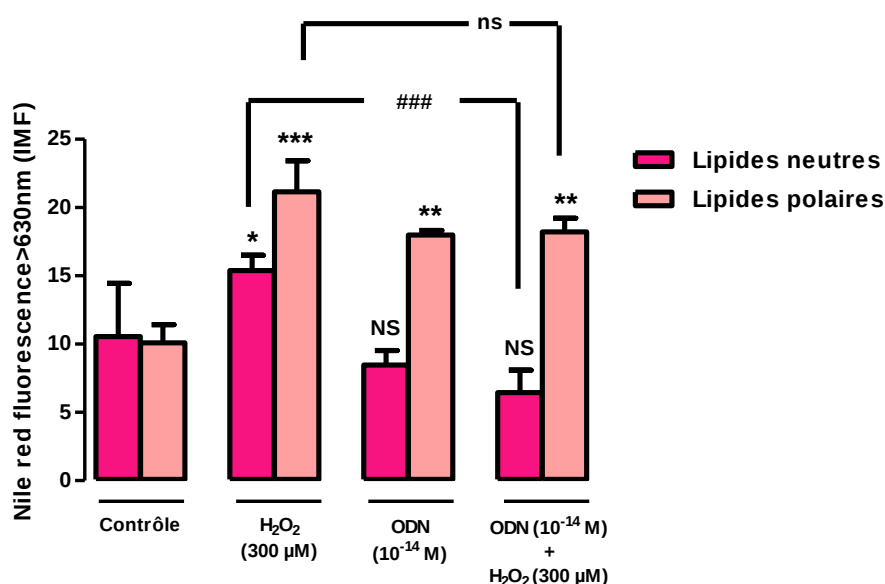


Figure 39: Quantification de lipides neutres et polaires par le Nile Red. Chaque valeur représente la moyenne de l'intensité moyenne de fluorescence $\pm$ SEM, ($n=3$). L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ### $p < 0.001$; NS: non significatif par rapport au contrôle ; ns : non significatif par rapport aux cellules traitées par H_2O_2 seul.

Les résultats indiquent une augmentation significative des lipides neutres et polaires au niveau des cellules N2a traitées par le H_2O_2 (300 μ M) (**Figure 39**). En présence d'ODN (10^{-14} M) seul, une augmentation de lipides polaires est observée (**Figure 39**). Au niveau des cellules N2a traitées par H_2O_2 en présence d'ODN, on enregistre une diminution importante de l'augmentation des lipides neutres avec un effet moins marqué sur les lipides polaires (**Figure**

39). Ces résultats indiquent que **l'ODN pourrait exercer un effet cytoprotection en modulant le taux de lipides neutres et polaires membranaires.**

1.7. Identification des récepteurs et des voies de signalisations impliqués dans les effets cytoprotecteurs de l'ODN sur les cellules N2a

Afin de caractériser le récepteur ainsi que les voies de signalisation associées dans les effets protecteurs, nous avons effectué une étude pharmacologique en utilisant des analogues spécifiques des récepteurs de l'ODN et des modulateurs spécifiques des voies de transduction intracellulaire. Le protocole expérimental de traitement des cellules est présenté dans la figure 40 consistant à un prétraitement pendant 30 min avec les différents agents pharmacologiques, après quoi l'ODN (10^{-14} M) a été ajouté pendant 10 min suivi d'un traitement par le H_2O_2 pendant 1 h d'incubation. (Figure 40).

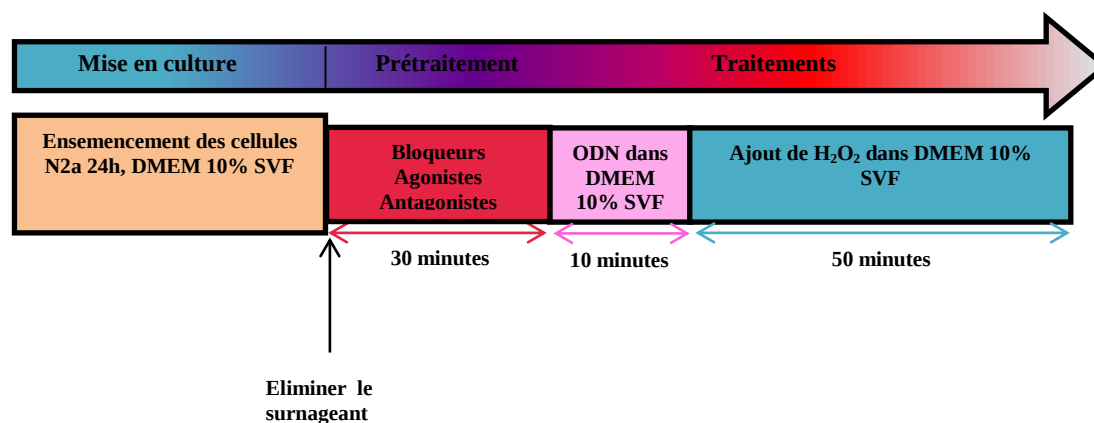


Figure 40: Protocole expérimental d'évaluation des effets cytoprotecteurs des analogues de l'ODN et des voies de signalisation associées aux effets cytoprotecteurs de l'ODN

Le traitement des cellules N2a avec l'analogue actif de l'ODN, l'octapeptide (OP, 10^{-14} M) mime l'effet de l'ODN sur la protection des cellules N2a contre la mort induite par le H_2O_2 . **Il est important de noter que l'analogue inactif de l'ODN [Ala¹⁵] OP est dépourvu d'activité intrinsèque sur les processus de survie cellulaire, confirmant la spécificité d'action de l'ODN (Figure 41).**

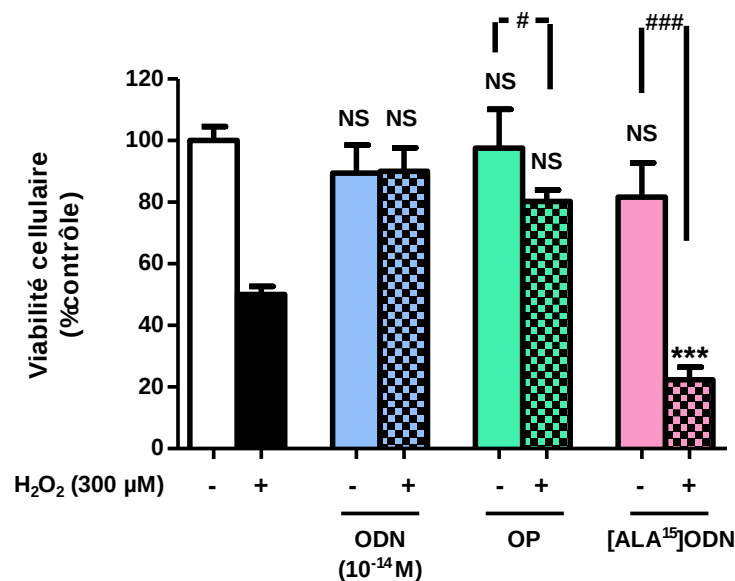


Figure 41: Les cellules N2a ont été pré-incubées pendant 30 min en absence ou en présence de l'agoniste du récepteur métabotrope OP de l'analogue dit inactif de l'ODN appelé [Ala¹⁵] OP. Après 30 min d'incubation, les cellules ont été incubées 10 min en présence ou absence d'ODN (10⁻¹⁴ M), d'OP ou [Ala¹⁵] OP avec ou sans H₂O₂ (300 μM) pendant 1 h. La viabilité cellulaire a été quantifiée par la mesure de l'intensité de fluorescence du FDA. Les résultats sont exprimés en pourcentages du contrôle correspondant. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM, (n=5). Une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni a été réalisée. ***p<0.001; #p<0.05 ; ###p<0,001; NS: non significatif par rapport au contrôle.

1.7.1. Caractérisation des récepteurs impliqués dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN : Etude de l'implication des récepteurs aux benzodiazépines centraux et des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G

Il a été démontré que l'ODN est un ligand endogène à la fois pour les récepteurs des benzodiazépines centraux (CBR) (Ferrero *et al.*1986) et des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G (RCPG) (Hamdi *et al.*, 2012 b). Le traitement des cellules N2a par le cyclo₁₋₈ [DLeu⁵] OP, antagoniste spécifique des récepteurs métabotropiques de l'ODN, abolit totalement l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur la survie cellulaire (Figure 42). En revanche, l'antagoniste spécifique des récepteurs CBR, le flumazénil, n'affecte pas l'action cytoprotectrice de l'ODN (Figure 42).

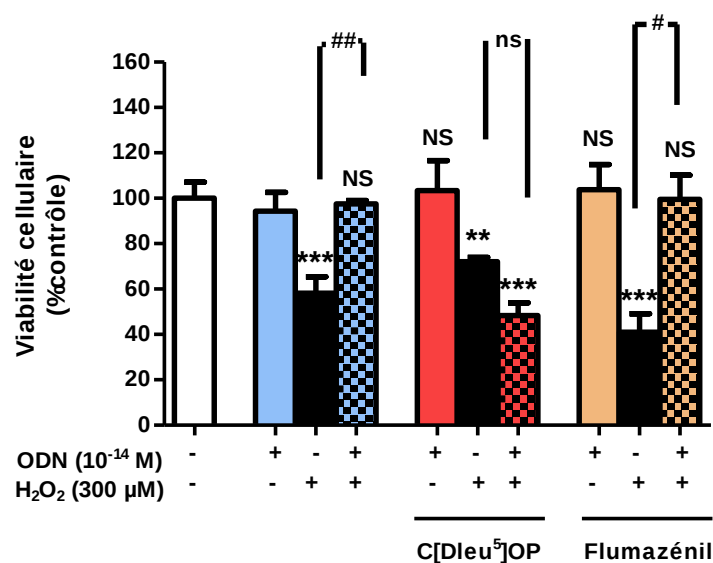


Figure 42: Caractérisation pharmacologique des récepteurs impliqués dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN. Les cellules N2a ont été pré-incubées 30 min en présence ou absence de l'agoniste des récepteurs métabotropique cyclo₁₋₈ [DLau⁵] OP (1 μM) ou de l'agoniste des CBR, le flumazénil (1 μM). Les cellules ont ensuite été incubées 10 min en présence ou absence d'ODN (10⁻¹⁴M) avec ou sans H₂O₂ (300 μM) pendant 1 h. La viabilité cellulaire est quantifiée par la mesure de l'intensité de fluorescence du FDA et les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle correspondant. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM, (n=5). Une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni a été réalisée. **p<0.01 ; ***p<0.001; #p<0.05 ; ##p < 0,01; NS: non significatif par rapport au contrôle ; ns : non significatif par rapport aux cellules traitées par H₂O₂ (300 μM).

Ces résultats suggèrent que l'ODN implique l'activation des récepteurs métabotropiques dans son action cytoprotectrice contre la mort cellulaire induite par H₂O₂.

1.7.2. Caractérisation des voies de signalisation impliquées dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN

Des travaux antérieurs ont démontré que le récepteur métabotropique de l'ODN est positivement couplé aux voies de transduction AC /AMPc / PKA, PLC / DAG-IP₃ /PKC et celles des MAPK / ERK, nous avons recherché l'importance relative de la PKA et de la PKC dans la réponse des cellules N2a à l'ODN. Nos travaux montrent que l'action neuroprotectrice de l'ODN est totalement bloquée par le H89, un bloqueur spécifique de la PKA, ainsi que par l'U0126, qui inhibe spécifiquement la phosphorylation des ERKs. De plus, le U73122, un

bloqueur de la PLC, et la chélérythrine, un inhibiteur de la PKC, abolissent totalement l'effet protecteur de l'ODN contre les dommages oxydatifs induits par le H₂O₂ dans les cellules N2a (Figure 43).

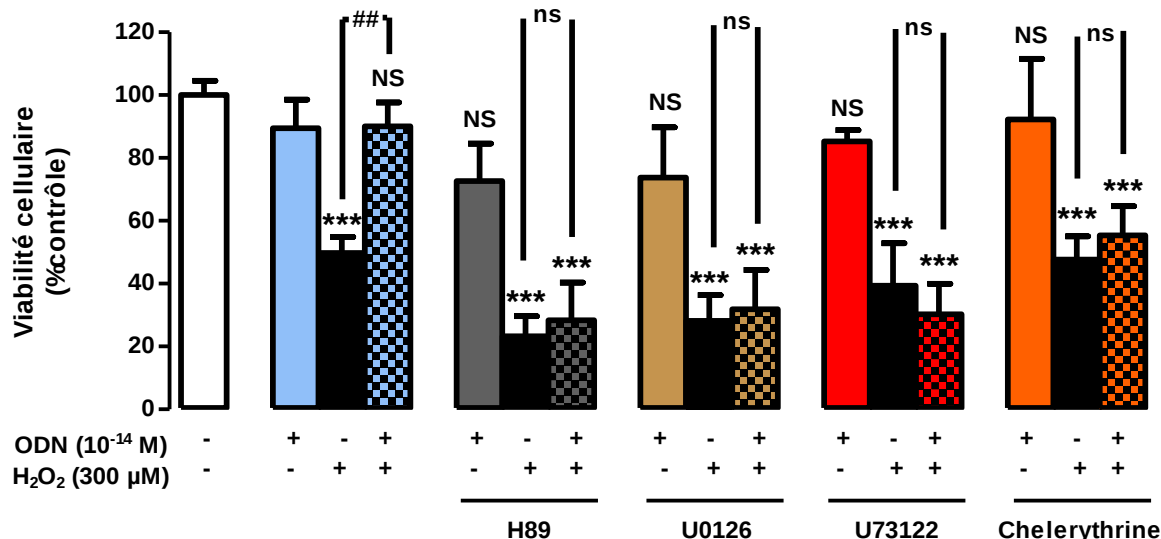


Figure 43: Identification des voies de signalisations impliquées dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN. Les cellules N2a ont été pré-incubées 30 min en présence ou absence de H89 (20 μM), U0126 (20 μM), U73122 (1 μM) et la chélérythrine (1 μM). Les cellules ont ensuite été incubées 10 min en présence ou absence d'ODN (10⁻¹⁴ M) avec ou sans H₂O₂ (300 μM) pendant 1 h. La viabilité cellulaire est quantifiée par la mesure de l'intensité de fluorescence du FDA et les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle correspondant. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM, (n=5). Une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. ***p<0.001; ##p < 0,01; NS: non significatif par rapport au contrôle ; ns : non significatif par rapport aux cellules traitées par H₂O₂ (300 μM).

Ces résultats suggèrent un couplage du récepteur de l'ODN à l'AC et à la PLC et l'implication de la voie AC / AMPc / PKA / MEK-ERK dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN. **L'effet cytoprotecteur de l'ODN implique donc deux voies de transductions PKC et PKA (Figure 43).**

2. Effets différenciateur de l'ODN sur les cellules N2a

Nous avons poursuivi ces travaux en recherchant l'effet potentiel de l'ODN sur l'induction de la différenciation des lignées neuronale N2a vers un profil de neurone en générant des neurites axones et dendrites (Dasgupta & Milbrandt, 2007).

2.1. Effet de l'ODN sur l'induction de transformation morphologique de type neurone des cellules N2a

2.1.1. Évaluation de la différenciation neuronale induite par l'ODN : analyse par microscopie en contraste de phase

La différenciation neuronale des cellules N2a a été évaluée par la croissance des neurites en présence des concentrations croissantes d'ODN (10^{-16} – 10^{-10} M). L'acide rétinoïque (AR) a été utilisé comme contrôle positif compte de son effet stimulateur dans l'induction de différenciation (**Figure 45**). Pour cela les cellules N2a ont été préalablement cultivées pendant 24 h en milieu DMEM riche en glucose (4,5 g / L) avec de la glutamine et du pyruvate de sodium contenant 10 % de sérum de vœux foetal (SVF), puis traitées par l'ODN en solution dans un milieu de culture sans SVF (0 % SVF), avec 10 % SVF et 10 % SVF délipidé. Dans ces différentes conditions, les cellules N2a ont été cultivées pendant 48 h en absence ou en présence de concentrations croissantes d'ODN (10^{-16} – 10^{-10} M) (**Figure 44**).

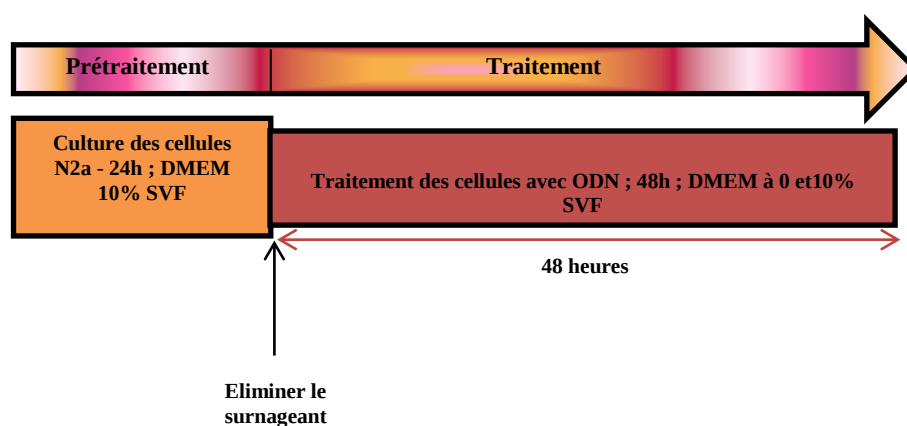


Figure 44 : Protocole expérimental utilisé pour évaluer l'effet différenciateur de l'ODN

La différenciation neuronale a été évaluée morphologiquement par microscopie inversé Zeiss (Primovert, Jena, Allemagne) à contraste de phase sur 20 images prises toujours au même endroit du support de culture couplé à une caméra Zeiss (5MP HD IP) équipant un microscope inversé Zeiss (Primovert, Jena, Allemagne) (**Figure 45**).

La différenciation cellulaire a été évaluée par l'apparition des neurites (**Figure 45**). La neurogenèse est quantifiée selon des critères morphologiques basés sur la présence des cellules différenciées avec axone et /ou en dendrites. Les résultats montrent que le taux de différenciation des N2a est différent pour les cellules traitées en absence ou en présence de SVF (**Figure 45**).

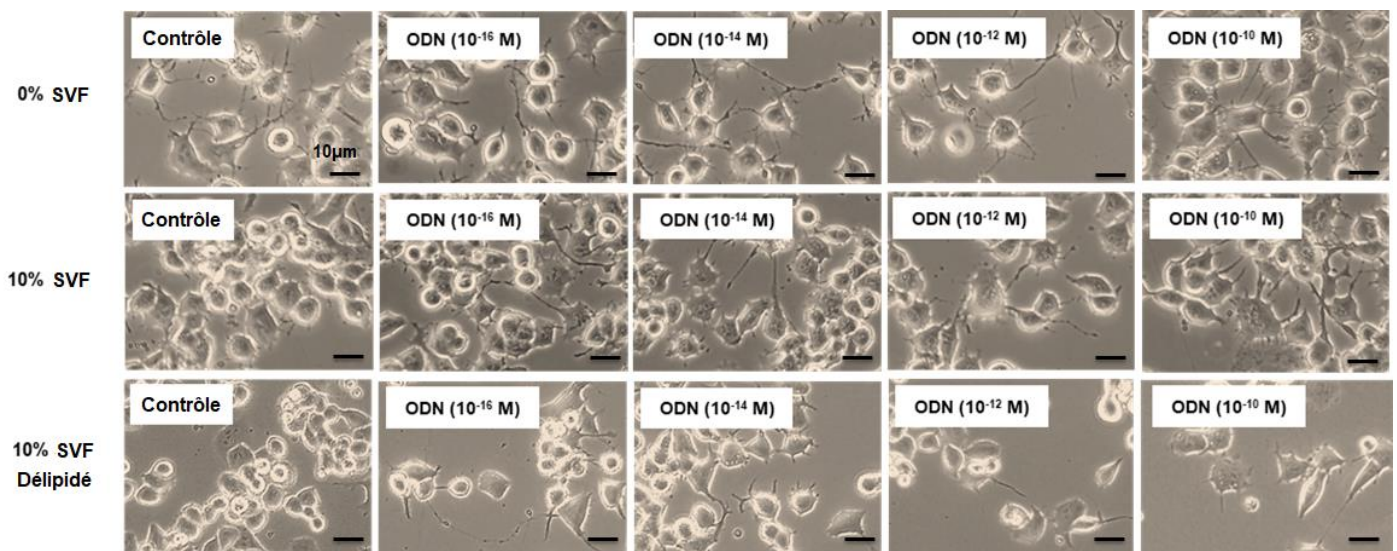


Figure 45 : Évaluation morphologique de la différenciation neuronale des cellules N2a traitées avec l'ODN. Les cellules neuronales murines N2a ont été incubées 48 h dans un milieu sans ou avec 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-16} – 10^{-10} M). Les observations ont été réalisées par microscopie de contraste de phase. Les cellules différenciées sont caractérisées par des neurites (dendrites et / ou axones).

Dans des conditions de milieu sans SVF, les pourcentages des cellules différenciées les plus élevés ~54% ont été observés avec l'ODN pour de très faibles concentrations de l'ordre subpicomolaire comprises entre 10^{-16} M et 10^{-14} M (**Figure 46A**).

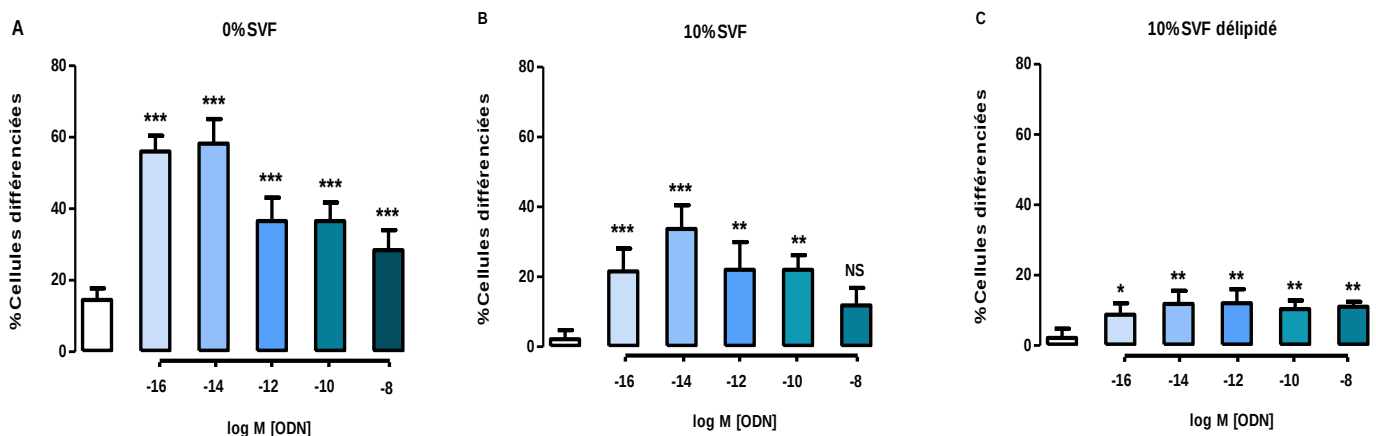


Figure 46: Quantification de la différenciation neuronale induite par l'ODN sur les cellules N2a. Les cellules N2a ont été incubées 48 h en DMEM (A, B et C) sans ou avec 10 % SVF, ou en présence de 10 % SVF délipidé respectivement, en absence ou en présence d'ODN (10^{-16} – 10^{-8} M). Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié à partir des photos prises au microscope à contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, ($n=4$) du pourcentage de cellules N2a différenciées. L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Ce pourcentage diminue en présence des concentrations plus importantes subnanomolaires d'ODN (10^{-12} M – 10^{-10} M) avec un pourcentage de l'ordre de 36 % ; ce dernier est de l'ordre de 28 % en présence d'ODN (10^{-8} M). Par conséquent, **l'ODN peut être considéré comme un agent différenciateur induisant la biogénèse de neurites.**

Le traitement des cellules N2a dans un milieu additionné par de SVF (10 %) et en présence d'ODN testé dans la même gamme de concentrations (10^{-16} – 10^{-8} M) réduit la capacité pro-différenciatrice de l'ODN **(Figures 45 et 46B).**

En raison de la réduction de différenciation en présence de SVF, nous avons voulu déterminer l'incidence des lipides sériques sur la différenciation cellulaire. Pour cela, les cellules N2a ont été traitées pendant 48 h en présence ou en absence d'ODN (10^{-16} – 10^{-8} M) dans un milieu avec 10 % SVF délipidé. Dans ces conditions, l'effet différenciateur de l'ODN (10^{-16} – 10^{-8} M) est encore réduit, ce qui confirme que les effets inhibiteurs du SVF sur la différenciation neuronale sont dus à des composés non lipidiques **(Figure 46C). Le sérum contient des composés non lipidiques qui diminuent l'efficacité différenciatrice de l'ODN.**

2.1.2. Classification des cellules N2a différenciées par l'ODN

L'ODN (10^{-14} M) induit une stimulation de la croissance des neurites et le taux de différenciation est plus ou moins élevé en absence ou en présence de SVF **(Figure 47).**

En absence de SVF, les cellules N2a traitées avec l'ODN montrent une différenciation principalement « dendritique » de l'ordre de 30 % **(Figure 47A)**. Quant aux cellules « axonales » et aux cellules présentant des « axones et des dendrites », elles sont d'environ 20 % et 14 %, respectivement. En présence de 10 % SVF, le pourcentage des cellules différenciées avec des prolongements dendritiques diminué et ne représentent que 17 % **(Figure 47B)** ; 6 % de cellules axonales et 4 % de cellules avec axones et des dendrites ont été observées **(Figure 47B).**

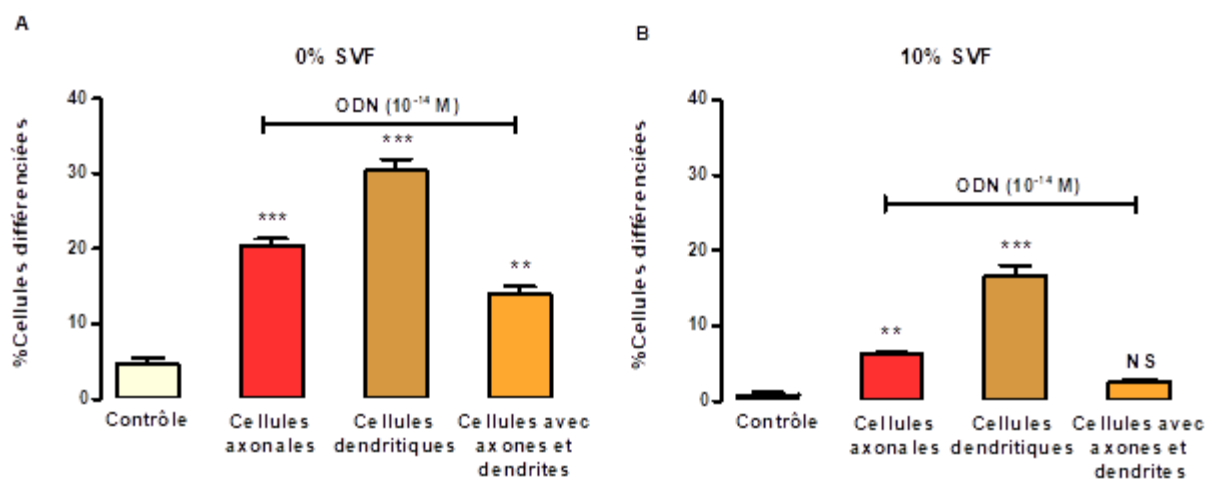


Figure 47 : Caractérisation et quantification des cellules neuronales différenciées (cellules avec dendrites, axones et dendrites + axones) par ODN. Les cellules N2a ont été incubées 48 h dans un milieu contenant ou non 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M). Les pourcentages de cellules axonales, dendritiques et les cellules avec des axones et des dendrites ont été quantifiés par microscopie à contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. **p<0.01 ; ***p<0.001; NS: non significatif par rapport au contrôle.

L'ODN est donc un inducteur de différenciation qui favorise la biogénèse de cellules différenciées de morphologie variable et qui peuvent être réparties en 3 grandes catégories : i) les cellules dites axonales présentant uniquement des neurites de longueur importante ; ii) les cellules dites dendritiques ayant uniquement des neurites de faible longueur et iii) les cellules caractérisées par la présence simultanée d'axones et de dendrites.

2.1.3. Utilisation de la sulforhodamine 101 pour l'identification des cellules N2a différenciées et la détermination des longueurs de neurites : analyse par microscopie en fluorescence

La formation des axones et des dendrites a été mise en évidence sur des critères morphologiques après coloration des protéines cellulaires par la sulforhodamine 101 (SR 101). La coloration avec la SR101 est bien adaptée à la visualisation et à l'observation des axones et / ou des dendrites. **En présence d'ODN (10^{-14} M), les cellules N2a différenciées montrent une croissance de neurites (dendrites et/ou axones) (Figure 48A)**

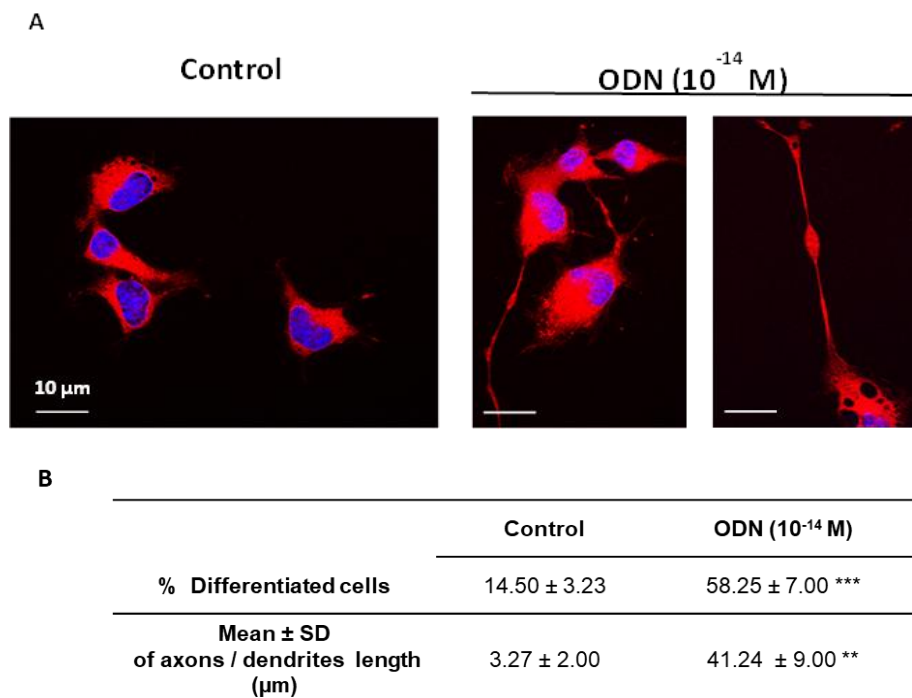


Figure 48 : visualisation des prolongements (axones et / ou des dendrites) sur les cellules N2a différenciées par ODN avec la sulforhodamine 101 (SR101). Les cellules ont été traitées pendant 48 h dans un milieu sans SVF en absence ou en présence ODN (10^{-14} M). Les cellules fixées (éthanol 70 %; 15 min; 4 ° C) ont été colorées avec SR101 (0,5 µg / mL; 30 min; 4°C). Les noyaux ont été contre-colorés avec le Hoechst 33342 (2 µg / mL). (A) Les images ont été acquises au microscope à fluorescence couplé à un Apotome (Zeiss). (B) Tableau indiquant le pourcentage de cellules différenciées N2a (cellules à axones longs ou dendrites) visualisées après coloration SR101. Analyse statistique: ANOVA suivie du test de Bonferroni: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Cellules traitées par ODN versus cellules non traitées (contrôle).

La coloration SR101 permet de déterminer la longueur des neurites en présence d'ODN (Figure 48B). L'ODN est donc un puissant inducteur de différenciation capable de stimuler la croissance des neurites.

2.2. Incidence de la différenciation neuronale induite par ODN sur la viabilité cellulaire

2.2.1. Incidence de la différenciation neuronale induite par ODN sur la croissance et la viabilité des cellules N2a

Il a été démontré que la différenciation cellulaire est dose-dépendante (Figure 46) suite à une réduction du pourcentage des neuroblastomes différenciés en présence des concentrations élevées d'ODN (10^{-12} - 10^{-8} M), ceci pourrait être dû à une diminution dose-dépendante de la croissance et/ou d'une réduction de la viabilité cellulaire révélée respectivement par un

comptage cellulaire au bleu de Trypan et une coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) (**Figure 49**).

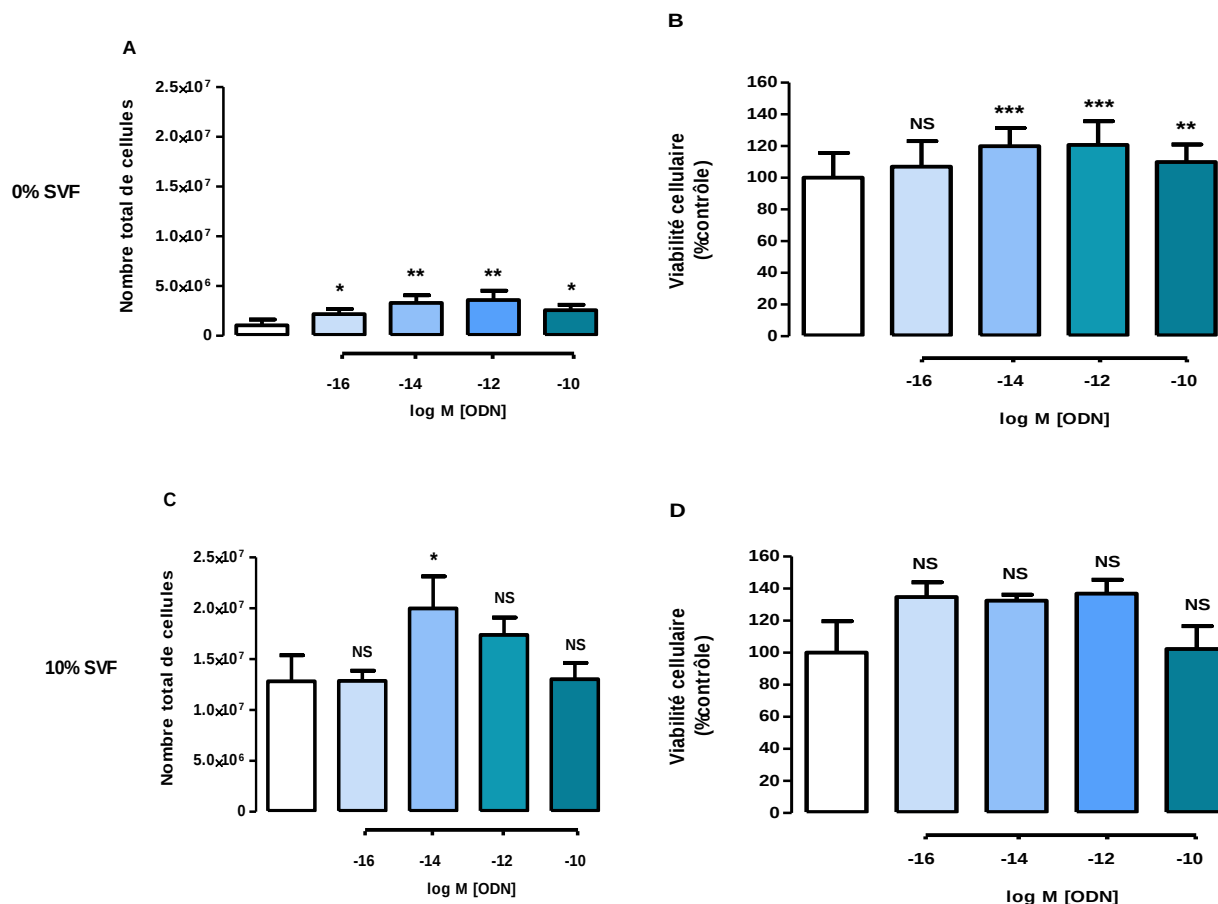


Figure 49 : Incidence de la différenciation neuronale induite par l'ODN sur la croissance et la viabilité des cellules N2a. Les cellules N2a ont été incubées 48 h dans un milieu contenant ou pas de 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-16} - 10^{-10} M). Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié à partir des photos prises en contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, ($n=4$). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

En absence de SVF, les neuroblastomes traités à différentes concentrations d'ODN (10^{-16} - 10^{-10} M) montrent une prolifération cellulaire assez faible mais reste plus importante par rapport au contrôle (**Figure 49A**). Cette réduction de l'aspect prolifératif des cellules N2a n'est pas due à la mort cellulaire, ceci a été bien démontré avec le test FDA montrant que le pourcentage de cellules vivantes est égal à 100 % (**Figure 49B**). En revanche, en présence de 10 % SVF, les neuroblastomes N2a traités par ODN (10^{-16} M - 10^{-10} M) montrent une prolifération particulièrement importante avec ODN (10^{-14} M) (**Figure 49C**) accompagnée par une viabilité cellulaire marquante qui désigne une différenciation qualifiée sans toxicité

(Figure 49D). Par conséquent, en absence ou en présence de 10 % SVF, **le neuropeptide ODN est capable de déclenché une différenciation non toxique.**

La morphologie, la confluence et l'adhésion des cellules N2a ont été mises en évidence en utilisant le Crystal violet qui permet la visualisation des noyaux ainsi que l'évaluation de la confluence cellulaire. En effet, après 48 h de traitement en présence ou en absence de la concentration différenciatrice et cytoprotectrice d'ODN (10^{-14} M) et/ou de l'acide rétinoïque (AR : 6.25 et 25 μ M) qui est utilisé comme contrôle positif, dans un milieu contenant ou pas 10 % SVF, respectivement, les cellules N2a ont été colorées au Crystal violet (Figure 50A).

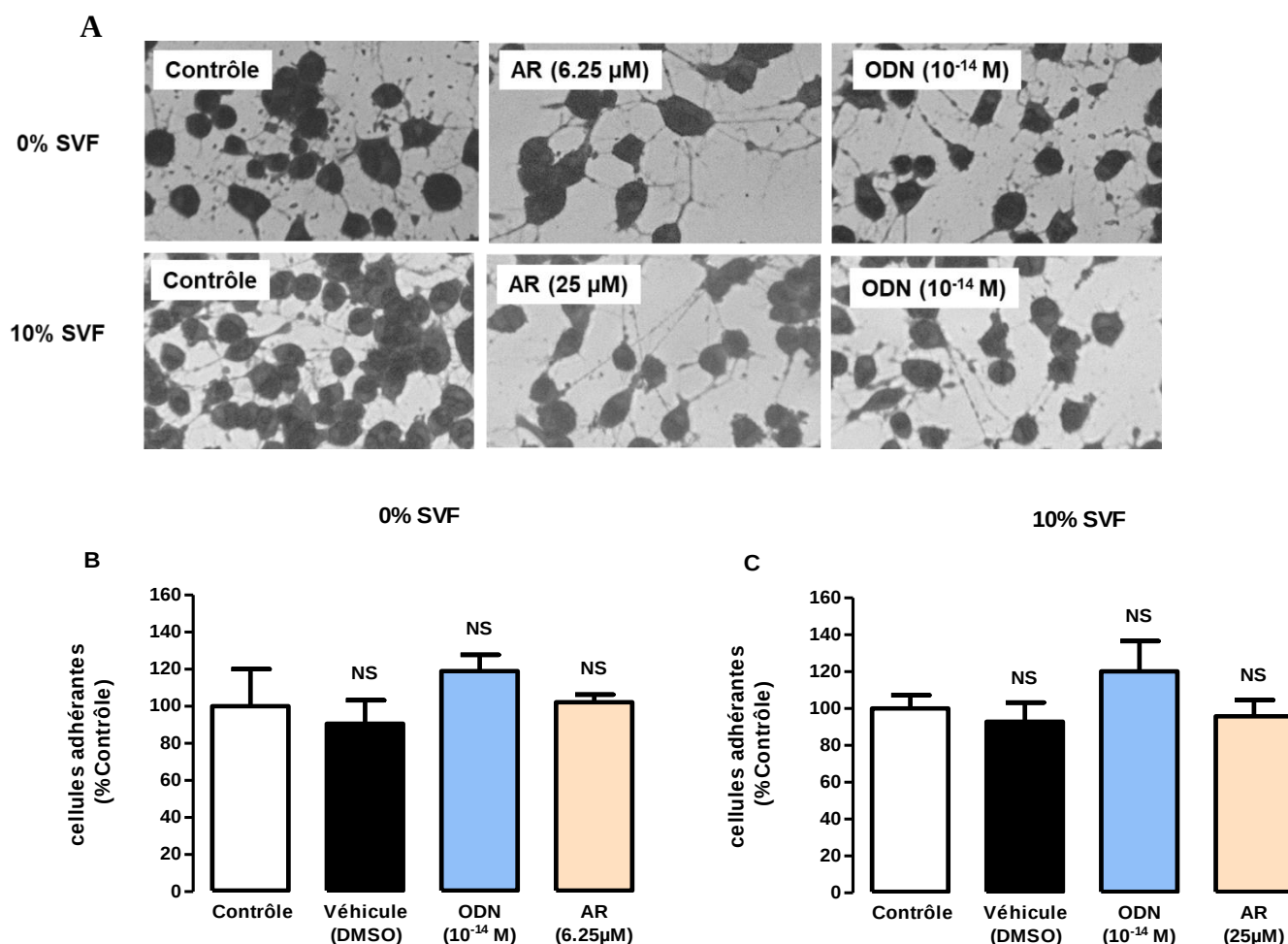


Figure 50 : Incidence de la différenciation induite par ODN sur l'adhésion et la confluence des cellules N2a. Les cellules N2a incubées 48 h dans un milieu contenant ou pas 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M) et/ou AR (6.25 μ M; 0 % SVF) ou AR (25 μ M ; 10 % SVF). La morphologie des neuroblastomes a été observée par coloration au Crystal violet (A). Le pourcentage de cellules adhérentes est présenté en pourcentage du contrôle (B, C). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a

été réalisée par un test ANOVA suivie du test de Bonferroni. NS: non significatif par rapport au contrôle.

La différenciation et l'adhésion neuronale induite par le neuropeptide ODN (10^{-14} M) et/ou l'AR (6.25 et 25 μ M) ont été, premièrement, évaluées morphologiquement par microscopie à contraste de phase à l'aide d'une caméra Zeiss (**Figure 50A**). L'adhésion cellulaire a été mesurée par lecture de la DO avec lecteur de plaque (**Figure 50B et C**).

Les résultats obtenus confirment qu'en absence ou en présence de 10 % SVF, l'adhésion des neuroblastomes est la même avec ODN (10^{-14} M), AR (6.25 et 25 μ M) et est comparable aux cellules de contrôle (**Figure 50**).

2.2.2. Incidence de la différenciation neuronale induite par ODN sur l'intégrité de la membrane plasmique

L'intégrité membranaire des cellules différenciées par l'ODN (10^{-14} M), l'AR (6.25 μ M ; 0 % SVF) et l'AR (25 μ M ; 10 % SVF) a été évaluée avec l'iodure de propidium (IP) permettant d'examiner et de mettre en évidence les effets protecteurs et différenciateurs de l'ODN sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique.

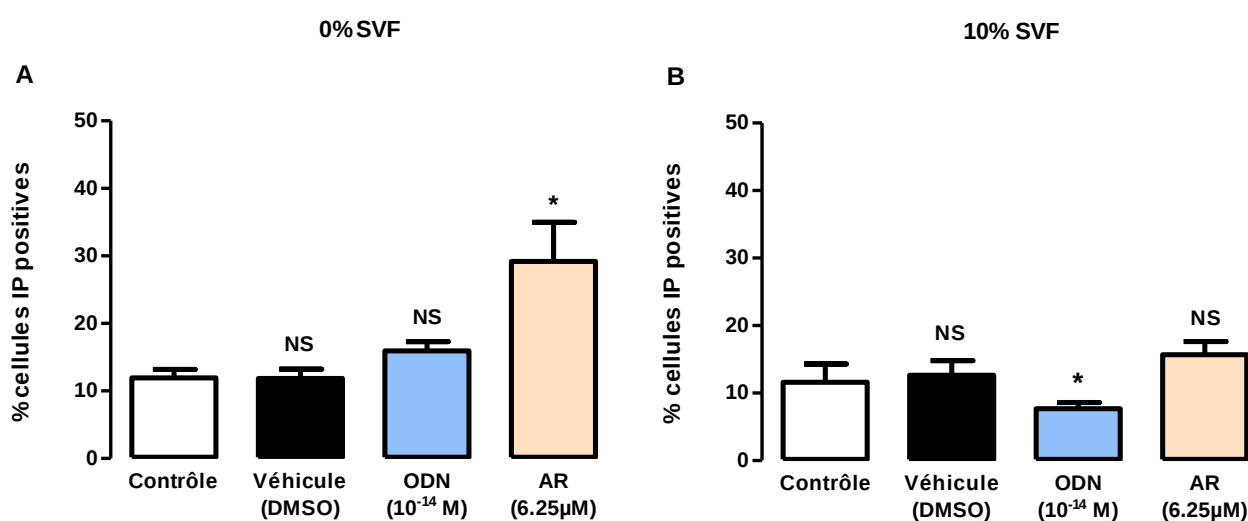


Figure 51 : Incidence de la différenciation induite par ODN sur l'intégrité de la membrane plasmique. Les cellules N2a ont été incubées 48 h dans un milieu contenant ou pas 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M) et/ou AR (6.25 μ M; 0 % SVF) ou AR (25 μ M ; 10 % SVF). (A) milieu sans SVF (0 % SVF), (B) milieu avec 10 % SVF. Les résultats sont présentés en pourcentage de l'IMF (intensité moyenne de fluorescence). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. * $p < 0.05$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Les cellules N2a ont été incubées en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) dans un milieu avec ou sans 10 % SVF et/ou de l'AR (6.25 μ M ; 0 % SVF) ou (25 μ M ; 10 % SVF). Après 48 h de traitement, une coloration à l'IP a été réalisée sur les cellules mises en suspension. Les résultats ont été quantifiés par cytomètre en flux (**Figure 51**).

En absence de SVF, les cellules N2a incubées pendant 48 h en présence d'AR (6.25 μ M) indiquent une augmentation légèrement significative de la moyenne d'intensité de fluorescence (~29 %) alors que les cellules traitées avec de l'ODN (10^{-14} M) ne présentent que (~15 %) de la population des cellules IP positives (**Figure 51A**). Par ailleurs, une diminution du pourcentage de cellules IP positives a été observée sur neuroblastomes murins incubées en présence d'AR (25 μ M) dans un milieu contenant 10 % SVF (**Figure 51B**) présentant un pourcentage de (~16 %). Le pourcentage de cellules IP positives en présence d'ODN (10^{-14} M) est semblable à celui du contrôle dans les deux conditions de milieu (0 % SVF et 10 % SVF) (**Figure 51**). **L'ODN induit donc une différenciation cellulaire sans induire de toxicité.**

2.3. Incidence de la différenciation neuronale induite par ODN sur la surproduction de peroxyde d'hydrogène et d'anions superoxyde

L'acide rétinoïque est un inducteur puissant de la différenciation cellulaire induisant l'arrêt de la croissance et stimulant à forte concentration la mort par apoptose (**Tekedereli I et al., 2019**). Par conséquent et afin d'évaluer les effets cytoprotecteurs et différenciateurs de l'ODN par rapport à l'effet différenciateur toxique de l'AR, les cellules N2a traitées pendant 48 h en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) ou d'AR (6.25 μ M) dans un milieu sans SVF, ont été ensuite incubées en présence de deux fluorochromes, la Dihydrorhodamine 123 (DHR123) et la Dihydroéthidine (DHE), permettant de révéler respectivement la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'anions superoxyde ($O_2^{\circ-}$) (**Figure 52**). L'intensité de fluorescence a été mesurée et analysée par cytométrie en flux (**Figure 52**). Le traitement des cellules N2a avec l'AR (6.25 μ M) pendant 48 h induit une augmentation de ~45 % de l'intensité de fluorescence DHE, alors que le traitement des N2a par ODN (10^{-14} M) d' $O_2^{\circ-}$ ne provoque pas l'augmentation de la fluorescence DHE et donc l'accumulation d' $O_2^{\circ-}$ (**Figure 52A**). Par ailleurs, une légère augmentation de peroxyde d'hydrogène est observée sur les cellules traitées avec AR (6.25 μ M). L'ODN (10^{-14} M) diminue la production de peroxyde d'hydrogène évalué par coloration avec la DHR123 (**Figure 52B**).

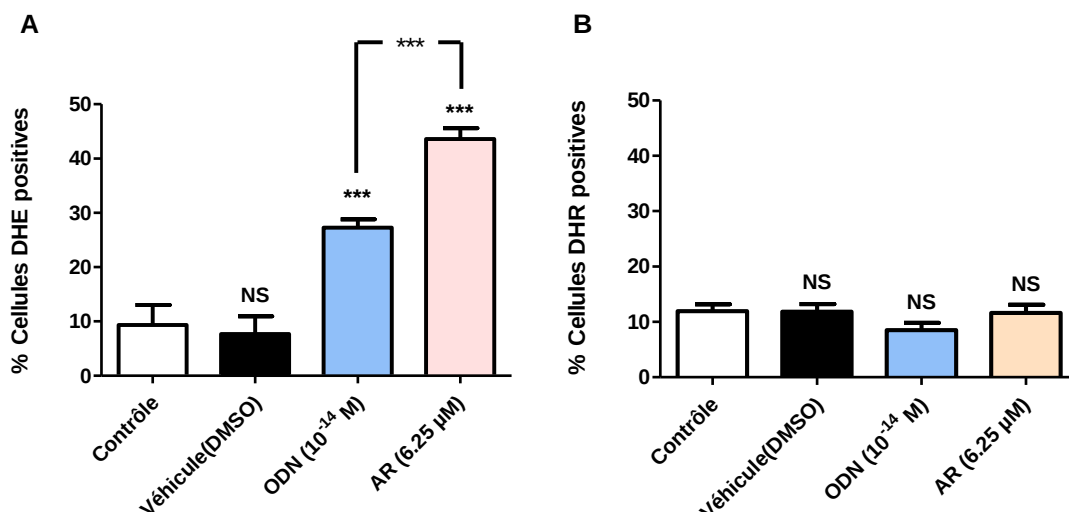


Figure 52: Mesure de la production des espèces réactives de l'oxygène. Les cellules N2a ont été prétraitées 10 min en présence ou absence d'ODN (10^{-14} M) avec ou sans H_2O_2 (300 μ M). Après 1 h de traitement, deux colorations indépendantes ont été réalisées ; (A) une coloration à la DHE et (B) une coloration à la DHR123 permettant de quantifier respectivement $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 . L'analyse a été réalisée par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules fluorescentes. Chaque valeur représente la moyenne du pourcentage de cellules fluorescentes $\pm$ SEM, (n=5). ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Le traitement des cellules N2a avec l'AR (6.25 μ M) pendant 48 h induit une augmentation de ~45 % de l'intensité de fluorescence DHE, alors que le traitement des N2a par ODN (10^{-14} M) a quasiment bloqué la production d' $O_2^{\circ-}$ (**Figure 53A**). Par ailleurs, une légère augmentation de peroxyde d'hydrogène est observée sur les cellules traitées avec AR (6.25 μ M). L'ODN (10^{-14} M) diminue la production de peroxyde d'hydrogène évalué par coloration avec la DHR123 (**Figure 53B**). **L'ODN s'oppose à la production d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène.**

2.4. Impact de la différenciation neuronale induite par l'ODN sur l'activité des organites (lysosome, mitochondrie)

2.4.1. Impact de la différenciation neuronale induite par ODN sur l'intégrité lysosomale

Les cellules N2a ont été pré-traitées en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) et/ou AR (6.25 μ M ; 0 % SVF) et AR (25 μ M ; 10 % SVF). Après 48 h de traitement une coloration à l'AO a été effectuée sur les cellules. Les résultats obtenus révèlent une absence de différence significative entre le contrôle et les cellules traitées 48 h par ODN (10^{-14} M). En revanche, dans un milieu dépourvu de SVF, les cellules N2a traitées avec AR (6.25 μ M) montrent une

déstabilisation fortement significative des lysosomes. Ainsi le pourcentage des cellules avec lysosomes déstabilisés est ~28 %, alors que les cellules différenciées avec ODN (10^{-14} M) ne constituent que ~7 % (**Figure 53A**). Par ailleurs, les cellules N2a traitées dans un milieu avec 10 % SVF ne montrent aucune différence significative des cellules avec lysosomes déstabilisés (**Figure 53B**).

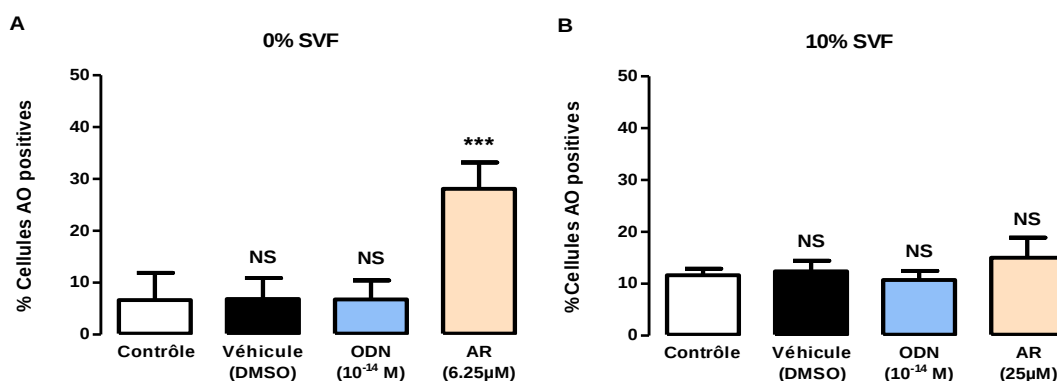


Figure 53 : Incidence de la différenciation induite par ODN sur l'intégrité lysosomale. Les cellules N2a ont été incubées 48 h dans un milieu contenant ou pas du 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M) et/ou AR (6.25 μ M; 0 % SVF) ou AR (25 μ M ; 10 % SVF). (A) milieu sans SVF (0 % SVF), (B) milieu avec 10 % SVF. Les résultats sont présentés en pourcentage de l'IMF (intensité moyenne de fluorescence). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. ***p<0.001; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Par conséquent, l'ODN ne modifie pas l'intégrité lysosomale au cours de la différenciation des N2a.

2.4.2. Impact de la différenciation induite par ODN sur le potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$)

Les cellules N2a ont été prétraitées en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) et/ou AR (6.25 μ M ; 0 % SVF) et AR (25 μ M ; 10 % SVF). Le $\Delta\Psi_m$ a été évalué après 48 h de traitement par une coloration au DiOC₆(3) effectuée sur les cellules mises en suspension. L'analyse des résultats est réalisée par cytométrie en flux (**Figure 54**).

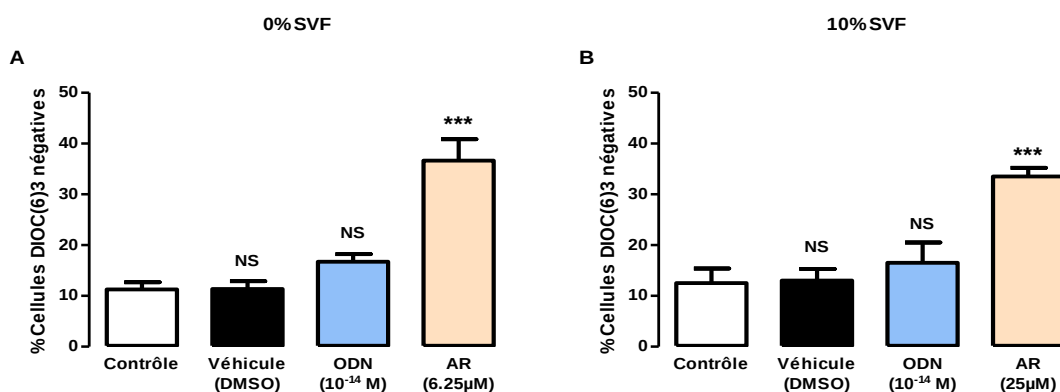


Figure 54 : Incidence de la différenciation induite par ODN sur le potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). Les cellules N2a incubées 48 h dans un milieu contenant ou pas 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M) et/ou AR (6.25 μ M; 0 % SVF) ou AR (25 μ M ; 10 % SVF). (A) milieu sans SVF (0 % SVF), (B) milieu avec 10 % SVF. Les résultats sont présentés en pourcentage de l'IMF (intensité moyenne de fluorescence). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. *** $p < 0.001$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

Ces résultats indiquent que l'ODN ne modifie pas les pourcentages de cellules avec des mitochondries dépolarisées au cours de la différenciation. On peut en conclure que l'ODN n'a pas d'incidence sur $\Delta\Psi_m$.

2.5. Incidence de la différenciation neuronale sur la répartition cellulaire des mitochondries et des peroxysomes

2.5.1. Évaluation par microscopie à fluorescence de l'effet de l'ODN sur la topographie des mitochondries et des péroxysomes

En raison du pouvoir puissant de l'ODN dans la différenciation et la cytoprotection, nous avons recherché l'effet de l'ODN sur la dynamique, la biogenèse des organites et le métabolisme énergétique et lipidique à savoir mitochondrie et peroxysome. La mitochondrie est souvent décrite comme « centre énergétique » pour les cellules, par la génération de l'ATP à travers la β -oxydation, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire. La mitochondrie avec son pouvoir énergétique joue un rôle crucial dans la neurogenèse et la différenciation neuronale ainsi que les processus de neurodégénérescence en cas de dysfonctionnement (Berger *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2018). Nous avons ainsi étudié l'impact de l'ODN sur la distribution des

mitochondries et des peroxysomes dans les principaux compartiments cellulaires (corps cellulaire (ou soma) et neurites (axones / dendrites)).

La topographie de la mitochondrie et du peroxysome a été évaluée sur des cellules N2a incubées pendant 48 h dans du DMEM sans SVF (0 % SVF), en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M), par microscopie à fluorescence (détection simultanée des mitochondries avec MitoTracker Red et du peroxysome par immunofluorescence indirecte avec un anticorps dirigé contre un transporteur peroxysomal (ABCD3). ABCD3 est un constituant majeur de la membrane péroxysomale.

Les observations réalisées au microscope à fluorescence couplé à un Apotome ont permis de détecter les mitochondries, colorées en rouge (MitoTracker Red), et les péroxysomes, colorés en vert (ABCD3 révélé avec Alexa 488). Dans ces conditions de coloration et d'observation, les taches rouges sont considérées comme des mitochondries, les taches vertes comme des peroxysomes et les taches jaunes comme des mitochondries et des peroxysomes étroitement liés (co-localisés). Au microscope, la co-localisation donne un signal fluorescent jaune (rouge + vert) (**Figure 55**). Dans les cellules non traitées (contrôle), aucun axone, ni dendrite n'a été observé ; des points rouges, verts et jaunes ont été détectés dans le cytoplasme et sont respectivement indiqués par des flèches rouges, vertes et jaunes (**Figure 55A**).

Dans les cellules traitées par l'ODN, de très longs axones ou dendrites, pouvant atteindre une longueur de 50 μ m et plus, ont été observés non seulement dans le cytoplasme du corps cellulaire mais tout le long de l'axone / dendrite ; plusieurs mitochondries (fluorescence rouge) et peroxysomes (fluorescence verte) ont été détectés. Des points jaunes (co-localisation mitochondries et peroxysomes) ont également été révélées (**Figure 55B**). Ces résultats indiquent que **la différenciation neuronale induite par l'ODN est associée à une croissance de neurites (axones et dendrites) contenant des mitochondries et des péroxysomes isolés ainsi que des organites (mitochondrie, peroxysome) co-localisées étroitement interconnectées principalement détectées dans le corps cellulaire (soma) et dans les neurites.**

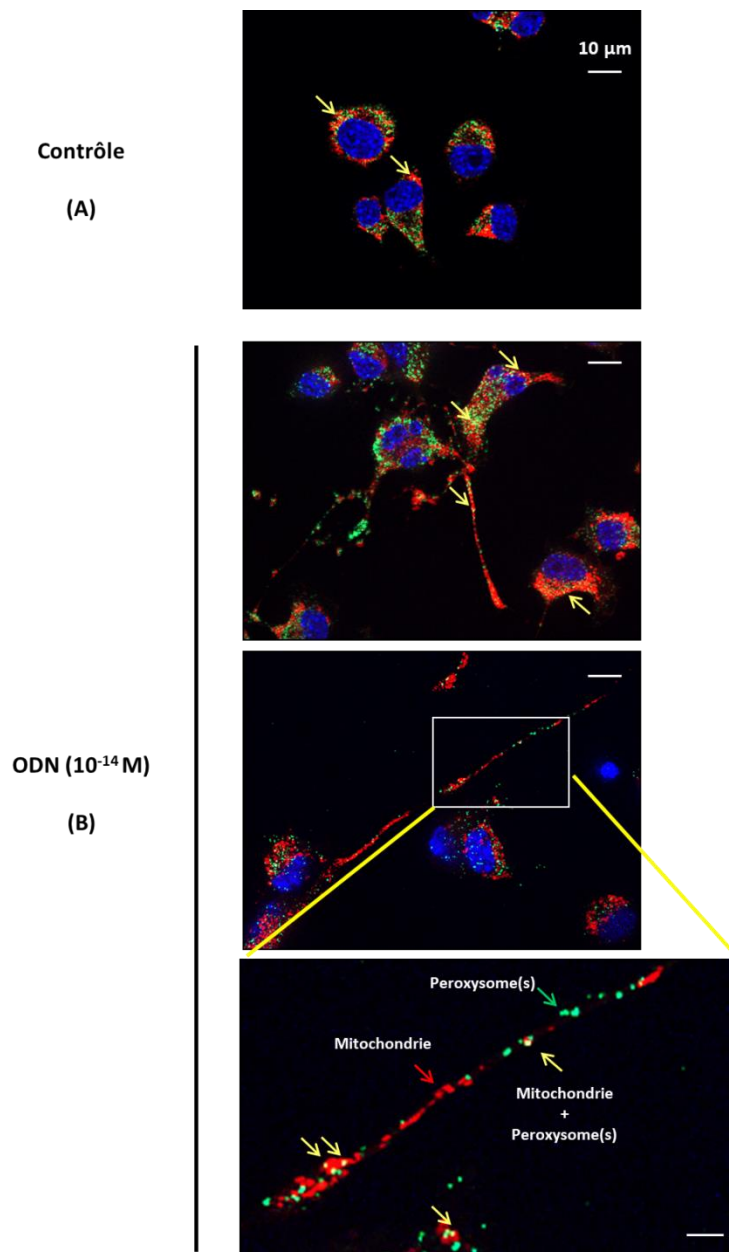


Figure 55: Induction de la différenciation neuronale des cellules N2a par l'ODN. La visualisation des mitochondries a été réalisée avec le MitoTracker Red (fluorescence rouge) et celle des peroxysomes par immunofluorescence indirecte après coloration avec un anticorps dirigé contre le transporteur du peroxysome *Abcd3* révélé par l'Alexa-488 (fluorescence verte). Les noyaux ont été contre-colorés avec le Hoechst 33342 (2 μ g / mL). Les images ont été acquises au microscope à fluorescence couplé à un Apotome (Zeiss). Cellules N2a incubées pendant 48 h dans du DMEM sans SVF (0 % SVF). (A) Cellules de contrôle, (B) Cellules traitées avec ODN (10^{-14} M).

2.5.2. Évaluation de l'effet de l'ODN sur la topographie des mitochondries et des peroxysomes dans des cellules N2a différenciées par microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est une méthode appropriée qui permet l'identification des organites fournissant des informations sur le nombre, la taille, la forme et la topographie des mitochondries et des péroxysomes. Ces paramètres reflètent l'activité cellulaire (Depreter *et al.*, 2003 ; Nury *et al.*, 2018). Dans la présente étude, les mitochondries et les peroxysomes ont été détectés simultanément par MET en utilisant la procédure de coloration DAB sur des cellules N2a traitées pendant 48 h dans du DMEM sans SVF (0 % SVF), en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M).

Les cellules non traitées (contrôle) (Figures 56A et B), les peroxysomes apparaissent souvent accumulés en grappes dans une zone particulière du cytoplasme du soma (Figure 56A) ainsi qu'au voisinage des mitochondries (Figure 56B). Ces péroxysomes sont des structures sphériques homogènes d'un diamètre d'environ 0,1 μm (Figure 56B). En revanche, les cellules différenciées par ODN (10^{-14} M) sont caractérisées par la présence de neurites (axones / dendrites) pouvant atteindre 50 μm et plus (Figure 56C et D). Il est donc difficile d'observer simultanément le soma et l'axone sur le même champ microscopique et sur la même partie de la grille d'observation. En outre, sur ces cellules, des mitochondries et des peroxysomes ont été détectés simultanément dans le soma (Figures 57C et G). Les deux organites sont simultanément présents à différents niveaux de l'axone, y compris le bouton terminal (Figures 57D, E et F), et leurs caractéristiques morphologiques est similaires à celles des cellules non traitées (contrôle) qui sont des cellules indifférenciées ou des neuroblastes. **Les peroxysomes conservent donc la même structure sphérique dont le diamètre est d'environ 0.1 μm dans les cellules traitées ou non par l'ODN (10^{-14} M).**

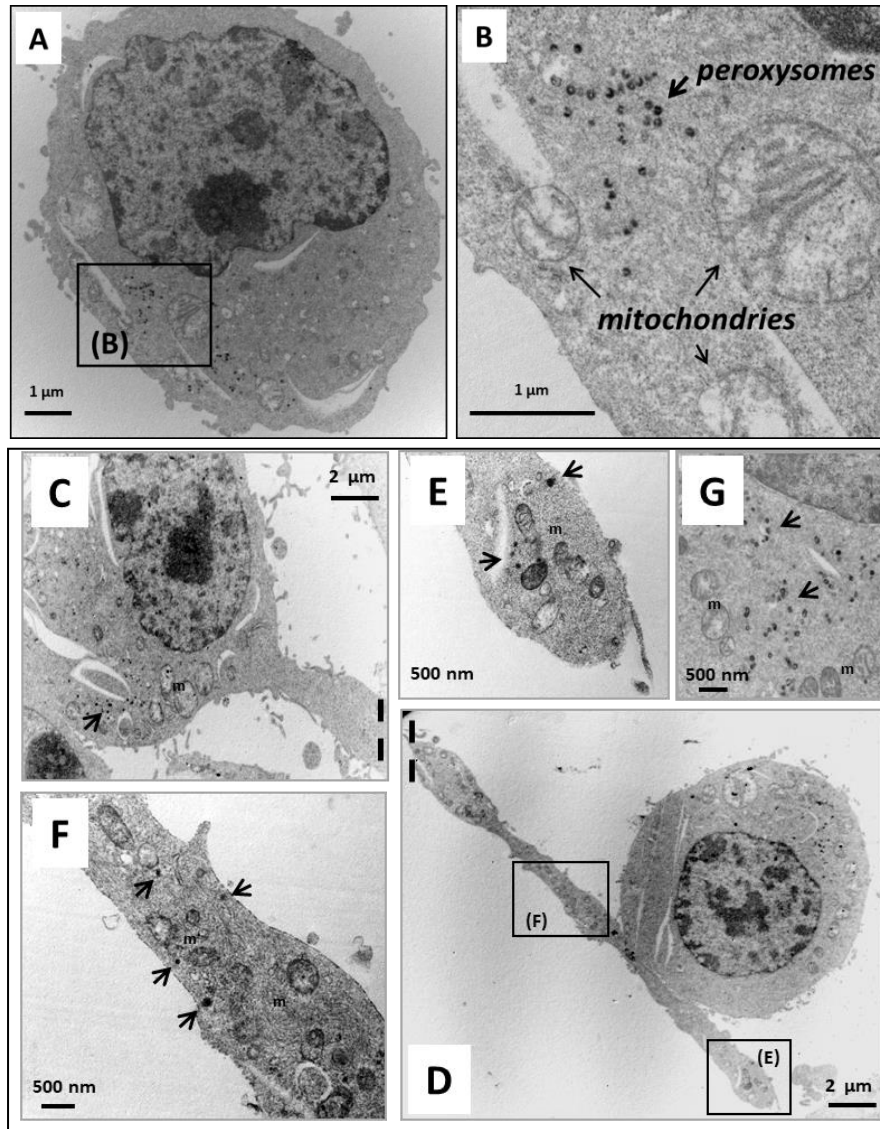


Figure 56 : Visualisation par microscopie électronique à transmission des mitochondries et des peroxysomes dans des cellules N2a différenciées par l'ODN. Les cellules N2a ont été traitées pendant 48 h dans un milieu sans SVF. Les préparations ont été colorées à la DAB pour visualiser les péroxysomes. Dans les cellules N2a non traitées (A, B), les péroxysomes isolés sont peu détectés dans le cytoplasme, tandis que des groupes de péroxysomes souvent présents sont co-localisés avec plusieurs mitochondries (A). La taille des péroxysomes est $\sim 0,1 \mu\text{m}$ (B). Dans les cellules N2a traitées par l'ODN (10^{-14} M), les péroxysomes isolés sont rarement détectés, alors que des groupes de péroxysomes sont majoritairement observés (C, G) dont la taille des péroxysomes est $\sim 0,1 \mu\text{m}$ (G). En raison de la grande longueur des neurites (axones et dendrites), ces structures sont souvent séparées du soma (corps cellulaire) (C: soma; F: axone / dendrite). La présence simultanée de mitochondries (m) et de peroxysome (flèche noire; taille d'environ $0,1 \mu\text{m}$) est révélée dans différentes zones des neurites (D, E).

2.6. Evaluation des récepteurs et des voies de signalisations associés à l'effet différenciateur de l'ODN

2.6.1. Evaluation des activités d'analogues structuraux de l'ODN sur la différenciation neuronale des cellules N2a

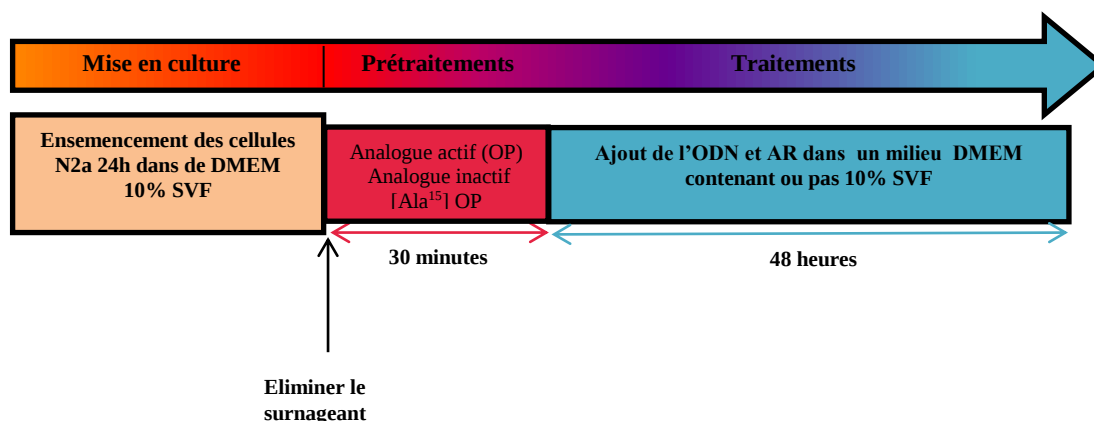


Figure 57 : Protocole expérimental évaluant l'effet différenciateur de l'ODN et des analogues structuraux

Les cellules N2a ont été traitées selon le modèle protocolaire (**Figure 57**). Les résultats obtenus montrent qu'en absence ou en présence de 10 % SVF, l'action différenciatrice de l'ODN est identique à celle de l'agoniste du récepteur métabotrope OP (0,1 nM) avec une valeur égale à (~38 % ; 0 % SVF) et (~29 % ; 10 % SVF) de cellules N2a différenciées ; la viabilité n'est pas affectée par OP (**Figure 58**). Contrairement à l'ODN (10^{-14} M) et à l'OP, [Ala¹⁵] OP ne présente aucun effet différenciateur sur les cellules N2a traitées sans ou avec 10 % SVF ; [Ala¹⁵] OP n'affecte pas non plus la viabilité (**Figure 58**). Ces résultats montrent que **l'effet différenciateur de l'ODN fait intervenir un récepteur spécifique de l'ODN.**

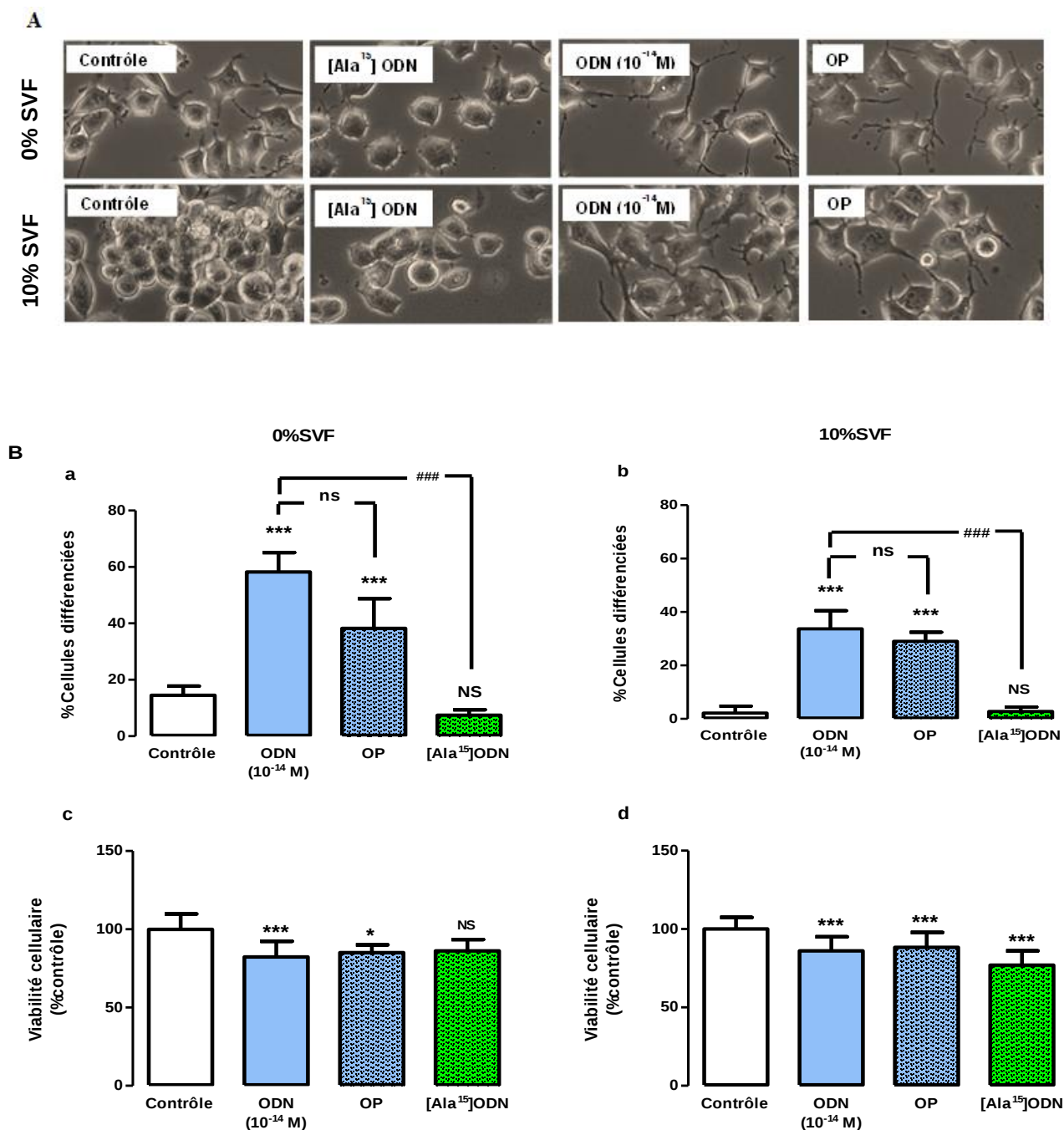


Figure 58: Evaluation de l'effet différenciateur de l'ODN. Les cellules N2a ont été pré-incubées 30 min en présence ou en absence de l'agoniste du récepteur métabotrope OP (0,1 nM) ou de l'analogue inerte de l'ODN; [Ala¹⁵] ODN, et ensuite incubées 48 h dans un milieu contenant ou pas 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M). (A) Des images ont été réalisées par microscopie en contraste de phase. (B) Pourcentages de cellules N2a différenciées dans un milieu avec ou sans 10 % SVF (a, b), quantifiés à partir d'images prise en microscopie à contraste de phase. La viabilité cellulaire a été quantifiée par la mesure de l'intensité de fluorescence du FDA, et les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle correspondant (c, d). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ### $p < 0.001$ NS: non significatif par rapport au contrôle ; ns : non significatif par rapport ODN (10^{-14} M).

2.6.2. Caractérisation pharmacologique des récepteurs impliqués dans l'effet différenciateur de l'ODN

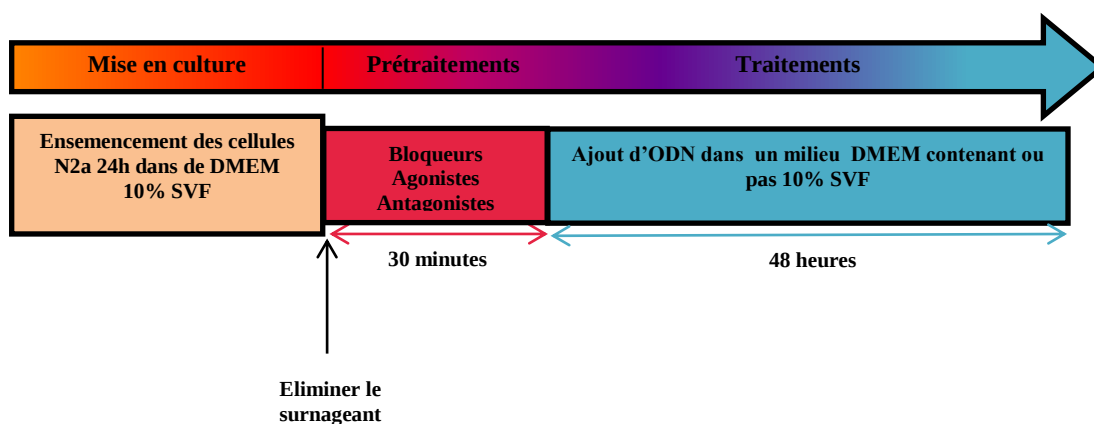


Figure 59: Protocole expérimental évaluant les récepteurs et les voies de signalisations impliqués dans l'effet différenciateur de l'ODN

Les cellules N2a ont été incubées 30 min en présence ou en absence de l'antagoniste des récepteurs métabotropiques ; cyclo₁₋₈ [DLeu⁵] OP ou l'antagoniste des récepteurs CBR ; le flumazénil, dans un milieu avec ou sans 10 % SVF (**Figure 59**). En absence de SVF et après 48 h, les cellules N2a pré-incubées avec l'antagoniste cyclo₁₋₈ [DLeu⁵] OP ou l'antagoniste des récepteurs CBR montrent une diminution fortement significative du pourcentage de différenciation par rapport aux cellules de contrôle (**Figure 60A**). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle **l'effet différenciateur de l'ODN fait intervenir un récepteur spécifique de l'ODN**.

De plus, en présence de 10 % SVF, on observe un blocage de différenciation en présence du Flumazénil (antagoniste des CBR) alors qu'en présence de cyclo₁₋₈ [DLeu⁵] OP, aucune différence n'a été enregistrée. Dans ces conditions, la différenciation neuronale induite par ODN (10^{-14} M) n'a pas été réduite avec l'antagoniste des récepteurs métabotropiques (**Figure 60B**). Ceci prouve que **l'activité différenciatrice induite par l'ODN (10^{-14} M) nécessite toujours les récepteurs CBR** en absence ou en présence de 10 % SVF (**Figure 60**).

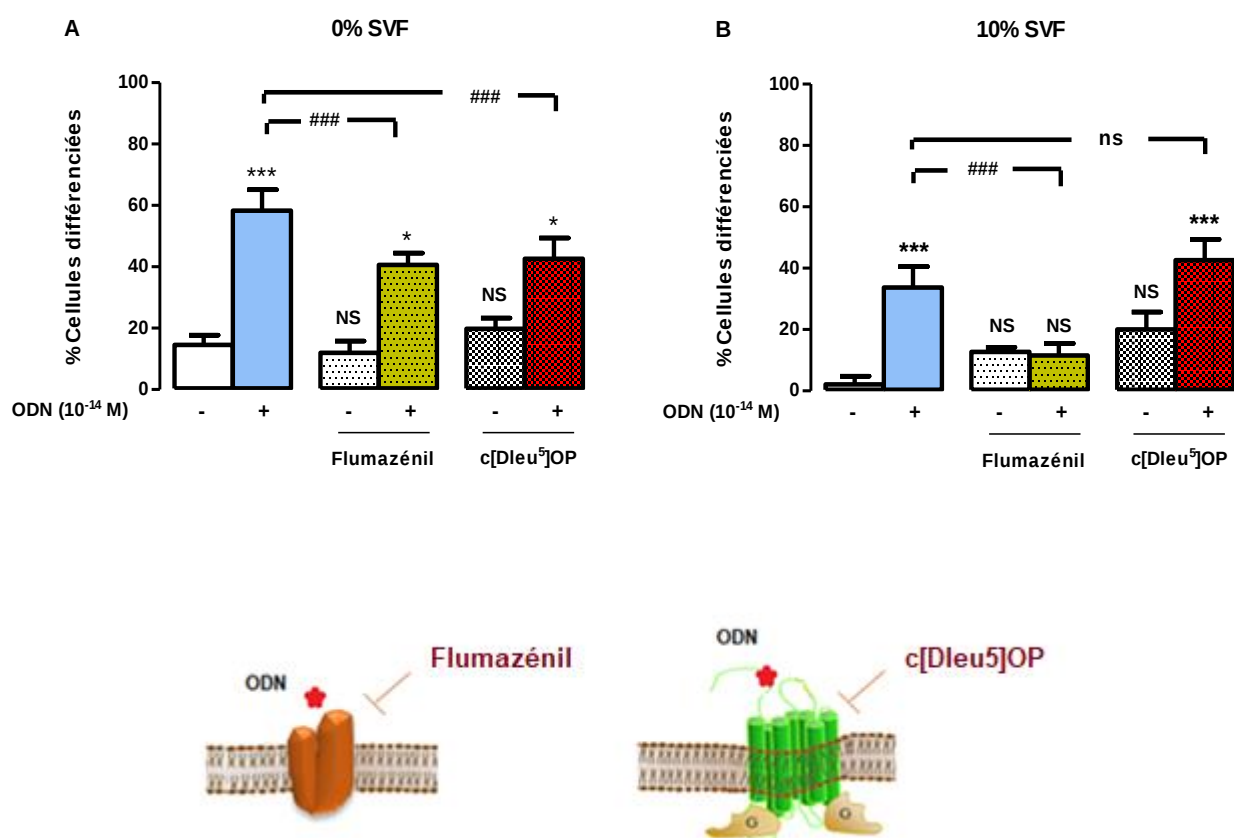


Figure 60: Caractérisation pharmacologique des récepteurs impliqués dans l'effet différenciateur de l'ODN. Les cellules N2a ont été pré-incubées 30 min en présence ou absence de l'agoniste des récepteurs métabotropique cyclo₁₋₈ [DLeu⁵] OP (1 μ M) ou l'agoniste des CBR le flumazénil (1 μ M). Après 48h de traitement en absence ou en présence d'ODN (10⁻¹⁴ M) dans un milieu sans SVF (0 % SVF) (A) ou avec 10 % SVF (B). Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié à partir des photos en contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. *p<0.05 ; ***p<0.001; ###p<0.001 ; NS: non significatif par rapport au contrôle ; ns : non significatif par rapport à l'ODN (10⁻¹⁴ M).

2.6.3. Caractérisation des voies de signalisation impliquées dans l'effet différenciateur de l'ODN

Nous avons ensuite recherché à identifier la voie de signalisation impliquée dans l'effet différenciateur de l'ODN sur les neuroblastomes murins N2a (**Figure 61**). Des travaux antérieurs ont mis en évidence l'existence d'un couplage du récepteur métabotropique à la voie de transduction de la PLC / PKC et A / PKA (**Figure 61**). Nous avons étudié la capacité de l'inhibiteur de PLC (U73122) et du bloqueur de protéine kinase C (PKC) (chélérythrine) à inhiber l'action de l'ODN (**Figure 61**). Ces deux inhibiteurs ont totalement bloqué l'action différenciatrice de l'ODN (10⁻¹⁴ M). Le blocage de l'activité de la protéine kinase A (PKA) par H89 ou de la voie des mitogènes MEK-ERK par U0126, abolit aussi l'effet de l'ODN sur la

différenciation des N2a (**Figure 61**). Ces résultats montrent un **couplage du récepteur de l'ODN à l'adénylyl cyclase (AC)** et l'**implication de la voie AC /AMPc /PKA /MEK-ERK dans l'effet différenciateur de l'ODN**. Par conséquent, l'effet différenciateur de l'ODN (10^{-14} M) fait intervenir les deux voies de transductions PKC et PKA (**Figure 61**).

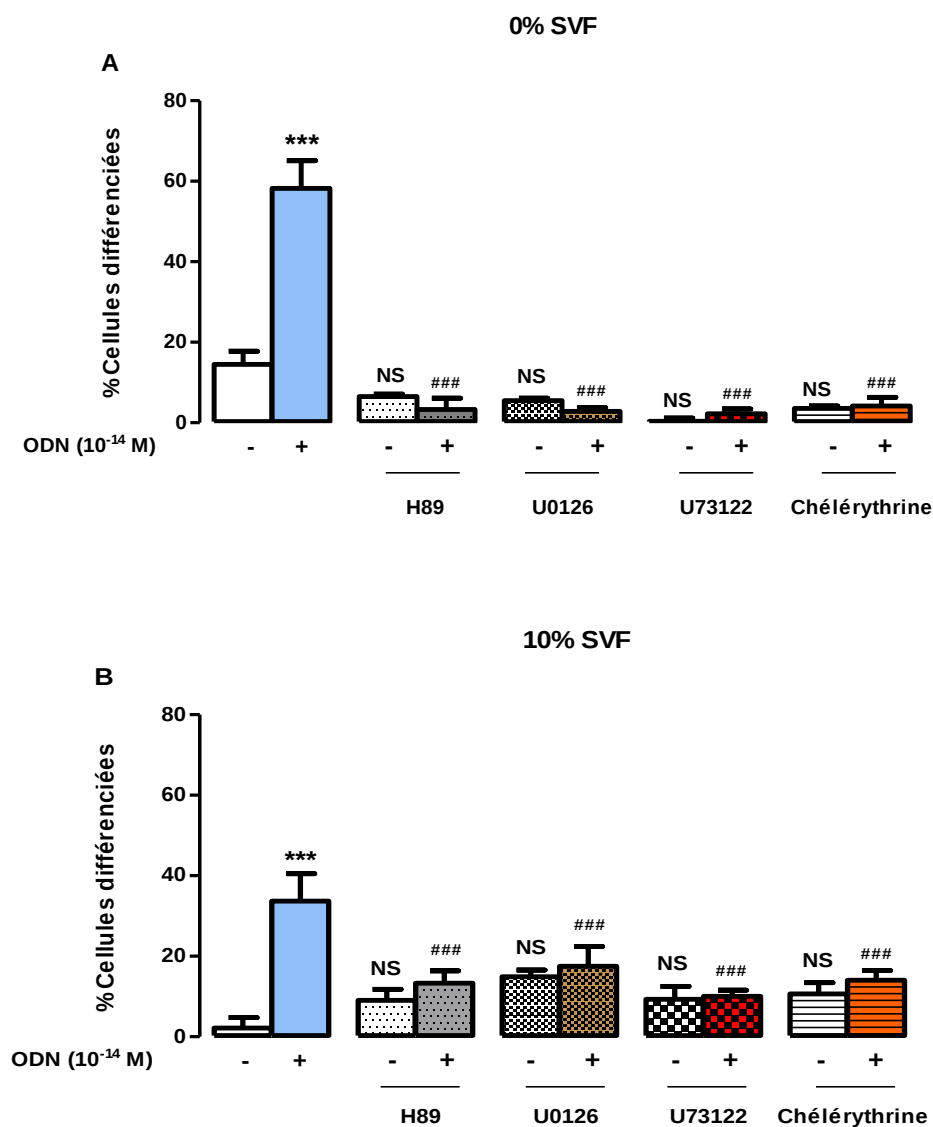


Figure 61: Evaluation des voies de signalisation impliquées dans la différenciation neuronale induite par ODN. Les cellules murines neuronales N2a ont été cultivées pendant 48 h dans un milieu sans SVF (SVF à 0 %) (**A**) ou avec du SVF à 10 % (**B**) en l'absence ou en présence de (ODN: 10^{-14} M) avec ou sans différents inhibiteurs: H89 (2×10^{-5} M; PKA), U0126 (10^{-6} M; MEK), U73122 (10^{-7} M; PLC) et la chébérythrine (10^{-7} M; PKC). Les cellules témoins ont été cultivées dans un milieu sans SVF (0 % de SVF) ou avec 10 % de SVF en absence ou en présence de H89, U0126, U73122 ou de chébérythrine. Les pourcentages de cellules différenciées ont été déterminés par microscopie à contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, ($n=4$). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. *** $p < 0.001$; ### $p < 0.001$; NS: non significatif par rapport au contrôle.

2.7. Incidence de la différenciation neuronale induite par l'ODN sur l'expression des facteurs neurotrophiques : NGF et BDNF

Dans le prolongement de ces travaux nous avons cherché l'importance des facteurs neurotrophiques endogènes connus pour leurs effets à induire la différenciation neuronale au cours de la neurogenèse. Par RT-PCR nous montrons que l'ODN augmente le niveau d'expression des ARNm codant les facteurs NGF BDNF. Il est intéressant de noter que l'ODN stimule également l'expression du gène codant son précurseur, le DBI. (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Effets de l'ODN sur les valeurs de Ct des neuropeptides à activité neurotrophique potentielle (DBI, NGF et BDNF)

Neuropeptide	% SVF	Ct	
		Contrôle	ODN (10^{-14} M)
DBI	0%	33.5 ± 0.1	36.8 ± 0.1
	10%	30.8 ± 0.5	28.1 ± 0.3
NGF	0%	32.5 ± 3.7	31.1 ± 0.7
	10%	27.8 ± 0.5	25.9 ± 0.03
BDNF	0%	34.8 ± 0.8	31.2 ± 0.6
	10%	31.0 ± 0.6	26.7 ± 0.3

Diazepam binding inhibitor DBI : inhibiteur de la liaison au diazépam et précurseur de l'ODN), facteur de croissance (NGF : Nerve growth factor) et facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF). Les valeurs de Ct ont été obtenues par RT-q PCR sur des cellules N2a. Ces ont été cultivées pendant 48 h dans un milieu sans ou avec 10 % de SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M). Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié par microscopie à contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Mann-Whitney. Aucune différence significative n'a été constatée, pour DBI, NGF et BDNF, entre les cellules traitées par ODN et le contrôle.

Sous traitement avec ODN (10^{-14} M) de faibles variations des taux d'ARNm de DBI, NGF, de BDNF ont été observées (**Tableau 6**). **L'ODN ne modifie pas significativement l'expression de DBI, de NGF et de BDNF sur cellules N2a.**

2.8. Incidence de la différenciation neuronale induite par l'ODN sur le profil lipidique des cellules N2a

2.8.1. Différenciation neuronale induite par l'ODN et statut lipidique cellulaire (lipides neutres et polaires)

L'effet différenciateur de l'ODN sur les lipides membranaires (neutres et polaires) a été évalué par coloration au Nile Red (NR). Les cellules N2a ont été pré-traitées en présence ou en absence d'ODN (10^{-14} M) et/ou AR (6.25 μ M ; 0 % SVF) et AR (25 μ M ; 10 % SVF). Après 48 h de traitement, une coloration au NR a été effectuée sur les cellules mises en suspension. L'analyse des résultats a été réalisée par cytométrie en flux (**Figure 62**).

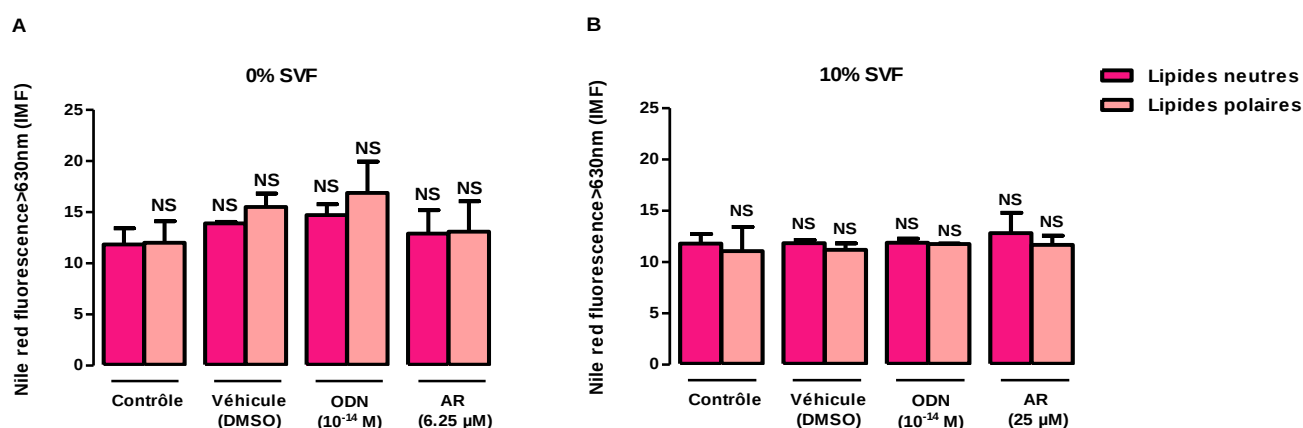


Figure 62 : Incidence de la différenciation induite par l'ODN sur la quantité de lipides neutres et polaires par cellule. Les cellules N2a incubées 48 h dans un milieu contenant ou pas 10 % SVF en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M) et/ou AR (6.25 μ M; 0 % SVF) ou AR (25 μ M ; 10 % SVF). **(A)** milieu sans SVF (0 % SVF), **(B)** milieu avec 10 % SVF. Les résultats sont présentés en pourcentage de l'IMF (intensité moyenne de fluorescence). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Bonferroni. NS: non significatif par rapport au contrôle.

Les résultats observés n'ont révélé aucune différence significative entre les lipides neutres et polaires sur les cellules N2a traitées avec ODN (10^{-14} M) dans un milieu avec ou sans 10 % SVF, ni sur celles traitées avec AR (6.25 - 25 μ M) (**Figure 62**). **L'ODN ne modifie pas le profil des lipides neutres et polaires au cours de la différenciation.**

2.8.2. Différenciation neuronale induite par l'ODN : profils d'acides gras, de cholestérol et de précurseurs du cholestérol

Il est bien connu que les mitochondries et les peroxysomes sont impliqués dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol (**Pandak *et al.*, 2002; Wanders, 2004 ; Wanders & Waterham, 2006 ; Wanders, 2014**). Le métabolisme des lipides (qui sont des composants importants des membranes) peut influencer la prolifération des cellules nerveuses et la neurogenèse (**Knobloch, 2017**). En effet, les acides gras améliorent la différenciation neuronale (**Katakura *et al.*, 2013**) et la voie de biosynthèse du cholestérol conduisant aux isoprénoides peut être modulée au cours de la différenciation neuronale (**Cartocci *et al.*, 2016**). Par conséquent, nous avons déterminé le profil des acides gras (acides gras de C12:0 à C26:1) par chromatographie en phase gazeuse (CG), et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), la teneur en cholestérol et le profil de certains précurseurs du cholestérol (lanostérol, desmostérol, lathostérol) sur cellules N2a différenciées ou non.

Les cellules N2a ont été incubées pendant 48 h dans du DMEM sans SVF, en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M). **Comparativement aux cellules contrôle, les cellules traitées à l'ODN (10^{-14} M) ne présentent aucune différence significative en termes d'acides gras totaux, d'acides gras saturés (C12:0 à C26:0), d'acides gras mono-insaturés (C14:1 à C26:1) et d'acides gras polyinsaturés (C18:2 n-6 à C24:6 n-3) (Tableau 7).**

Tableau 7 : Profils des acides gras dans les cellules N2a différenciées par l'ODN

	Traitements	
	Contrôle	ODN (10^{-14} M)
Acides gras saturés		
C12:0	0.57 ± 0.34	0.67 ± 0.15
C14:0	6.04 ± 3.40	8.22 ± 6.00
C15:0	0.33 ± 0.19	0.40 ± 0.24
C16:0	37.95 ± 20.47	47.50 ± 27.36
C17:0	0.28 ± 0.14	0.33 ± 0.16
C18:0	19.40 ± 10.27	25.23 ± 15.70
C19:0	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.02
C20:0	0.34 ± 0.18	0.47 ± 0.31
C21:0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C22:0	0.07 ± 0.05	0.10 ± 0.07
C23:0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C24:0	0.22 ± 0.13	0.28 ± 0.21
C25:0	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C26:0	0.10 ± 0.06	0.12 ± 0.09
Acides gras mono-insaturés		
C14:1	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
C16:1 n-7	0.94 ± 0.56	1.28 ± 0.95
C16:1 n-9	0.79 ± 0.46	1.05 ± 0.70
C18:1 n-7	10.75 ± 6.48	15.39 ± 12.95
C18:1 n-9	54.64 ± 25.64	69.53 ± 37.16
C20:1 n-7	0.71 ± 0.37	1.10 ± 0.90
C20:1 n-9	3.00 ± 1.66	4.78 ± 4.09
C22:1 n-7	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.07
C22:1 n-9	0.45 ± 0.27	0.68 ± 0.58
C24:1 n-9	0.26 ± 0.16	0.37 ± 0.29
C26:1	0.11 ± 0.06	0.14 ± 0.10
Acides gras poly-insaturés		
C18:2 n-6	0.79 ± 0.47	1.04 ± 0.80
C18:3 n-3	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C18:3 n-6	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.03
C20:2 n-6	1.17 ± 0.53	1.79 ± 1.24
C20:3 n-6	0.45 ± 0.24	0.60 ± 0.40
C20:3 n-9	3.42 ± 1.73	5.02 ± 3.64
C20:4 n-6	1.97 ± 1.29	2.40 ± 1.51
C20:5 n-3	0.42 ± 0.27	0.58 ± 0.51
C22:2 n-6	0.75 ± 0.37	1.08 ± 0.74
C22:4 n-6	0.21 ± 0.20	0.26 ± 0.18
C22:5 n-3	0.83 ± 0.56	0.98 ± 0.57
C22:5 n-6	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C22:6 n-3	1.37 ± 0.90	1.68 ± 1.07
C24:4	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C24:5	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C24:6 n-3	0.08 ± 0.05	0.10 ± 0.08
Total des acides gras	$148,62 \pm 10,55$	$192,48 \pm 13,28$

Caractérisation et quantification des acides gras par chromatographie en phase gazeuse. Le niveau d'AGLC et d'AGTLC a été déterminé par CG. Les données sont exprimées en nmoles / 10^6 cellules et chaque valeur correspond à la moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Analyse statistique: ANOVA suivie du test de Bonferroni. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules traitées par l'ODN et les cellules non traitées (contrôle).

En revanche, la teneur en cholestérol mesurée par cellule est plus élevée dans les cellules traitées par l'ODN (10^{-14} M) par rapport aux cellules contrôle. Ceci est en accord avec les résultats observés sur les principaux précurseurs du cholestérol, lanostérol et desmostérol appartenant à la voie de Bloch, et lathostérol appartenant à la voie de Kandutsch-Russel (Figure 63).

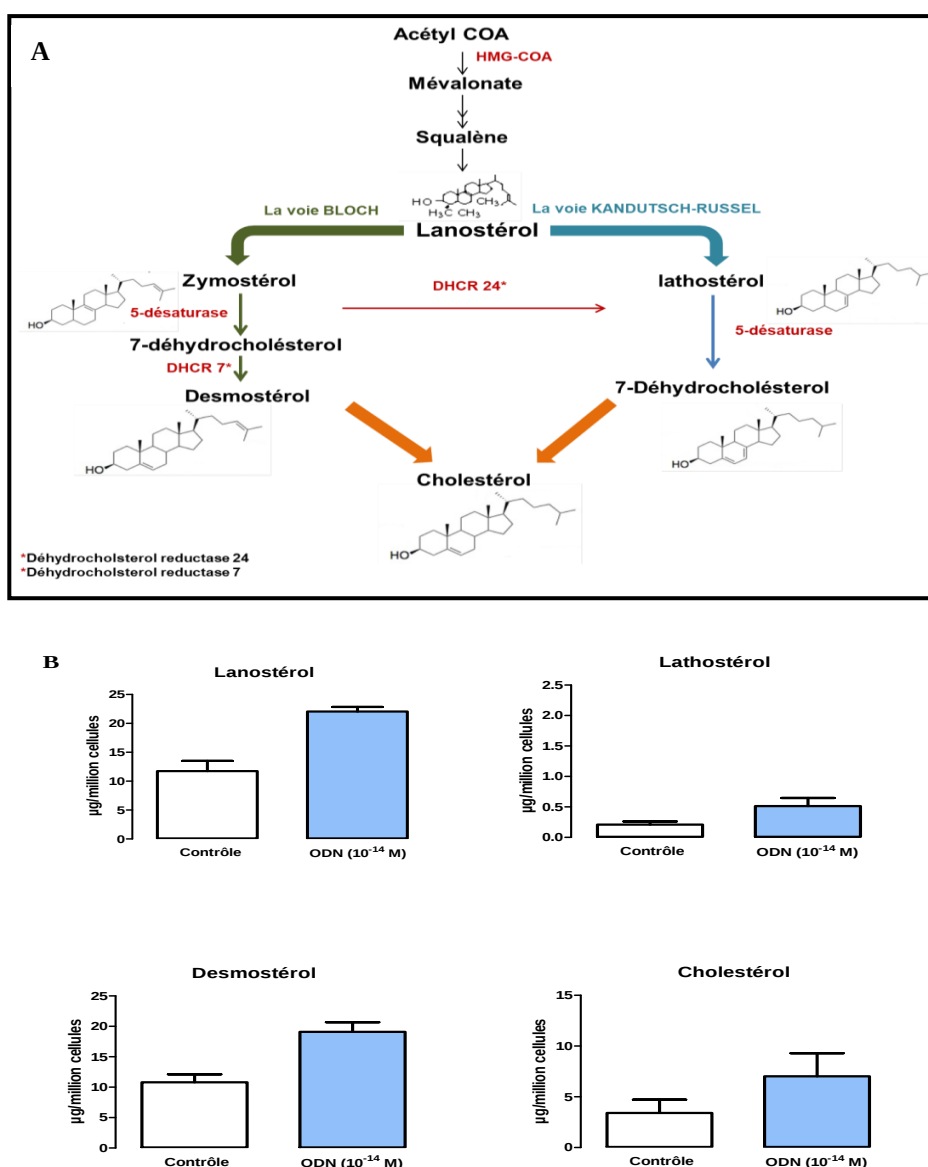


Figure 63: Voies de biosynthèses de cholestérol et de ses précurseurs dans les cellules N2a différenciées ou non par l'ODN. (A) voies de synthèse du cholestérol ; (B) quantification du

cholestérol et de certains de ses précurseurs (lanostérol, desmostérol, lathostérol) sur cellules N2a différenciées ou non. La quantification a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les données sont exprimées en $\mu\text{g}/\text{million}$ de cellules et chaque valeur correspond à moyenne $\pm$ SD ($n=3$). Analyse statistique: ANOVA suivie du test de test Mann Whitney. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules traitées par l'ODN et les cellules non traitées (contrôle).

3. Effet cytoprotecteur et/ou différenciateur de l'ODN sur des cellules neuronales humaines (SK-N-BE), astrocytaires humaines (CCF-STTG1), microgliales murines (BV-2) et gliales de rat (C6)

3.1. Effet cytoprotecteur de l'ODN sur les cellules CCF-STTG1, SK-N-BE, BV-2 et C6

L'effet cytoprotecteur de l'ODN a été évalué sur plusieurs lignées cellulaires nerveuses : neuroblastomes humain SK-N-BE, cellules microgliales murines BV-2, gliomes de rat C6 et astrocytomes humains (CCF-STTG1) en présence d'un stress oxydant généré par H_2O_2 (Figure 64).

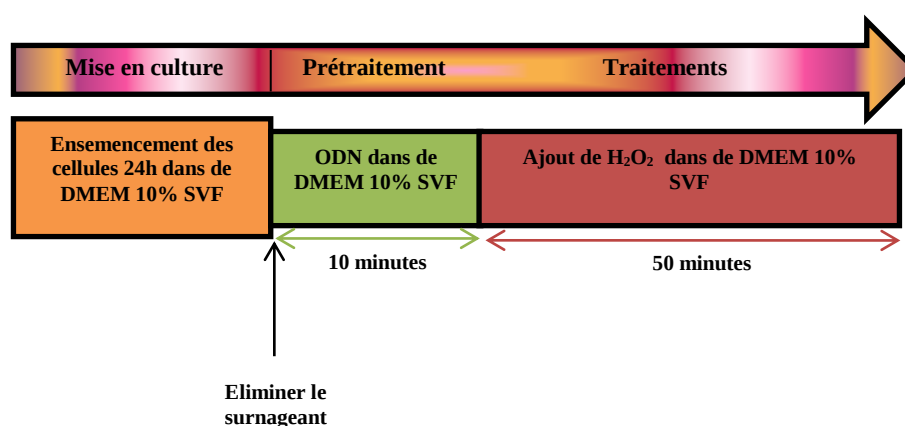


Figure 64: Protocole expérimental évaluant l'effet préventif de l'ODN contre le stress oxydant sur plusieurs lignées de cellules nerveuses

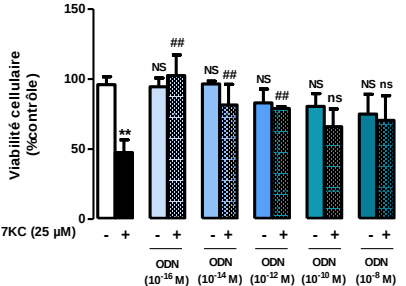
Les cellules ont été pré-incubées 10 min en présence ou en absence d'ODN (10^{-16} - 10^{-8} M) puis incubées pendant 50 min avec ou sans peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou 7-cétocholestérol (7KC) qui est un produit d'oxydation majeur toxique et pro-oxydant du cholestérol. Afin de valider ces modèles de dégénérescence *in vitro*, des expérimentations pilotes ont été réalisées pour mettre au point un protocole expérimental qui permet de reproduire les conditions d'induction de stress oxydant. Les lignées cellulaires ont été incubées

en présence de H₂O₂ (200-400 µM) ou de 7KC (25 µM). Après incubation avec l'ODN, une cytoprotection mise en évidence par les tests FDA et MTT est observée (**Tableau 8**).

Selon le protocole expérimental (**Figure 64**), après un pré-traitement 10 min en présence de concentrations fentomolaires croissantes d'ODN (10⁻¹⁶ M - 10⁻⁸ M), l'effet toxique du H₂O₂ (300 µM) ou du 7KC (25 µM) est atténué par l'ODN (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Effet cytoprotecteur de l'ODN sur différents types de cellules nerveuses en présence de H₂O₂ (300 µM) ou de 7KC (25 µM)

Types cellulaire	Test de viabilité: FDA / MTT*	Concentration de (H ₂ O ₂ ou 7KC)	% mort cellulaire	Concentration maximale protectrice	Protection de l'ODN
SK-N-BE	Viabilité cellulaire (%contrôle) Contrôle H₂O₂ (300 µM) ODN (10⁻¹⁴ M) ODN (10⁻¹⁴ M) + H₂O₂ (100 µM)	H ₂ O ₂ (300 µM)	55 %	ODN (10 ⁻¹⁴ M)	120 %
BV-2*	% Succinate dehydrogenase activity Contrôle H₂O₂ (100 µM) ODN (10⁻¹⁰ M) ODN (10⁻¹⁰ M) + H₂O₂ (100 µM)	H ₂ O ₂ (200 µM)	80 %	ODN (10 ⁻¹⁰ M)	95 %
C6	Viabilité cellulaire (%contrôle) H₂O₂ (400 µM) - + ODN (10⁻²⁰ M) - + ODN (10⁻²⁴ M) - + ODN (10⁻²⁸ M) - + ODN (10⁻³⁰ M) - +	H ₂ O ₂ (400 µM)	56 %	ODN (10 ⁻¹¹ M)	99 %

Astrocytome		7KC (25 µM)	60%	ODN (10 ⁻¹⁶ M)	100%
-------------	---	----------------	-----	---------------------------	------

**Les cellules BV-2 ont été analysées par le test MTT, les autres cellules par le test FDA
Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=5). ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni.; **p<0.01 ; ***p<0.001; #p<0.05 ; ##p<0.01 ; ###p < 0,001 ; NS: non significatif par rapport au contrôle, ns : non significatif par rapport aux cellules traitées en présence de l'agent stressant.*

Ces résultats montrent un **effet cytoprotecteur de l'ODN vis-à-vis d'un stress oxydant induit soit par H₂O₂, soit par du 7KC sur différents types de cellules nerveuses.**

3.2. Effet différenciateur de l'ODN sur les cellules CCF-STTG1 et SK-N-BE

La différenciation des cellules CCF-STTG1 et SK-N-BE a été évaluée par la croissance des neurites en présence d'ODN (10⁻¹⁴ M).

Afin de mettre en évidence l'effet différenciateur de l'ODN les traitements ont été réalisés en milieu DMEM sans SVF (0 % SVF) ou avec 10 % SVF. Dans ces conditions, les cellules CCF-STTG1 et SK-N-BE ont été cultivées pendant 48 h en absence ou en présence d'ODN (10⁻¹⁴ M). La différenciation neuronale a été évaluée morphologiquement par microscopie à contraste de phase avec un microscope inversé Zeiss (**Figure 65**).

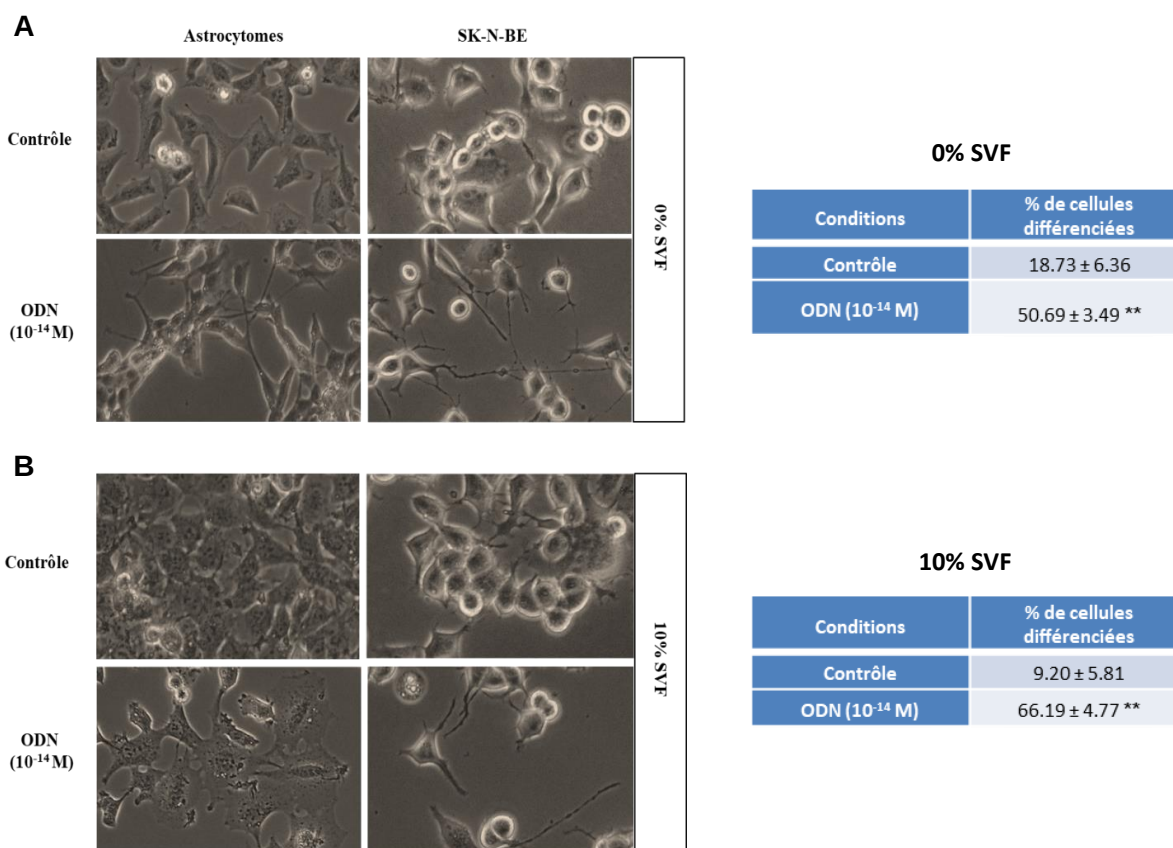


Figure 65 : Évaluation morphologique et quantification de la différenciation neuronale des cellules CCF-STTG1 et SK-N-BE traitées par l'ODN. Les cellules CCF-STTG1 et SK-N-BE ont été incubées 48 h dans un milieu (0 % SVF) (A) ou avec 10 % SVF (B) en absence ou en présence d'ODN (10^{-14} M). Les observations ont été réalisées par microscopie de contraste de phase. Les cellules différenciées sont caractérisées par des neurites (dendrites et / ou axones). Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié à partir des photos prises au microscope à contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=5) du pourcentage de cellules CCF-STTG1 et SK-N-BE différenciées. L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à un facteur suivie du test de Bonferroni. $^{**}p < 0.01$ par rapport au contrôle.

L'ODN induit la biogenèse de neurites sur des cellules humaines CCF-STTG1 (astrocytomes) et SK-N-BE (neuroblastomes).

4. Effet différenciateur des polyphénols : Resvératrol et Apigénine

Les travaux de thèse ont consisté aussi à mettre en évidence deux éventuels effets protecteurs et différenciateurs de deux polyphénols présents dans le régime méditerranéen; le RSV et l'API. Afin de valider ce modèle *in vitro*, nous avons étudié la capacité de ces deux molécules à induire une différenciation neuronale sur cellules N2a.

4.1. Évaluation et quantification de la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine cellules N2a

Afin d'évaluer les propriétés de la cytotoxicité et de la différenciation, ces neuroblastomes ont été mis en culture en présence de deux polyphénols ; le resvératrol (RSV) et l'apigénine (API), et l'acide rétinoïque (AR) qui est utilisé comme contrôle positif connu comme inducteur de différenciation.

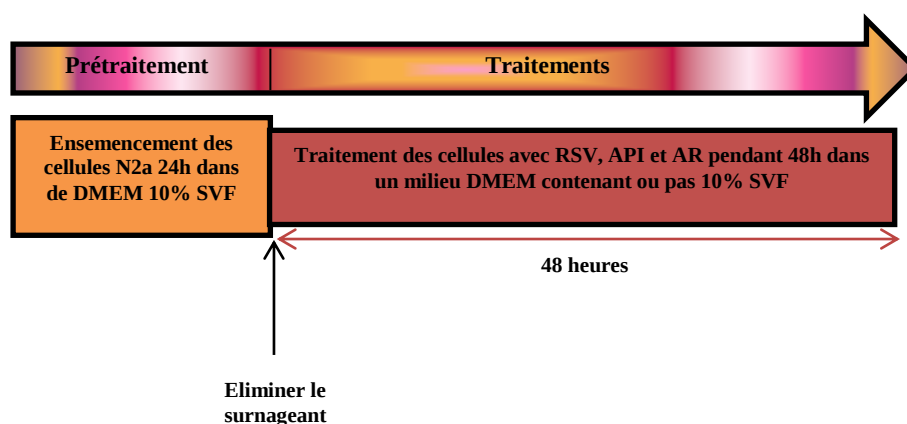


Figure 66 : Protocole expérimental destiné à évaluer l'effet différenciateur des deux polyphénols (RSV, API)

Les N2a ont été cultivés pendant 48 h dans un milieu DMEM riche en nutriments avec (10 % SVF) ou sans SVF (0 % SVF) en absence ou en présence des concentrations croissantes de RSV (6,25 à 50 μ M) ou d'API (6,25 à 50 μ M). L'éthanol (EtOH) a été utilisé comme véhicule pour dissoudre le RSV, tandis que le diméthylsulfoxyde (DMSO) a été utilisé comme véhicule pour dissoudre l'API et l'AR ; l'AR dernier est utilisé comme contrôle positif permettant d'induire la différenciation neuronale (**Figure 66**). La différenciation neuronale induite par RSV, API et AR a été évaluée morphologiquement par microscopie à contraste de phase en utilisant un microscope Zeiss inversé (**Figure 67**).

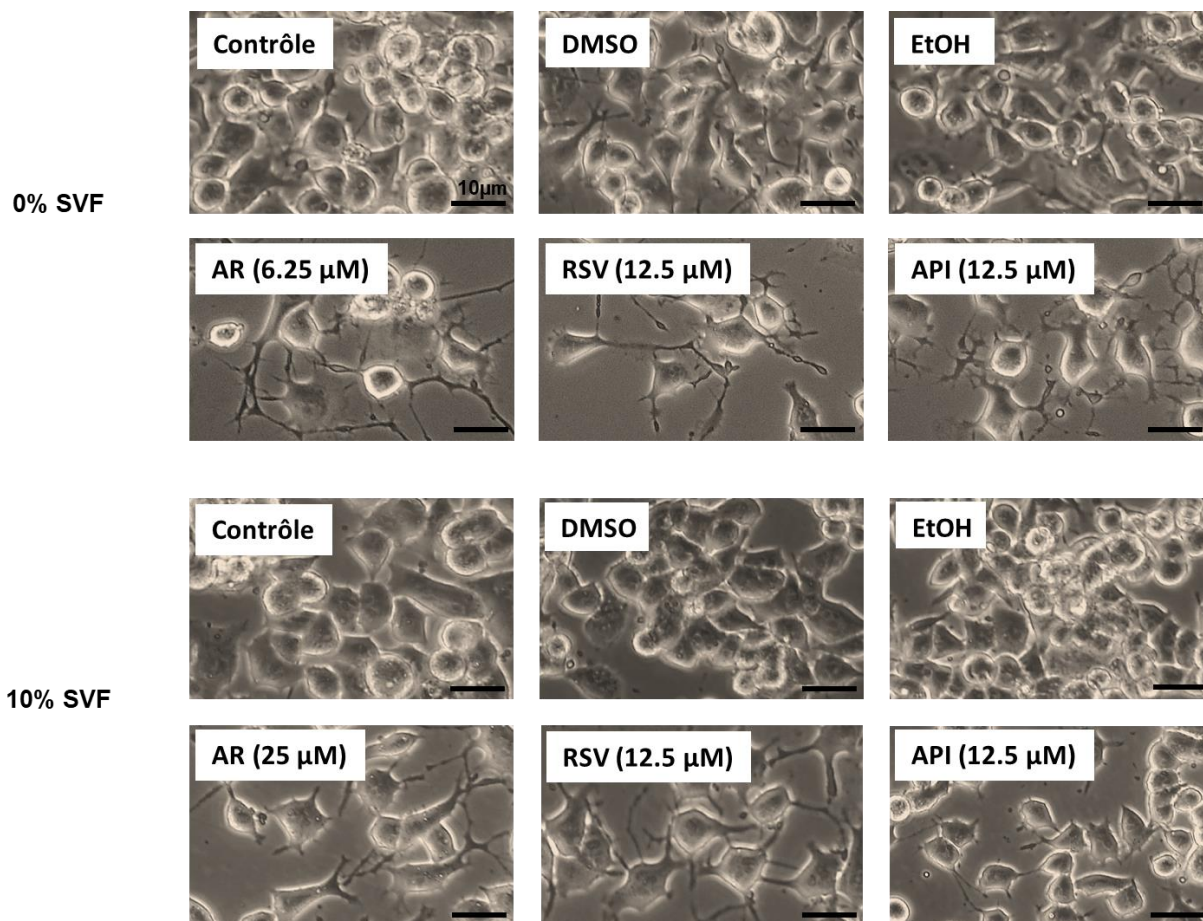


Figure 67: Évaluation morphologique de la différenciation neuronale des cellules N2a traitées par le resvératrol, l'apigénine et l'acide rétinolique. Les cellules N2a ont été incubées 48 h dans un milieu sans ou avec 10 % SVF, en absence ou en présence d'acide rétinolique (AR: 6.25 et 25 µM) ou avec les polyphénols: resvératrol (RSV 12.5 µM) et apigénine (API : 12.5 µM). Les observations ont été réalisées par microscopie à contraste de phase. Les cellules différenciées sont caractérisées par une croissance de neurites (dendrites et / ou axones) ; elles sont observés en présence de RSV, d'API et d'AR.

Ce phénomène a ensuite été quantifié selon des critères morphologiques basés sur la présence des cellules différenciées. Les résultats montrent que **le taux de différenciation des N2a obtenu en présence de RSV, API et AR est presque identique lorsque les cellules sont traitées en absence ou en présence de 10 % SVF (Figure 68).**

Dans un milieu sans sérum (0 % SVF), le taux de différenciation le plus élevé a été observé sur les cellules traitées avec l'AR à la concentration (6.25 µM) montrant un pourcentage de 53.9 % **(Figure 68).**

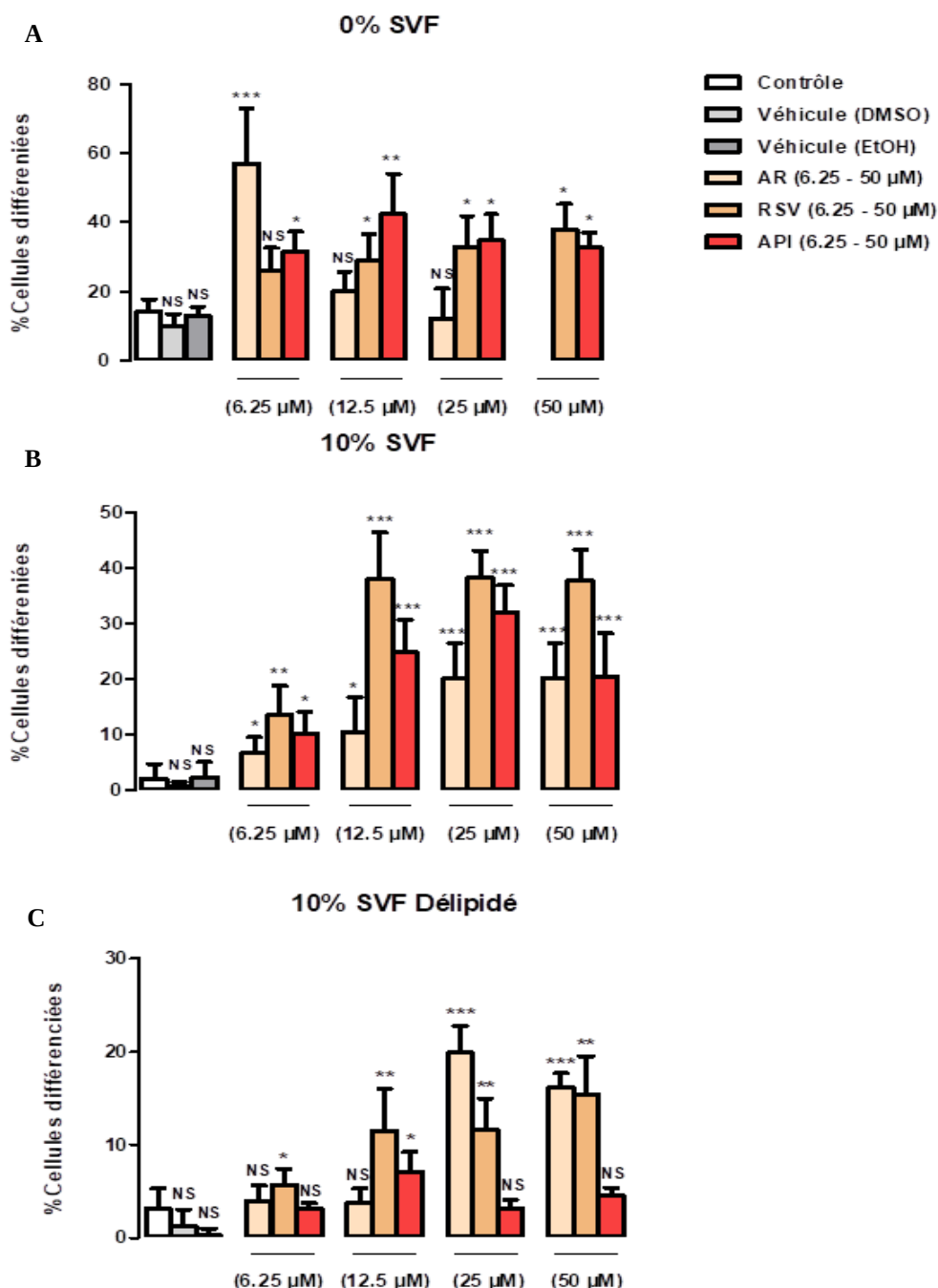


Figure 68 : Quantification de la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine sur cellules N2a. Les cellules N2a murines neuronales ont été incubées 48 h dans un milieu avec ou sans 10 % SVF (délipidé ou non) (**A**, **B** et **C**) respectivement en absence ou en présence d'acide rétinolique (AR: 6.25 et 25 μ M) ou avec les polyphénols: resvératrol (RSV 6.25 et 25 μ M) et apigénine (API: 6.25 et 25 μ M). Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié en microscopie à contraste de phase. Chaque valeur présente la moyenne $\pm$ SEM ($n=4$). L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA suivie d'un test de Mann-Whitney. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; NS: non significatif par rapport au contrôle. Aucune différence entre les témoins / véhicules (DMSO, EtOH) n'a été observée.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus montrent que **quelles que soient les conditions de culture, le RSV et d'API sont des inducteurs de différenciation neuronales favorisant la croissance de neurites.**

4.2. Incidence de la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine sur la croissance et la viabilité des cellules N2a

En absence de SVF, les cellules N2a traitées avec AR (6.25 – 50 μ M) montrent qu'avec des concentrations élevées (12.5 -50 μ M), la différenciation cellulaire diminue (**Figure 69**) ; ceci pourrait être dû à une diminution dose-dépendante de la croissance et/ou d'une réduction de la viabilité cellulaire révélée respectivement par un comptage cellulaire et une coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) (**Figure 69**).

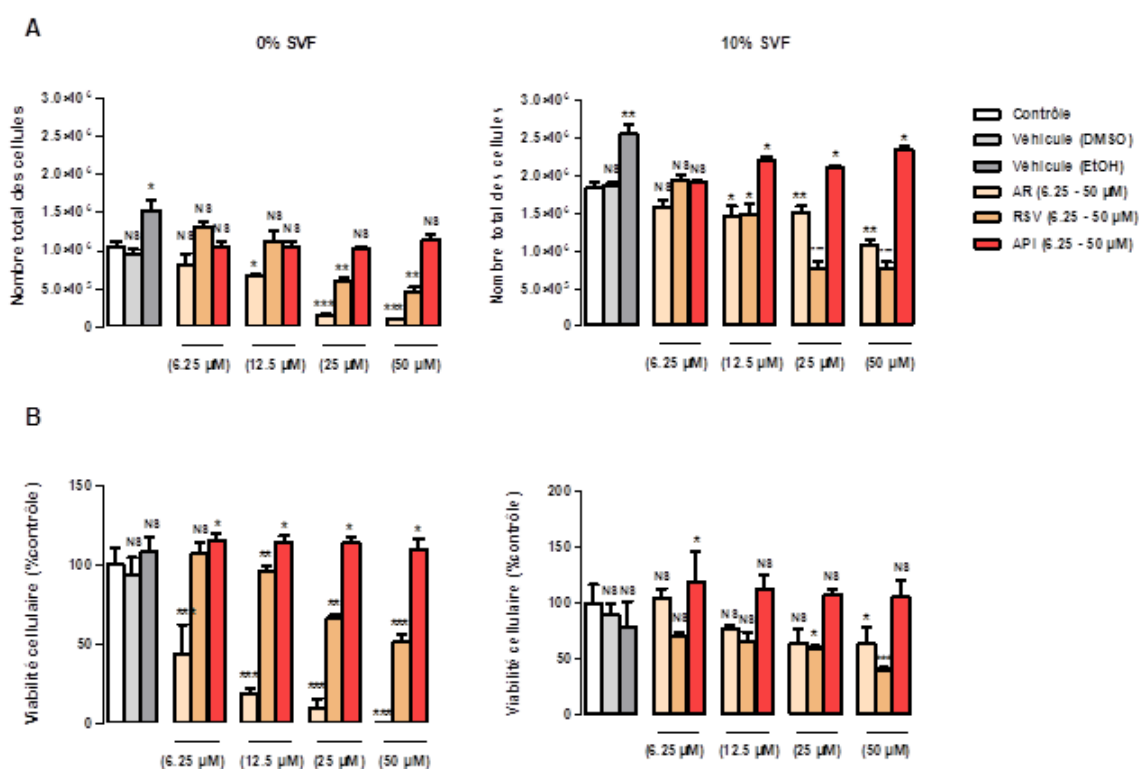


Figure 69: Incidence de la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine sur la croissance et la viabilité des cellules N2a. Les cellules murines neuronales N2a ont été incubées 48 h dans un milieu contenant ou non 10 % SVF en absence ou en présence d'acide rétinoïque (AR : 6.25 et 25 μ M) ou avec les polyphénols : resvératrol (RSV 6.25 et 25 μ M) et apigénine (API: 6.25 et 25 μ M). La croissance cellulaire (nombre total de cellules) a été déterminée par comptage cellulaire (**A**) alors que la viabilité cellulaire a été déterminée par fluorimétrie avec le test FDA (**B**). Le comptage de nombre total de cellules est réalisé en présence de bleu de trypan et la viabilité cellulaire est quantifiée par l'intensité de fluorescence du FDA. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM (n=5). L'analyse statistique a été réalisée par

*une ANOVA suivie d'un test de Mann-Whitney. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS : non significatif par rapport au contrôle. Aucune différence entre les témoins / véhicules (DMSO) n'a été observée alors qu'une légère différence a été détectée entre le témoin et l'EtOH.*

A ces concentrations, la croissance et la viabilité cellulaire détectées sur les cellules traitées par API montrent une augmentation légèrement significative alors que celles traitées en présence de RSV (6.25 – 50 μM) montrent une diminution significative aussi bien sur la croissance que sur la viabilité cellulaire.

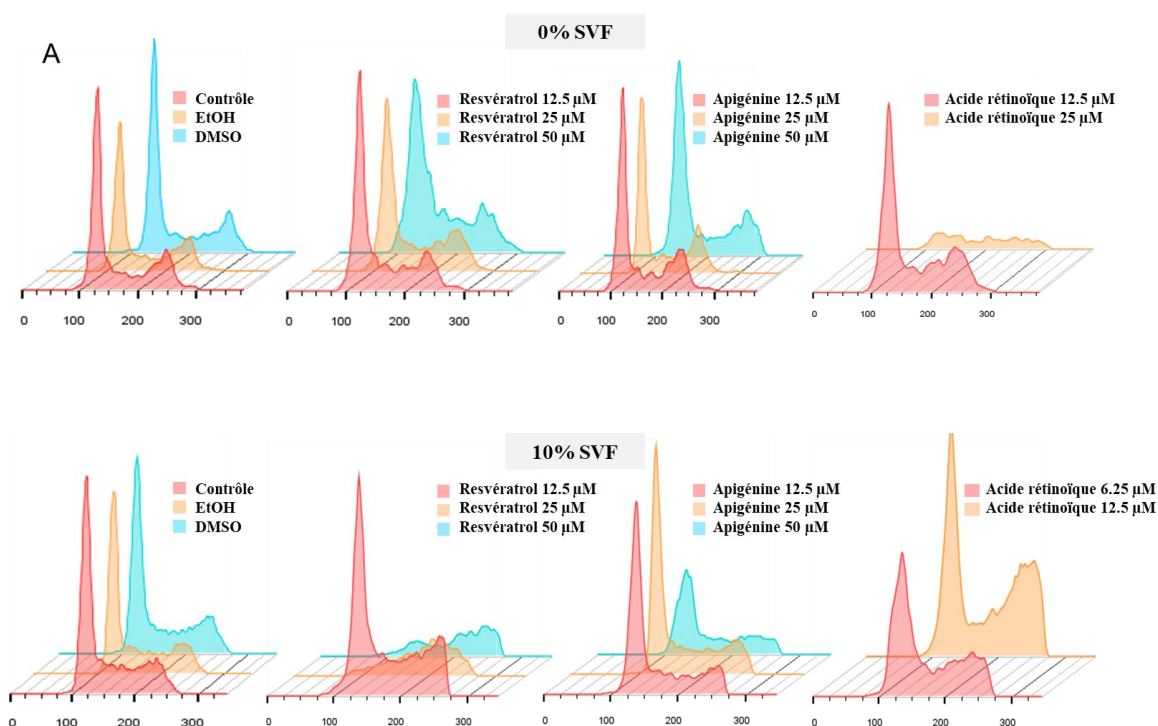
En présence de 10 % SVF, les N2a traités par RSV (12.5 – 50 μM) montrent des pourcentages plus élevés de cellules différenciées (30 à 38 %) associés à une diminution de la croissance cellulaire et à la viabilité neuronale (**Figures 69**). Des effets différenciateurs similaires avec des pourcentages de (10-30 %) ont été observés dans une gamme de concentration de (12,5 à 50 μM) (**Figures 68 et 69**).

4.3. Incidence de la différenciation neuronale induite par le resvératrol, l'apigénine et l'acide rétinoïque sur la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire

La répartition des cellules N2a traitées par les polyphénols (RSV et API) ainsi que par l'AR dans les différentes phases du cycle cellulaire a été obtenue par cytométrie en flux (**Figure 70**).

En absence de SVF, de légères modifications du cycle cellulaire ont été observées comparativement aux cellules contrôle, véhicules et traitées en présence de RSV, d'API et d'AR. En présence de 10 % de SVF, des modifications du cycle cellulaire ont été principalement observées avec le RSV (12,5 μM). Cependant, à des concentrations d'AR de (25-50 μM) nous avons observé une mortalité cellulaire (en particulier à la concentration de 50 μM) (**Figure 70A**).

Des modifications du cycle cellulaire montrent qu'en présence de RSV (25-50 μM), et en accord avec d'autres études (**Marel et al., 2008 ; Colin et al., 2008**), il y a une accumulation des cellules en phase S. L'API (25-50 μM) induit une accumulation moins prononcée des cellules en Phase S que le RSV (**Figure 70 B**), alors que sa capacité à favoriser une accumulation en (G2 + M) a été rapportée (**Wang et al., 2000 ; Elsisi et al., 2005**) ; l'AR induit bien une accumulation de cellules en (G2 + M) (**Figure 70 B**).



B

SVF	Phases du cycle cellulaire	Traitements											
		Contrôle	Véhicule (DMSO)	Véhicule (EtOH)	RSV 12.5 µM	RSV 25 µM	RSV 50 µM	API 12.5 µM	API 25 µM	API 50 µM	AR 6.25 µM	AR 12.5 µM	AR 25 µM
0%	G0/G1	62	60	60	63	52	49	60	56	63	ND	47	25
	S	11	13	17	13	15	23	11	14	12	ND	28	27
	G2 + M	27	27	23	24	33	28	29	30	25	ND	35	48
10%	G0/G1	60	59	58	46	7	10	55	50	51	48	34	ND
	S	15	19	20	22	65	73	20	27	35	45	14	ND
	G2 + M	25	22	22	32	28	17	25	23	14	17	52	ND

ND: not determiner

Figure 70 : Impact du resvératrol, de l'apigénine ainsi que de l'acide rétinoïque sur la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les cellules N2a ont été cultivées pendant 48 h avec ou sans SVF 10 % en absence ou en présence d'AR (6,25, 12,5 et 25 μM) ou avec des polyphénols: RSV (12,5, 25 et 50 μM) et API (12,5, 25 et 50 μM). L'analyse du cycle cellulaire a été réalisée par cytométrie en flux après coloration à l'iodure de propidium (n-1). La capacité du RSV (25 et 50 μM) à augmenter le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire valide l'expérience. (A) Histogrammes illustrant la répartition de N2a dans les différentes phases du cycle cellulaire (B) pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Les polyphénols (RSV et API) induisent une modification de la répartition des cellules N2a différenciées dans les phases du cycle cellulaire quelles que soient les conditions de culture. Le RSV bloque, comme attendu, les cellules en phase S alors que l'API bloque en (G2+M). Le blocage en (G2+M) par l'AR valide les résultats.

4.4. Caractérisation et quantification de la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine

Les cellules N2a traitées avec RSV (12.5 μ M), API (12.5 μ M) en absence ou en présence de 10 % SVF ou par AR (6.25 et 25 μ M) avec ou sans 10 % SVF montrent une capacité à induire une différenciation pas ou peu toxique. Dans ces conditions de différenciation, les deux polyphénols ; RSV (12.5 μ M) et API (12.5 μ M) induisent une stimulation de la croissance des neurites (**Figure 67 et 68**). Le pourcentage de différenciation varie en absence ou en présence de sérum (**Figure 71**).

Les N2a traitées avec l'AR (6.25 et 25 μ M) montrent une différenciation définie comme principalement axonale en raison de la présence de cellules différenciées avec de longs neurites (20 à 50 %), alors que les pourcentages de ces dernières en présence de polyphénols ne représentent que (22 et 30 %) pour les cellules traitées par le RSV et (16 et 34 %) pour les celles traitées par l'API (**Figure 71**).

Par conséquent, ces résultats montrent que les deux polyphénols RSV et API sont de bons inducteurs de différenciation neuronale. De plus, il est important de souligner que l'effet différenciateur de l'API est peu ou pas cytotoxique à l'inverse de ceux observés avec l'AR et le RSV (**Figure 71**).

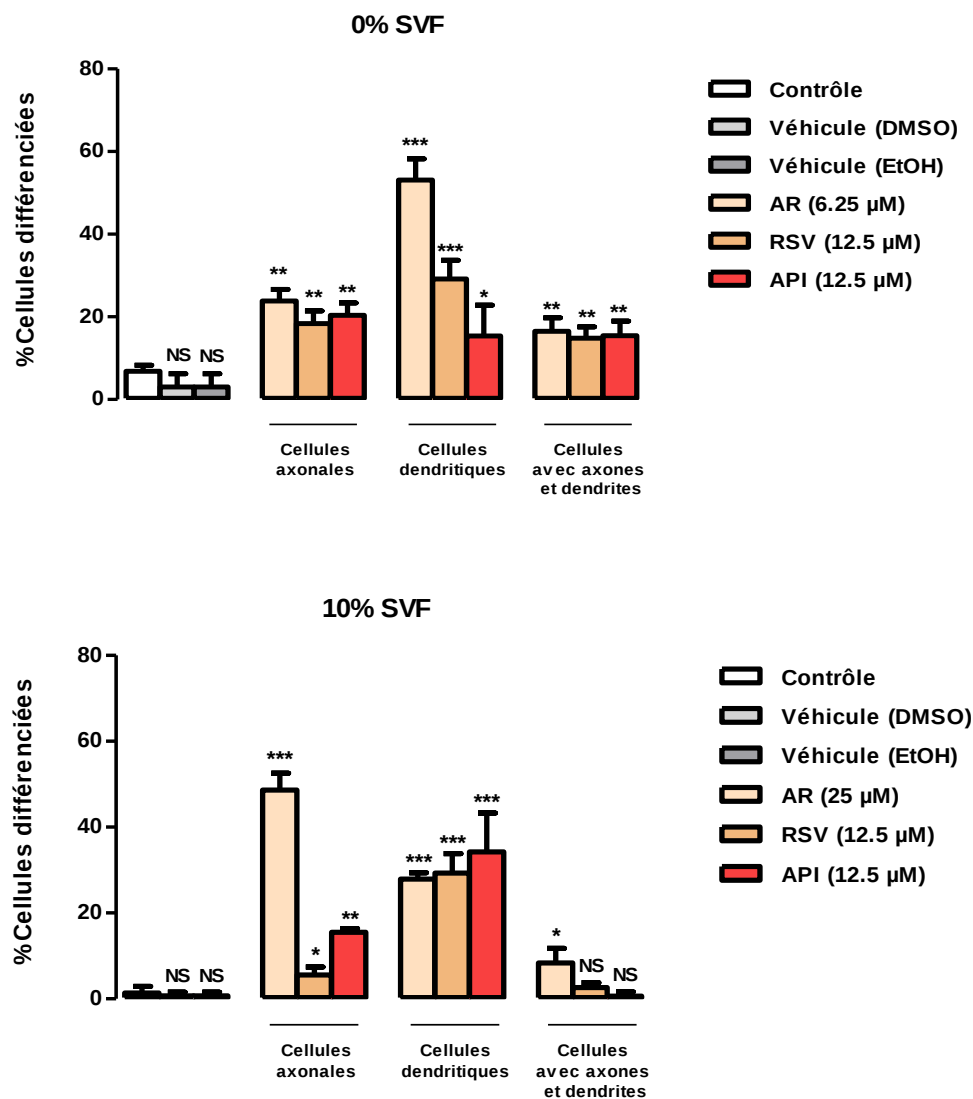


Figure 71 : Caractérisation et quantification des cellules N2a différenciées par le resvératrol et l'apigénine. Les cellules N2a ont été incubées 48 h dans un milieu contenant ou pas 10 % SVF en absence ou en présence d'AR (6.25 – 25 µM), RSV (12.5 µM) et API (12.5 µM). Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié par microscopie à contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Mann-Whitney. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: non significatif par rapport au contrôle. Aucune différence entre contrôle / véhicules (DMSO, EtOH) n'a été observée.

4.5. Caractérisation des voies de signalisation du Resvératrol et de l'Apigénine impliquées dans la différenciation neuronale des cellules N2a

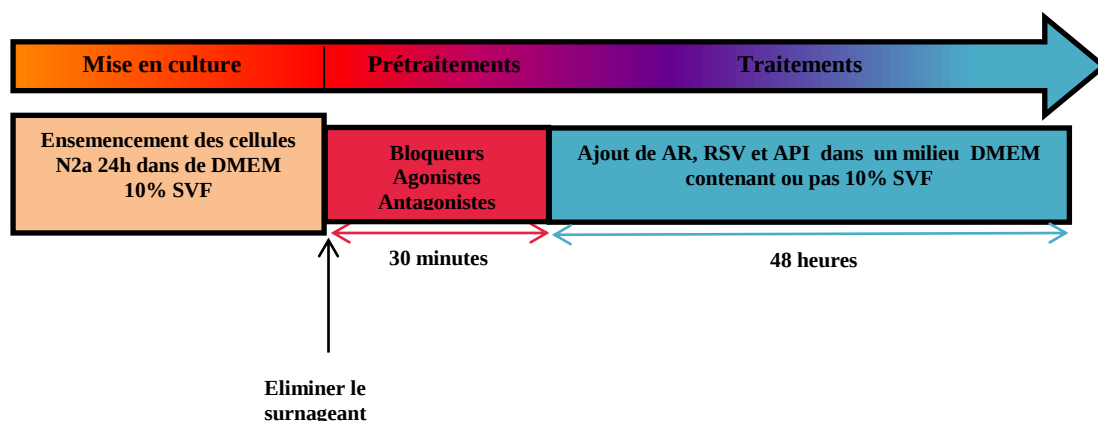


Figure 72 : Protocole expérimental pour évaluer les voies de signalisation impliquées dans l'effet différenciateur de l'ODN

Les voies de signalisation impliquées dans la différenciation neuronale induite par les neurotrophines sont peu connues. Ceci nous a conduits à étudier les voies de signalisation associée à la différenciation induite par l'ODN. En se basant sur des travaux antérieurs (**Kaddour *et al.*, 2013**), nous avons émis l'hypothèse que les voies de cytoprotection précoces induites par l'ODN pouvaient être proches des voies activées précocement par cette même molécule dans la différenciation. Ainsi, dans la différenciation induite par les polyphénols (RSV, API) nous avons évalué l'implication de PKA, (PLC/PKC) et (MEK/ERK). Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules N2a ont été pré-incubées 30 min avec différents inhibiteurs: H89 (PKA), U0126 (MEK), U73122 (PLC) et chélérythrine (PKC) (**Figure 72**). Les types de récepteurs et les voies de signalisation pouvant être impliqués sont représentés sur la **Figure 73**.

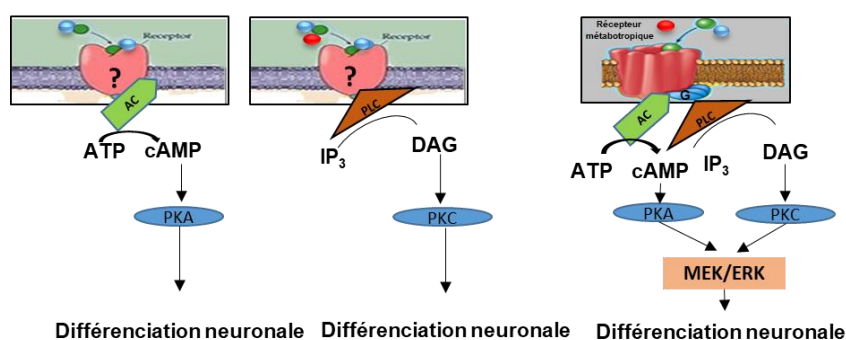
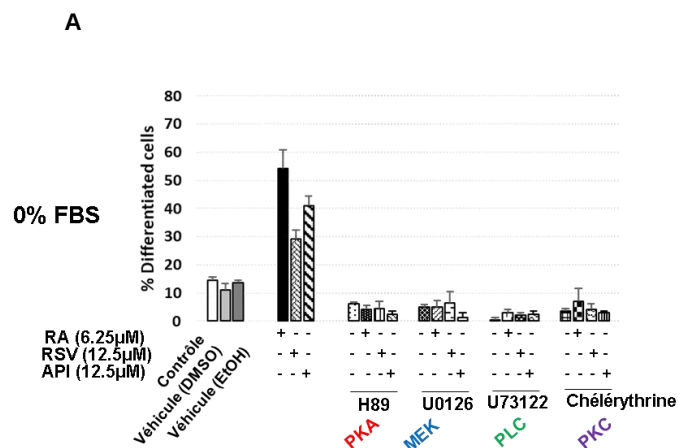


Figure 73 : Récepteurs et voies de signalisation pouvant être impliqués dans la différenciation neuronale des cellules N2a (Namsi A *et al.*, 2018)

En absence de SVF (0 % SVF), l'association des polyphénols avec les inhibiteurs montre une inhibition de la différenciation neuronale (**Figure 74A**). Ceci montre que ces deux polyphénols stimulent simultanément les voies de signalisations PKA / (MEK/ERK) et PLC /PKC / (MEK/ERK). Ces voies de signalisation en absence de SVF pourraient être de trois types : deux voies de signalisation indépendantes simultanément activées, l'une impliquant PKA /MEK/ERK et l'autre PLC /PKC /MEK/ERK ; une voie de signalisation recrutant un récepteur évoquant le récepteur métabotropique (activation simultanée de PKA /PLC /PKC / MEK/ERK). Sans sérum, l'AR utiliserait les mêmes voies de signalisation que RSV et API (**Figure 74A**).

En présence de 10 % de SVF en associant RSV (12.5 μ M) et API (12.5 μ M) avec les inhibiteurs (H89 (PKA), U0126 (MEK), U73122 (PLC) et chélérythrine (PKC)) la différenciation recrute une signalisation différente que sans SVF (**Figure 74B**). Le RSV implique uniquement la voie PLC /PKC sans activer MEK/ERK; l'API n'implique pas PLC, PKC, PKA et MEK/ERK. L'AR utilisé comme contrôle positif d'induction de différenciation active les voies PKA /PLC / PKC sans activer la voie MEK/ERK (**Figure 74B**).

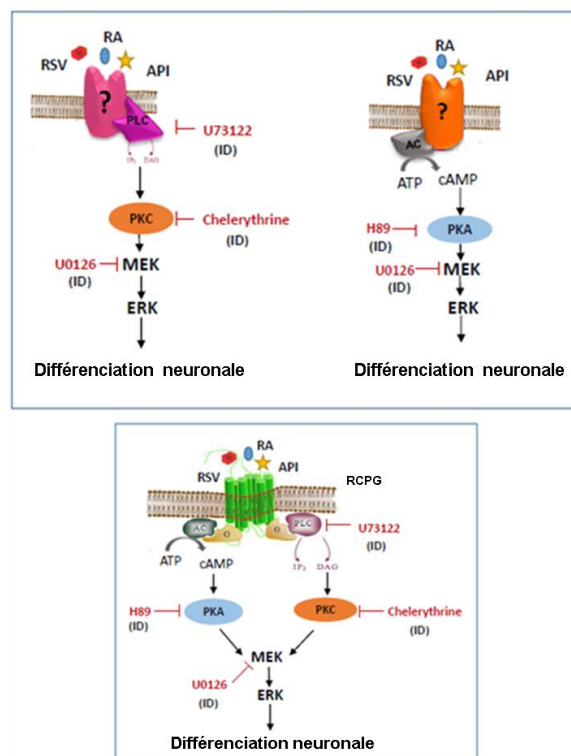
Il ressort que **les voies de signalisation associées à la différenciation neuronale sous l'effet du RSV et d'API sont influencées par la présence de sérum.**



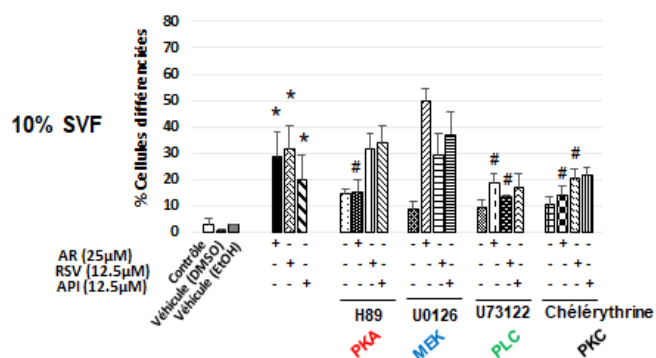
	PKA (H89)	MEK (U0126)	PLC (U73122)	PKC (Chelerythrine)
AR	ID	ID	ID	ID
RSV	ID	ID	ID	ID
API	ID	ID	ID	ID

*ID: Inhibition de différenciation
*NID: Non inhibition de différenciation

Voies de signalisation associées à la différenciation neuronale (SVF à 0%)



B



	PKA (H89)	MEK (U0126)	PLC (U73122)	PKC (Chelerythrine)
AR	ID	NID	ID	ID
RSV	NID	NID	ID	ID
API	NID	NID	NID	NID

*ID: Inhibition de différenciation
*NID: Non inhibition de différenciation

Voies de signalisation associées à la différenciation neuronale (10% SVF)

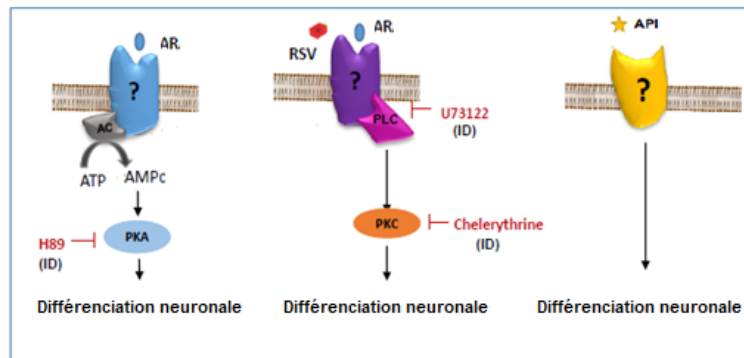


Figure 74 : Évaluation de l'implication de la protéine kinase A (PKA), de la phospholipase C (PLC) / de la protéine kinase C (PKC) et les voies de signalisation MEK / ERK dans la différenciation neuronale induite par le resvératrol et l'apigénine sur les cellules N2a. Les cellules incubées 48 h dans un milieu sans (A) ou avec 10 % SVF (B) en absence ou en présence d'acide rétinoïque (AR : 6.25µM avec 0 % SVF et 25 µM avec 10 % SVF) ou avec les deux polyphénols : RSV (12.5 µM) et API (12.5 µM). Les cellules N2a ont été cultivées avec ou sans inhibiteurs: H89 (2×10^{-5} M; PKA), U0126 (10^{-6} M; MEK), U73122 (10^{-7} M; PLC) et chélérythrine (10^{-7} M; PKC). Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié par microscopie à contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SEM, ($n=4$). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Mann-Whitney. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; # $p<0.05$; ## $p<0.01$; ### $p<0.001$ NS: non significatif par rapport au contrôle ; ns : non significatif en comparant les inhibiteurs par rapport aux associations. Aucune différence entre les témoins / véhicules (DMSO, EtOH) n'a été observée.

4.6. Évaluation de la participation du récepteur de l'octadécaneuropeptide (ODN) à la différenciation neuronale des cellules N2a induite par le Resvératrol et l'Apigénine

Les résultats obtenus sur les voies de signalisation activées par le RSV et l'API au cours de la différenciation neuronale ont suggéré l'implication d'un récepteur évoquant les récepteurs métabotropiques de l'ODN. Pour évaluer cette hypothèse, les cellules cultivées en présence de RSV et API ont été associées ou non cyclo₁₋₈ [DLeu⁵] OP (un antagoniste des récepteurs métabotropiques de l'ODN (**Kaddour et al., 2013**)).

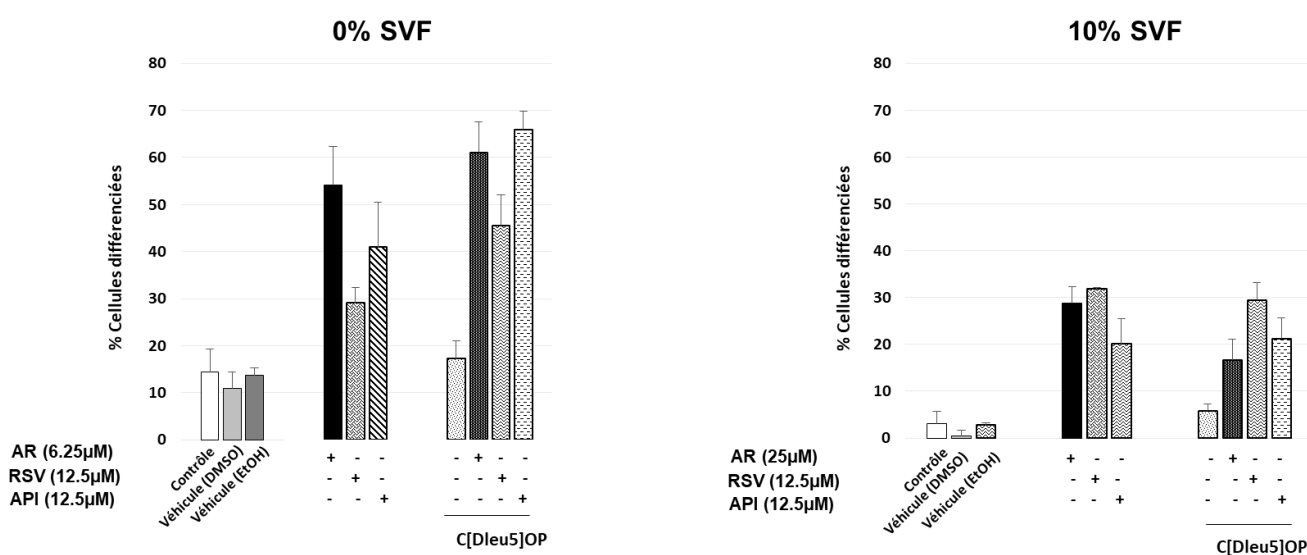


Figure 75 : Évaluation de l'implication du récepteur de l'ODN dans la différenciation neuronale induite par resvératrol et apigénine sur les cellules N2a. Les cellules incubées 48 h dans un milieu sans SVF (A) ou avec 10 % SVF (B) en absence ou en présence d'acide rétinoïque (AR : 6.25µM avec 0 % SVF et 25 µM avec 10 % SVF) ou avec les deux polyphénols : RSV (12.5 µM) et API (12.5 µM). Les cellules N2a ont été cultivées avec ou sans cyclo₁₋₈ [DLeu⁵] OP (10⁻⁶ M) un antagoniste des récepteurs métabotropiques de l'ODN. Les cellules témoins ont été cultivées dans un milieu sans SVF et avec 10 % de SVF. Deux véhicules ont été utilisés: EtOH utilisé avec RSV et DMSO utilisé avec AR et API. Le pourcentage de cellules différenciées a été quantifié par microscopie à contraste de phase. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Mann-Whitney. **p<0.01 ; ***p<0.001; #p<0.05 ; ##p<0.01 ; ###p<0.001 NS: non significatif par rapport au contrôle. Aucune différence entre les témoins / véhicules (DMSO, EtOH) n'a été observée.

Dans ces conditions, la différenciation neuronale induite par le RSV (12.5 µM) et l'API (12.5 µM) n'a pas été diminuée en présence de l'antagoniste (**Figure 75**). Le RSV et l'API n'interagissent pas avec les récepteurs métabotropiques de l'ODN pour induire la différenciation neuronale des cellules N2a.

Enfin, nous avons déterminé si le RSV et l'API pouvaient stimuler l'expression de molécules à même d'induire la différenciation neuronale : DBI, facteur de croissance des cellules nerveuses (NGF) et facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF). L'expression des gènes correspondant a été évaluée par les valeurs de Ct quantifiées par la RT-q PCR. Dans ces conditions les valeurs de Ct dans les cellules contrôle sont identiques aux traitées. (**Tableau 9**).

Tableau 9: Effets des deux polyphénols (resvératrol et apigénine) et de l'acide rétinolique sur les valeurs de Ct des neuropeptides à activité neurotrophique potentielle: Diazepam binding inhibitor DBI (inhibiteur de la liaison au diazépam et précurseur de l'ODN), facteur de croissance (NGF : Nerve growth factor) et facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF).

Les valeurs de Ct ont été obtenues par RT-qPCR sur des cellules N2a. Chaque valeur

Neuropeptides	% SVF	Ct					
		Contrôle	EtOH (0.02 %)	DMSO (0.12 %)	RA	RSV	API
DBI	0 %	33.5 ± 0.1	33.5 ± 1.6	30.6 ± 0.3	33.6 ± 1.0	33.4 ± 1.2	31.9 ± 0.1
	10 %	30.8 ± 0.5	28.4 ± 0.3	28.2 ± 0.3	32.2 ± 0.2	28.9 ± 2.4	28.1 ± 0.5
NGF	0 %	32.9 ± 3.7	31.3 ± 1.3	28.1 ± 0.6	29.7 ± 0.2	30.0 ± 0.3	28.5 ± 0.1
	10 %	27.8 ± 0.5	25.4 ± 1.6	25.6 ± 1.8	28.6 ± 0.2	24.9 ± 0.2	25.3 ± 0.2
BDNF	0 %	34.8 ± 0.8	33.4 ± 1.1	29.7 ± 1.1	32.6 ± 0.7	35.5 ± 2.3	31.3 ± 1.7
	10 %	31.0 ± 0.6	28.1 ± 0.2	27.4 ± 0.5	31.1 ± 0.5	37.6 ± 0.5*	27.6 ± 0.1

*représente la moyenne ± SEM, (n=4). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie du test de Mann-Whitney. Aucune différence significative n'a été constatée, pour DBI, NGF et BDNF, entre AR, RSV, API et les véhicules correspondants, à l'exception du RSV (10 % SVF; *p<0.05) pour le BDNF.*

Le RSV et l'API n'induisent pas l'expression de DBI, NGF et BDNF.

Discussion

Les maladies neurodégénératives sont souvent liées à un stress oxydant accru associé à un déséquilibre Redox. Ceci permet de déclencher une surproduction d'espèces radicalaires qui provoquent une peroxydation lipidique, oxydation des protéines et des acides nucléiques et un dysfonctionnement mitochondrial **(Fyfe, 2016)**. Dans leur ensemble, ces altérations peuvent contribuer à de nombreux dysfonctionnements cellulaires : altérations des interactions ligands / récepteurs, modifications des interactions cellulaires, activation ou inhibition de voies de signalisation et d'expression de gènes **(Romero et al., 2016)**.

L'atteinte des fonctions cognitives peut avoir plusieurs origines (génétiques, environnementales, mode de vie et nutrition...). Le régime alimentaire est devenu un thème d'intérêt scientifique et médical important pour la prévention des MND. Les nutriments tels que les acides gras, les vitamines et les minéraux, peuvent prévenir le risque de déclin cognitif chez les personnes âgées.

Dans l'objectif de prévenir le déclenchement ou de ralentir la progression de la neurodégénérescence, il est important de concevoir des stratégies et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. A l'heure actuelle plusieurs études prospectives sur différentes molécules ont été réalisées. Ceci souligne l'importance d'identifier des molécules naturelles ou synthétiques afin de protéger les neurones contre la neurodégénérescence.

Parmi les facteurs pouvant influencer la survenue et le développement des MND, notre attention s'est portée sur un neuropeptide, l'ODN, et sur deux polyphénols (resvératrol, apigénine) abondamment présents dans le régime méditerranéen **(Latruffe et al., 2017)**. Ces molécules ont en commun de puissants effets antioxydants leur conférant des propriétés cytoprotectrices.

Pour prévenir la progression des processus de la neurodégénérescence et traiter les MND, il convient de disposer de molécules pouvant s'opposer à la toxicité de facteurs intrinsèques ou environnementaux, ce qui est le cas de l'ODN et des polyphénols, tout en stimulant la neurogenèse afin de prévenir la perte neuronale.

C'est dans ce contexte que l'ODN, le RSV et l'API ont essentiellement été étudiés sur des neurones N2a afin de déterminer si ces molécules étaient aussi capables d'activer la différenciation neuronale et d'aboutir à la formation de neurites (axones et dendrites) permettant la communication entre cellules nerveuses.

1. Extension de la notion d'effets cytoprotecteurs de l'ODN contre le stress oxydant et la mort cellulaire.

Dans cette première partie du travail de thèse, l'effet cytoprotecteur du neuropeptide ODN a été étudié vis-à-vis d'un stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur les cellules N2a.

Il est important d'identifier des molécules antioxydantes cytoprotectrices en raison des faibles capacités de défenses antioxydantes du cerveau ce qui a pour conséquence de rendre cet organe très vulnérable au stress oxydant (**Milton, 2004 ; Infanger *et al.*, 2006 ; Perfeito *et al.*, 2013 ; Cobb & Cole, 2015**). Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre du statut redox d'où la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS): le radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyl ($OH^{\bullet}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). De nombreuses études indiquent que les neurones sont très sensibles au stress oxydant (**Lotharius *et al.*, 2005 ; Infanger *et al.*, 2006 ; Cobb & Cole, 2015**).

Il est bien établi que les cellules astrogliales jouent un rôle majeur dans la régulation du métabolisme cérébral et pour la neuroprotection contre le stress oxydant dans diverses maladies neurodégénératives (**Yoshikawa *et al.*, 2015 ; Arbo *et al.*, 2016**). Les mécanismes moléculaires induits dans la pathogenèse de la MP sont en partie dus à une surproduction de ROS, générées notamment à partir du H_2O_2 , qui entraîne la mort des neurones par apoptose (**Rodriguez *et al.*, 2015**). Contrairement aux neurones, qui sont particulièrement sensibles au stress oxydant, les astrocytes ont une capacité de détoxification des ROS nettement supérieure grâce à la présence de fortes teneurs en molécules antioxydantes, notamment GSH, SOD et de catalase (**Dringen *et al.*, 2000 a ; Dringen, 2000 b ; Takuma *et al.*, 2004**).

De nombreuses études ont montré que la coopération entre astrocytes et neurones est essentielle dans la défense contre le stress oxydant pour la survie neuronale (**Wang *et al.*, 2006 ; Angelova & Abramov, 2014 ; Dzamba *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017**). Les cellules astrogliales jouent également un rôle important dans l'activité et la protection des neurones (**Yang *et al.*, 2008 ; Sofroniew & Vinters, 2010 ; Dossi *et al.*, 2017**) grâce à la libération de facteurs neurotrophiques incluant des neuropeptides (**Dejda *et al.*, 2005 ; Ruiz *et al.*, 2012 ; Skorupa *et al.*, 2013**) telque l'ODN (**Masmoudi-Kouki *et al.*, 2018 ; Ghouili *et al.*, 2018**). Il a été déjà démontré que l'ODN protège les neurones en grain du cervelet contre la mort par apoptose induite par la 6-OHDA en inhibant l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène et la cascade de signalisation conduisant à l'activation de la caspase-3 (**Kaddour *et al.*, 2013**). Sur les cellules gliales en culture, cette action neuroprotectrice de l'ODN est obtenue pour des

concentrations picomolaires et s'atténue progressivement pour de plus fortes concentrations (comprises entre 10^{-11} et 10^{-8} M). De plus, la mesure par LC-MS/MS quantitative indique que la quantité d'ODN détectée dans du milieu conditionné glial (issu d'astrocytes natifs ou activés par le stress oxydant) est dans la même gamme de concentrations que celle nécessaire à l'action neuroprotectrice du peptide sur les neurones en grain contre la mort apoptotique induite par des lésions oxydatives (**Ghouili et al., 2018**). Cela concorde avec des études *in vivo* montrant que l'administration de faible dose d'ODN (10 ng/10 μ L) permet de compenser la vulnérabilité des neurones dopaminergiques au MPTP (**Bahdoudi et al., 2018**). Comme c'est le cas avec l'ODN, d'autres peptides d'origine astrocytaire, *i.e.* l'ADNF, l'ADNP et l'ANP, ne préviennent la mort neuronale induite par différents agents neurotoxiques ou lésions cérébrales qu'à des concentrations sub-fentomolaires (**Dejda et al., 2005 ; Busciglio et al., 2007**). L'ensemble de ces données indique que l'ODN, spécifiquement produit par les cellules astrogliales dans le cerveau (**Tonon et al., 1990 ; Compère et al., 2006**) exerce *via* un mécanisme de type paracrine

Nous avons aussi démontré des effets cytoprotecteurs de l'ODN sur d'autres cellules nerveuses que N2a, à savoir : neuroblastomes humains SK-N-BE, cellules microgliales murines BV-2, gliomes de rat C6 et astrocytomes humains CCF-STTG1.

Les effets neurotoxiques du H_2O_2 sont principalement liés à la production de ROS hautement toxiques qui peuvent engendrer des dommages cellulaires irréversibles, atteignant les constituants cellulaires, *i.e.* lipides, protéines et ADN/ARN. L'ODN, qui ne présente pas d'activité intrinsèque sur la production de ROS, il supprime totalement les dommages oxydatifs du H_2O_2 sur les cellules N2a. Cette action protectrice de l'ODN contre les dommages oxydatifs observée, pourrait être expliquée par sa capacité à stimuler i) la biosynthèse du GSH, le principal dissipateur des ROS, à la fois au niveau des astrocytes et des neurones (**Hamdi et al., 2012b ; Kaddour et al., 2013**) et ii) l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes dans les astrocytes en culture (**Hamdi et al., 2012b**). Grâce à ses propriétés antioxydantes, l'ODN supprime les effets du stress oxydatif sur l'accumulation intracellulaire de ROS, ce qui confirme que l'ODN exerce un puissant pouvoir permettant de s'opposer à la surproduction de ROS. Ces données sont cohérentes avec les études antérieures en montrant que l'ODN induit une stimulation rapide de la transcription et de l'activité d'enzymes antioxydantes, responsables de la détoxification des ROS (**Hamdi et al., 2011; Hamdi et al., 2012**).

Par ailleurs, il est bien admis que la surproduction de ROS peut causer la mort cellulaire par plusieurs mécanismes incluant des dommages des mitochondries qui conduisent à

l'activation des voies apoptotiques (**Masmoudi-Kouki et al., 2011 ; Goswami et al., 2016 ; Bahdoudi et al., 2018**). Des études ont indiqué que l'exposition des cellules astrogliales et neuronales à H₂O₂ diminue l'ATP intracellulaire et provoque une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale (**Choi et al., 2009 ; Bajic et al., 2013 ; Venuprasad et al., 2013**). Au niveau mitochondrial, les résultats obtenus par coloration au DiOC₆(3) montrent que l'ODN s'oppose aux effets délétères de H₂O₂ sur la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, en empêchant sa diminution et à l'activation subséquente des caspases effectrices comme la caspase-3 (**Hamdi et al., 2015**). Nos données sont donc cohérentes avec des études antérieures obtenues sur des astrocytes et les neurones en grain sur lesquels il a été montré que l'ODN stimule l'expression des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et bloque l'expression du gène pro-apoptotique Bax qui sont induit par les molécules pro-oxydantes 6-OHDA et H₂O₂ (**Hamdi et al., 2012 b ; Kaddour et al., 2013**). De plus, nos résultats fournissent de nouvelles informations en démontrant que l'ODN prévient la déstabilisation des lysosomes.

Il est aussi bien connu que le stress oxydant provoque des dommages oxydatifs affectant les macromolécules cellulaires notamment les lipides, les protéines et l'ADN. Ces altérations entraînent la perte de l'intégrité de la membrane plasmique et des fonctionnalités cellulaires conduisant finalement à la mort cellulaire (**Valko et al., 2007**). Sur des astrocytes, l'ODN permet aussi de faire face aux dommages du stress oxydant en réduisant l'accumulation de produits d'oxydation lipidique, des malondialdéhydes, des diènes conjugués, et des composés protéiques carbonylés (**Hamdi et al., 2015**). La partie hydrophobe des phospholipides membranaires constitue une cible importante des ROS dont l'oxydation génère une grande variété de substances très réactives capables d'interagir avec les protéines et les acides nucléiques. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique ; l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) ont été très étudiés comme marqueurs de l'attaque oxydative des lipides membranaires (**Marnett, 2000**) conduisant à des modifications de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. En accord avec ces résultats, nous avons montré une augmentation significative de la perméabilité à l'iodure de propidium traduisant des altérations de la membrane plasmique sous l'effet de H₂O₂ ainsi que des changements importants des profils en lipides neutres et polaires évalués par coloration au Nile Red. En présence d'ODN, les modifications résultant d'un impact du stress oxydant sur les lipides membranaires et intracellulaires sont fortement atténuées démontrant que l'ODN prévient les dommages lipidiques associés au stress oxydant.

Sur le modèle de cellules N2a, à l'instar des résultats obtenus et en accord avec les modèles précédemment utilisés astrocytes et neurones en grain, l'ODN montre des effets cytoprotecteurs de l'ODN (10^{-14} M) en agissant sur différents étapes clés de la dégénérescence où il prévient i) l'altération de la membrane plasmique, ii) la peroxydation lipidique, iii) les altérations mitochondriales, iv) la déstabilisation lysosomale et la mort cellulaire.

Après avoir mis en évidence le rôle de l'ODN dans la régulation du métabolisme oxydatif et la survie cellulaire, notre objectif était de caractériser le type du récepteur et les voies de signalisation impliqués dans le mécanisme d'action de l'ODN sur les astrocytes en culture. Classiquement l'ODN agit en tant que ligand endogène des CBR. Des travaux menés sur les astrocytes en culture (**Patte *et al.*, 1995 ; Gandolfo *et al.*, 1997**) ont montré que l'ODN peut également interagir avec un récepteur métabotrope couplé à une protéine G et pharmacologiquement distinct des récepteurs classiques des BZs. Leprince et ses collaborateurs (**Leprince *et al.*, 2001**) de l'équipe de l'Unité INSERM U982 ont réussi à synthétiser un agoniste du récepteur métabotrope de l'ODN, l'octapeptide ($\text{ODN}_{(1-8)}$, OP), et un puissant antagoniste, le $\text{cyclo}_{(1-8)}[\text{DLeu}^5]\text{OP}$, ligands que nous avons utilisés pour les études pharmacologiques de ce présent travail. Nos résultats montrent que l'effet de l'ODN à promouvoir la survie des cellules N2a est mimé par l'OP, suggérant que l'effet neuroprotecteur de l'ODN implique le récepteur métabotrope. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé des bloqueurs spécifiques des récepteurs métabotropiques de l'ODN et des CBR. Le $\text{cyclo}_{1-8}[\text{DLeu}^5]\text{OP}$ abolit la réponse des cellules N2a à l'ODN, alors que le flumazénil, antagoniste sélectif des CBR, est sans effet sur la réponse des cellules, indiquant que l'action de l'ODN sur la survie des lignées cellulaires N2a est relayé essentiellement par son récepteur métabotrope. Par ailleurs, l'utilisation de ces mêmes antagonistes montre que seul le $\text{cyclo}_{1-8}[\text{DLeu}^5]\text{OP}$ bloque totalement l'effet de l'ODN sur le stress oxydant. Ces résultats indiquent que l'action de l'ODN sur le métabolisme oxydatif met en jeu également le récepteur métabotrope. Des études de liaison réalisées sur des préparations membranaires neuronales (**Guidotti A *et al.*, 1983**) ont révélé que l'ODN présente une affinité micromolaire pour les CBR. Dans le présent travail, nous montrons que les actions de l'ODN sur la survie cellulaire et l'activité des enzymes antioxydantes sont obtenues avec une *effective dose 50* (ED50) de l'ordre pM, ce qui écarte une interaction de l'ODN avec les récepteurs CBR, de faibles affinités. De plus, il a été démontré que l'ODN, testé dans la même gamme de concentrations que notre étude, stimule le métabolisme des polyphosphoinositides et augmente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via un site de haute affinité différent des CBRs, dans les astrocytes en culture. Enfin, il a été rapporté que l'ODN, en interagissant avec son récepteur métabotrope sensible au cyclo_{1-8} .

γ -DLeu⁵ OP, module l'expression des gènes codant pour des enzymes antioxydantes et prévient la mort neuronale induite par la 6-OHDA et le H₂O₂ au niveau des astrocytes et neurones en grain (**Hamdi et al., 2012 b ; Kaddour et al., 2013 ; Hamdi et al., 2015**). Il a aussi été rapporté que l'ODN, à de très faibles concentrations, module l'activité des neurones hypothalamiques en interagissant avec son récepteur métabotrope sensible au γ -DLeu⁵ OP (**Compere et al., 2004 ; Compere et al., 2005**). L'ensemble de ces données indique que l'ODN permet le maintien de la survie des neurones en grain en activant un récepteur métabotrope (**Guidotti et al., 1983**). Des résultats similaires ont été obtenus sur des cultures primaires d'astrocytes de rat. Compte tenu de ces données, le récepteur métabotrope de l'ODN est positivement couplé à la voie de signalisation PLC et AC, nous avons recherché l'importance des voies de transduction PLC / PKC et AC / PKA sur la survie cellulaire. En utilisant différents modulateurs pharmacologiques nous montrons que la réponse des astrocytes à l'ODN est bloquée par l'U73122, un inhibiteur de la PLC, par la chébérythrine, un inhibiteur de la PKC et le H89, un bloqueur de la PKA. Il ressort donc de cette étude que la voie PLC / PKC et AC / PKA participe aux actions de l'ODN sur la protection cellulaire. En accord avec l'importance de la voie AC dans les processus de défense cellulaire contre le stress oxydatif, des travaux menés sur les neurones de l'hippocampe ont montré que l'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc potentialise l'activité du système antioxydant endogène et par voie de conséquence protège les neurones de la mort cellulaire induite par le H₂O₂ (**Lewerenz et al., 2003**). De même, des travaux menés sur les neurones en grain ont démontré que l'augmentation des taux des IP₃ et l'activation de la PKC sont associées aux effets neuroprotecteurs de l'ODN contre le stress oxydatif (**Kaddour et al., 2013**).

L'implication de la voie PLC / PKC dans l'effet cytoprotecteur de l'ODN a conduit à s'intéresser au rôle du calcium dans ce processus. Des expériences réalisées sur astrocytes en culture ont montré que l'ODN était capable de stimuler la PLC qui permet la mobilisation et l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium ([Ca²⁺]_i) (**Patte et al., 1995 ; Gandolfo et al., 1997**). La mobilisation calcique sur astrocytes de rats en culture a été utilisée pour identifier des analogues d'ODN (**Leprince et al., 2001**). La substitution d'un acide aminé dans la région C-terminale de l'ODN par de la L-Alanine réduit, de manière significative, la mobilisation intracellulaire (**Leprince et al., 1998**). Il a été démontré par microscopie confocale à fluorescence sur des astrocytes en culture que la mobilisation de calcium induite par l'ODN survient à des concentrations de l'ordre de 10⁻¹⁰ M et diminue progressivement à des concentrations plus élevées (10⁻⁹ et 10⁻⁸ M) (**Gach et al., 2015**). Nous avons montré sur cellules

N2a que l'ODN conserve son effet sur la mobilisation de calcium en agissant à une concentration plus faible (10^{-14} M). Il a été démontré que l'effet de l'ODN sur le $[Ca^{2+}]_i$ est induit par l'activation d'un récepteur membranaire couplé à une PLC (**Patte et al., 1995**). Les effets sur le métabolisme des polyphosphoinositides ont été totalement bloqués par U73122 (**Smallridge et al., 1992**). Sur cellules N2a, l'addition de U73122 supprime totalement l'augmentation des taux de $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'ODN (10^{-14} M) ce qui suggère que ce neuropeptide en stimulant la PLC activerait la PIP_2 (phosphatidylinositol di phosphate) donnant de l' IP_3 (inositol triphosphate) et du DAG (diacylglycérol) conduisant à la libération de $[Ca^{2+}]_i$. Une augmentation du $[Ca^{2+}]$ libre intracellulaire peut aussi résulter d'une entrée de calcium extracellulaire *via* des canaux $[Ca^{2+}]$ appelés (SOC). L'incubation des cellules N2a avec l'éconazole, bloqueur de la voie SOC, a considérablement diminué les augmentations de $[Ca^{2+}]$ intracellulaire. L'ODN permettrait donc un recrutement du $[Ca^{2+}]_i$ en agissant d'une part *via* la PLC activée par l'ODN lors de la fixation à son récepteur et d'autre part *via* les récepteurs SOC.

2. Effet différenciateur de l'ODN sur cellules nerveuses

Dans cette partie, nous avons démontré que l'ODN induit la différenciation neuronale des cellules N2a. Ce modèle cellulaire est largement utilisé pour étudier la croissance des neurites ainsi que les voies de signalisation impliquées dans le processus de différenciation. La différenciation des N2a déclenche une voie de signalisation PKA / PLC/PKC / MEK/ERK dépendante qui est similaire à celle observée dans la cytoprotection induite par l'ODN (**Masmoudi-Kouki et al., 2018**). Il a été démontré que l'ODN, qui exerce un effet cytoprotecteur, est un antioxydant puissant sur des astrocytes murins, des neurones en grain *in vitro* (**Hamdi et al., 2012 a; Kaddour et al., 2013 ; Ghouili et al., 2018**) et des neurones dopaminergiques *in vivo* (**Bahdoudi et al., 2018**). Il a aussi été décrit que des neuropeptides, tels que le BDNF et le facteur de croissance nerveuse (NGF) présentent en plus de leur activité neuroprotectrice, des activités différenciatrices (**Ebadi et al., 1997 ; Sampaio et al., 2017**). Il est à noter que le neuropeptide PACAP, tout comme l'ODN, a des activités cytoprotectrices à la fois sur les astrocytes et sur les neurones permettant de les protéger contre un stress oxydant (**Botia et al., 2007 ; Masmoudi-Kouki et al., 2011**). Le PACAP est également capable de différencier les cellules PC12 induisant la croissance des neurites (**Vaudry et al., 2002 ; Manecka et al., 2013 ; Ogata et al., 2015**). L'ODN, classé comme facteur neurotrophique endogène, présente également un effet sur la croissance des neurites (axones et dendrites) observé à une concentration de l'ordre du fentomolaire (10^{-14} M) dans un milieu avec ou sans

10 % de SVF. L'effet de l'ODN à prévenir la mort cellulaire neuronale induite par des dommages oxydatifs est aussi observé à des concentrations du même ordre (**Kaddour et al., 2013 ; Bahdoudi et al., 2018**). Une différenciation neuronale associée à une protection contre la mort par apoptose a été observée avec d'autres composés produits par les cellules astrogliales agissant à de faibles concentrations de l'ordre femtomolaire, tels que la protéine neuroprotectrice ADNP (*Activity-dependent neuroprotector*), son dérivé (NAP) ainsi que le facteur neurotrophique ADNF (*activity-dependent neurotrophic factor*) (**Blondel et al., 2000 ; Oz et al., 2012**).

Les études effectuées durant la thèse permettent de définir l'ODN comme un agent neurotrophique puissant : à faibles concentrations, il présente à la fois des activités cytoprotectrices et différenciatrices. Comparativement à l'acide rétinoïque (AR) et aux polyphénols (RSV, API) qui sont capables de différencier les cellules N2a à des concentrations de l'ordre du micro-molaire (μM) (**Namsi et al., 2018**), nous avons démontré que l'ODN (10^{-14} M) stimule la différenciation neuronale des cellules N2a sans effets cytotoxiques (mort cellulaire, altération de la croissance et de l'adhésion cellulaire, perte de l'intégrité membranaire; surproduction de ROS, perte de l'intégrité lysosomale et chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)). Ces altérations ont été évaluées respectivement par les tests FDA, crystal violet, colorations IP, DHR 123, DHE, AO et DiOC₆(3). Des études antérieures sur la cinétique et les relations dose-réponse ont révélé que, même à des doses plus élevées (10^{-12} M à 10^{-8} M), l'ODN est dépourvu d'effets cytotoxiques, quelle que soit la période d'exposition et la dose utilisée (**Hamdi et al., 2012 a ; Hamdi et al., 2015 ; Kaddour et al., 2019**). La réduction des effets de l'ODN sur les cellules N2a à des concentrations élevées (10^{-8}) peut être due en partie à une désensibilisation de ses récepteurs et/ou à la dégradation protéolytique de l'ODN. Au cours de la différenciation neuronale, les cellules acquièrent également de l'excitabilité et commencent à exprimer des gènes d'identité fonctionnelle (**Greene & McGuire, 1978**).

Il était important d'identifier les récepteurs impliqués dans l'effet différenciateur de l'ODN. Nous avons démontré que l'effet cytoprotecteur de l'ODN sur les cellules N2a contre la mort cellulaire induite par H₂O₂, est spécifiquement bloqué par le cyclo₁₋₈[DLeu⁵]OP. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle l'effet différenciateur de l'ODN pourrait aussi faire intervenir des récepteurs métabotropiques. En absence de SVF, la différenciation des cellules N2a a été bloquée par le cyclo₁₋₈[DLeu⁵]OP et par le Flumazénil (antagoniste des récepteurs CBR). En présence de 10 % SVF, nous avons observé un blocage de différenciation seulement en présence du Flumazénil. Pour préciser les voies de signalisation associées à l'effet

différenciateur de l'ODN, différents inhibiteurs liés à la voie de signalisation cytoprotectrice de l'ODN ont été utilisés: H89 (inhibiteur de PKA), U73122 (inhibiteur de PLC), chélérythrine (inhibiteur de PKC) et U0126 (inhibiteur de MEK) (**Masmoudi-Kouki et al., 2018**). Ces différentes molécules, qui inhibent l'activité cytoprotectrice de l'ODN, bloquent aussi son activité différenciatrice. De plus, il a antérieurement été rapporté par Western Blot, que l'ODN, à très faibles concentrations (fentomolaires), stimule la phosphorylation de ERK 1/2 et que les bloqueurs de PKA, PKC et MEK suppriment l'action stimulante de l'ODN, ainsi que son effet cytoprotecteur aussi bien sur les cellules astrogliales que sur les neurones en grain (**Hamdi et al., 2012 a ; Kaddour et al., 2013**). Ces données montrent que la cytoprotection et la différenciation induite par l'ODN ont des voies de signalisation communes. Dans ces deux processus, les voies PKA, PKC, MEK-ERK sont activées. Il est largement admis sur différents modèles cellulaires que la cascade de signalisation associée à PKA et à l'activation de PKC / ERK 1/2 conduit à la phosphorylation d'Akt /PKB (**Noh et al., 2012**), et que l'activation prolongée des MAPK et d'Akt /PKB, similaire à celle observée avec l'ODN, favorise la survie neuronale (**Li et al., 2016 ; Masmoudi-Kouki et al., 2018**). Ceci suggère que la cascade de signalisation PI3K / Akt / PKB pourrait contribuer à l'effet de l'ODN sur la neuroprotection, mais également à la différenciation des N2a. Des études antérieures ont confirmé l'implication des kinases PKA / PLC / PKC / ERK dans l'effet de l'ODN sur la cytoprotection et la différenciation des cellules N2a. Il a été précédemment montré, sur les astrocytes, que l'utilisation d'un analogue d'AMPC ou l'utilisation de la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, imitaient les effets protecteurs de l'ODN sur l'action délétère du stress oxydant (**Hamdi et al., 2012 a**). Il a déjà été signalé que l'activation des voies PKA et PKC favorise la survie des N2a (**Algarni et al., 2018**). Ces données apportent des preuves supplémentaires montrant que les kinases PKA / PLC / PKC / ERK sont impliquées dans les effets de l'ODN dans les processus de cytoprotection et de différenciation des cellules N2a.

La croissance des neurites (dendrites et/ou neurones) exige beaucoup d'énergie d'où la nécessité de stimuler la biogenèse mitochondriale (**Almeida & Vieira HLA, 2017**). De ce fait, l'impact de l'ODN sur la topographie mitochondriale et péroxysomale a été étudié. La redistribution topographique des mitochondries dans l'axone est nécessaire pour privilégier la transmission de l'influx nerveux dans les cellules neuronales différenciées (**Campbell et al., 2014**). Nous avons décrit d'importants changements topographiques des mitochondries et des peroxysomes dans le soma des cellules N2a traitées par l'ODN montrant plusieurs peroxysomes, associés ou non à des mitochondries dans les neurites. Les résultats obtenus montrent que l'ODN influence la répartition topographique des peroxysomes dans le soma et

les neurites des cellules N2a (**Farr et al., 2016**). Il a été démontré par plusieurs auteurs que les mitochondries et les peroxysomes sont étroitement liés ; des interactions physiques et fonctionnelles ont été décrites entre ces deux organites (**Schrader et al., 2015 ; Fransen et al., 2017**). Il est également bien connu que les mitochondries et les peroxysomes jouent un rôle coopératif dans le métabolisme des lipides (acides gras, cholestérol) nécessaire à la biogenèse de la membrane plasmique des neurites (**Sedel et al., 2016**). Il est aussi bien connu que le peroxysome joue un rôle clé dans le métabolisme des lipides et contribue notamment à la β -oxydation des AGTLC et des acides gras à chaîne ramifiée (comme l'acide pristanique), à l' α -oxydation de l'acide phytanique et à la biosynthèse des éthers de phospholipides (plasmalogènes) (**Wanders et al., 2004 ; Schrader & Fahimi, 2008 ; Savary et al., 2012 ; Tromprier et al., 2014**). Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (C <22), métabolisés par les mitochondries, sont essentiels à la croissance et au développement des neurones (**Savary et al., 2012**).

En présence d'ODN (10^{-14} M), aucune différence dans le profil des acides gras n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées. En revanche, dans les cellules traitées par l'ODN, comparativement au contrôle, des augmentations des taux de cholestérol et de certains de ses précurseurs (lanostérol, desmostérol, lathostérol) révèlent des modifications importantes du métabolisme du cholestérol. Nos données suggèrent donc des différences de métabolisme du cholestérol dans les neuroblastes et les neurones matures.

3. Effet différenciateur des polyphénols (Resvératrol, Apigénine) sur les cellules N2a

Les polyphénols sont présents en grande quantité dans le régime méditerranéen qui est riche en fruits et légumes et qui peut être associé à une consommation de vin (**Latruffe, 2017**). Les polyphénols représentent une vaste famille de molécules comprenant les flavonoïdes, les acides phénoliques, les lignans et les stilbènes (le resvératrol) (**Del Rio et al., 2013 ; Santhakumar et al., 2018**). Le groupe des flavonoïdes comprend les flavones (incluant l'apigénine), les flavonols, les flavanones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanines. Les polyphénols sont connus comme des antioxydants puissants. Pour certains d'entre eux, comme le resvératrol et l'apigénine, leurs propriétés antioxydantes sont associées à des propriétés antiprolifératives et anti-inflammatoires ; ces molécules ont aussi la capacité de réduire la production de facteurs de croissance tels que le facteur de croissance à l'insuline-1 (IGF-1) et le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (**Dugas et al., 2010 ; Latruffe & Rifler, 2013**).

Le resvératrol a aussi des activités différenciatrices observées sur des myoblastes (C2C12) entraînant la formation de myotubes (**Lançon et al., 2004**). L'apigénine permet également de différencier les cellules ostéogéniques (cellules souches mésenchymateuses humaines) en agissant sur les voies JNK et p38/MAPK (**Zhang et al., 2015 ; Melguizo-Rodríguez et al., 2018**). L'apigénine différencie les myoblastes en régulant le gène codant pour la protéine arginine N-méthyltransférase 7 (Prmt7) (**Jang et al., 2017**). L'apigénine induit aussi une différenciation granulocytaire des cellules promyélocyaires leucémiques humaines HL60 (**Nakazaki et al., 2013**) et active la différenciation morphologique de cellules neuronales de rat en induisant un arrêt du cycle en (G2+M) (**Sato et al., 1994**). Il a également été signalé que l'apigénine isolée de *Croton betulaster Mull* inhibe la prolifération, induit la différenciation et régule le profil inflammatoire des cellules de gliome de rat C6 (**Coelho et al., 2016**). Pour traiter les maladies liées à l'âge, en particulier les maladies neurodégénératives associées à un stress oxydant et à l'inflammation (**Zarrouk et al., 2014**), les polyphénols, en raison de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, pourraient être utilisés à titre préventif ou même thérapeutique. Plusieurs études révèlent également un bénéfice des polyphénols sur les fonctions cognitives (**Poulose et al., 2017**) ; ainsi le resvératrol empêche l'agrégation de la protéine β -amyloïde associée à la maladie d'Alzheimer (MA) (**Jia et al., 2017**).

Les maladies neurodégénératives (MND) telles que la MA et la maladie de Parkinson (MP) sont caractérisées par une perte neuronale. La neurogenèse pourrait de ce fait être un moyen permettant de prévenir les MND. Dans ce contexte, les neuropeptides produits par le cerveau via les cellules endothéliales et les astrocytes (ODN) forment une famille de molécules appelées neurotrophines (**Kashyap et al., 2018**) présentant des activités cytoprotectrices et différenciatrices. Cependant, pour exercer leurs effets cytoprotecteurs, ces molécules doivent être injectées par voie intracérébrale à proximité des lésions (**Bahdoudi et al., 2018**). En revanche, les polyphénols traversent la barrière hémato-encéphalique et peuvent s'accumuler dans le cerveau ; ils sont beaucoup plus efficace lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse que par voie orale (**Schiborr et al., 2010 ; Ferri et al., 2015 ; Figueira, et al., 2017**) ce qui renforce leur intérêt dans la prévention de certaines maladies neurodégénératives.

Dans ce contexte, il est donc important de préciser si certains polyphénols (resvératrol (RSV), apigénine (API)), présents en quantité significative dans le régime méditerranéen, pourraient favoriser la neurogenèse en particulier la différenciation de neuroblastes en neurones matures caractérisés par la présence de neurites (dendrites et/ou des axones). En utilisant des cellules de neuroblastomes murins N2a, nous avons démontré qu'en présence de concentrations (6.25-50 M) d'API et de RSV, ces cellules se différencient en neurones matures avec des

neurites. Ce phénomène de différenciation implique la voie de signalisation PKC. La différenciation observée avec le RSV et l'API sur les cellules N2a est aussi efficace par rapport à la différenciation induite par l'acide rétinoïque (AR ; utilisé comme contrôle positif), qui chez l'Homme peut provoquer divers effets secondaires en raison de sa capacité à activer ou à réprimer l'expression de nombreux gènes (**Ulrich, 2003**). La différenciation induite par le RSV ainsi que par l'AR est associée à une inhibition de la croissance cellulaire résultant d'une diminution de la viabilité cellulaire évaluée avec le test de la FDA. En revanche, en présence d'API, la différenciation neuronale a peu d'effets sur la croissance et la viabilité des cellules par rapport à ceux observés en présence de RSV suggérant une participation de différents mécanismes permettant la stimulation de la neurogenèse avec ces deux polyphénols. En comparant l'efficacité du RSV et d'API à induire une différenciation neuronale dans un milieu de culture sans sérum (0 %) par rapport à une différenciation dans un milieu de culture contenant 10 % de SVF, nous avons montré que la présence de SVF atténue la différenciation neuronale induite par les deux polyphénols et l'AR, et que le SVF contribue également à l'atténuation de la cytotoxicité induite principalement par l'AR. De plus, la comparaison de la différenciation obtenue en présence de sérum délipidé (10 % de SVF délipidé) par rapport à 10 % de SVF montre une différenciation plus faible en présence de 10 % de SVF délipidé qu'en présence de 10 % de SVF. Par conséquent, la différenciation induite par l'API et le RSV ainsi que par l'AR observée en absence de SVF (0 % SVF) montre que les facteurs exogènes présents dans le sérum ne contribuent pas à la différenciation neuronale. Nos résultats démontrent que certaines protéines sériques neutralisent la différenciation neuronale. Le fractionnement du sérum associé à une analyse protéomique pourrait permettre de répondre à cette question. Il a été rapporté que des facteurs sériques tels que les fractions de globuline α 1- et α 4- inhibent la différenciation neuronale et la croissance des neurites (**Schubert et al., 1969 ; Evangelopoulos et al., 2005**), alors que l'absence de sérum augmente la phosphorylation d'EGFR, ERK 1/2, AKt et d'autres molécules de signalisation dans les cellules N2a (**Evangelopoulos et al., 2005**). Des tests réalisés *in vitro*, en utilisant du sérum de patient au lieu de SVF permettraient d'anticiper l'efficacité des polyphénols *in vivo*.

La capacité du RSV, API et AR à déclencher la différenciation neuronale en absence ou en présence de 10 % SVF est associée à des modifications du cycle cellulaire : RSV et API montre une légère accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire alors que l'AR présente une accumulation des cellules en phase (G2+M).

Toutes ces données montrent la capacité du RSV et d'API à favoriser la différenciation neuronale des cellules N2a. Il sera intéressant d'identifier les voies de signalisation impliquées

dans ce processus pour développer des médicaments efficaces permettant d'optimiser la performance du RSV et de l'API dans la différenciation neuronale.

En se référant à la capacité de certains facteurs neurotrophiques (propriétés cytoprotectrices + propriétés différenciatrices) tel que l'ODN, nous avons utilisé des molécules capables d'inhiber les effets de l'ODN agissant *via* les récepteurs métabotropiques en inhibant les voies de signalisations associées avec différentes molécules: H89 (inhibiteur de PKA), U0126 (inhibiteur de MEK), U73122 (inhibiteur de PLC) et chélérythrine (inhibiteur de PKC) (**Hamdi et al., 2012 a ; Kaddour et al., 2013**). En absence de SVF, l'effet des deux polyphénols (RSV et API) sur la différenciation des cellules N2a a été évalué en inhibant les voies de signalisation par les molécules H89, U0126, U73122 et chélérythrine. Ceci montre une inhibition totale de la différenciation neuronale, confirmant que ces deux polyphénols stimulent simultanément les voies de signalisation PLC / PKC / (MEK / ERK) et PKA / (MEK / ERK), ou bien agissent *via* un récepteur de type métabotrope qui implique simultanément l'activation de PKA et PLC / PKC, conduisant à l'activation de MEK / ERK. Cependant, en présence de 10 % de SVF, des modifications des voies de signalisation activées par RSV et API ont été observées. La différenciation des cellules N2a avec le RSV, montre l'implication de PLC / PKC ainsi que la voie PKA, alors qu'en présence d'API, la différenciation neuronale était indépendante de PKA, PLC / PKC et MEK / ERK. Ainsi, avec RSV, la voie de signalisation impliquée dans le processus de différenciation est PLC / PKC, activée à la fois en absence et en présence de 10 % SVF, alors qu'avec API, les deux voies de signalisation PKA, PLC / PKC et MEK / ERK ont été activées seulement en absence de SVF et aucune de ces voies n'était impliquée en présence de 10 % SVF. La différenciation des cellules N2a induite par l'AR, implique les voies PKA et PLC / PKC à la fois en absence et en présence de 10 % SVF. Les résultats obtenus avec RSV, API et AR confirment que les voies de signalisation précoces impliquées dans la différenciation neuronale des cellules N2a dépendent de l'inducteur considéré et que les activités de différenciation induites par les polyphénols (RSV, API) pourraient impliquer des récepteurs de la membrane plasmique.

Etant donné l'implication de récepteur métabotrope de l'ODN et l'activation simultanée des voies de signalisation PKC et PKA en absence de SVF (**Hamdi et al., 2015 ; Ghouili et al., 2018**), nous avons émis une hypothèse que le RSV et l'API pouvaient stimuler la synthèse du précurseur d'ODN ; DBI (**Costa & Guidotti, 1991**). Dans ces conditions, l'ODN produit, permettrait d'activer les récepteurs métabotropiques de manière autocrine ou paracrine. Les valeurs très faibles de Ct obtenues pour le gène DBI observées aussi bien dans les cellules de contrôle que dans les cellules traitées avec le RSV et l'API excluent cette

hypothèse. De plus, aucun effet du RSV et d'API n'a été observé sur l'expression des ARNm de facteurs de croissance : NGF et BDNF.

Le RSV et l'API montre ainsi une capacité d'induction de différenciation des cellules N2a. Il est connu que la croissance des neurites (dendrites et/ou des axones) nécessite beaucoup d'énergie pouvant solliciter la biogenèse des mitochondries (**Patil et al., 2014**). De plus, il a été démontré que les micronutriments alimentaires (y compris les polyphénols) favorisent le dialogue mitochondrie / noyau, ce qui pourrait favoriser l'expression des gènes tels que ceux impliqués dans la différenciation neuronale (**Qi et al., 2017**).

Dans les cellules neuronales différenciées, une modification topographique des mitochondries tout au long de l'axone est considéré nécessaire afin de favoriser la transmission des impulsions nerveuses (**Almeida & Vieira, 2017**). Plusieurs polyphénols sont connus comme des molécules capables de moduler les voies impliquées dans la biogenèse mitochondriale (induction des sirtuines), l'activité mitochondriale (modulation des complexes I à V, production d'ATP) et le contrôle du statut oxydant intra-mitochondrial (inhibition de la formation des ROS). Les différents avantages de cette famille de composés et notamment du RSV et d'API pourraient être prédominants au niveau mitochondrial (**Xie & Sheppard, 2018**). Les mitochondries jouent un rôle clé dans le métabolisme lipidique, en particulier celui des acides gras nécessaires à la biogenèse des lipides présents dans la membrane des dendrites et des neurones (phospholipides) (**Campbell et al., 2014**). On peut supposer que les effets bénéfiques induits par le RSV et l'API sur les mitochondries pourraient être aussi observés sur d'autres organites (lysosomes, peroxysomes); jouant également un rôle clé dans le contrôle du métabolisme lipidique et dans l'équilibre entre la vie et la mort cellulaire. L'implication de ces mécanismes peut impacter, au moins en partie, la capacité des polyphénols à stimuler la différenciation neuronale.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus sur cellules N2a avec le RSV et l'API montrent que ces polyphénols stimulent la différenciation neuronale ouvrant de nouvelles pistes thérapeutiques permettant de traiter les maladies neurodégénératives. Comme ces polyphénols ont aussi des capacités anti-oxydantes, ils peuvent être considérés comme des nutricaments à profil neurotrophique.

Conclusion & Perspectives

Les résultats obtenus sur cellules murines N2a montrent que l'ODN (10^{-14} M) présente en plus de ses activités cytoprotectrices sur cellules nerveuses (**Ghouili et al., 2018 ; Masmoudi-Kouki et al., 2018**, la capacité d'induire une différenciation neuronale caractérisée par une croissance de neurites (axones et dendrites). L'ODN peut ainsi être considéré comme un facteur neurotrophique endogène.

La différenciation neuronale activée *via* les voies de signalisation PKA / PKC / MEK-ERK, est associée à une redistribution des organites (peroxysomes et mitochondries) le long des axones et/ou des dendrites. L'ODN mis en présence des cellules N2a induit aussi un flux calcique qui fait intervenir la voie PLC / PKC. L'ODN induit également la différenciation des cellules nerveuses humaines SK-N-BE (neurones) et CCF-STTG1 (astrocytes). Ces données renforcent l'intérêt pour ce neuropeptide qui pourrait potentiellement être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies neurodégénératives associées à une perte neuronale telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

De plus, nos résultats ont montré que des molécules exogènes qui sont des nutriments, telles que les polyphénols (RSV, API), sont également capables d'induire une différenciation neuronale en favorisant la croissance des neurites sur cellules N2a. Étant donné que ces polyphénols présentent également des propriétés cytoprotectrices, principalement antioxydantes sur des modèles de neurodégénérescence (**Patil et al., 2014 ; Qi et al., 2017**), les effets différenciateurs observés sur N2a montrent que ces composés ont aussi des propriétés neurotrophiques.

Les perspectives de travail concernant l'ODN et les polyphénols sont les suivantes :

- ***In vitro*** : approfondir les voies de signalisation associées à la différenciation neuronale des polyphénols (RSV, API), de l'ODN et de son agoniste OP sur différents types de neurones (culture primaire, lignées, co-cultures incluant « lab on chips » et organoïdes). L'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées peut être envisagée pour une thérapie ciblée tant avec les polyphénols que l'ODN. Avant une utilisation *in vivo*, des essais *in vitro* seront nécessaires pour définir si le couplage à des nanoparticules ne modifie pas les activités biologiques des molécules considérées.
- ***Etudes cliniques*** : évaluer les propriétés thérapeutiques des polyphénols (RSV, API), de l'ODN et de l'OP selon différentes voies d'administration sur

des patients atteints d'Alzheimer ou de Parkinson pour lesquels l'utilisation de neurotrophines pourraient permettre sinon de guérir tout au moins de réduire la neurodégénérescence.

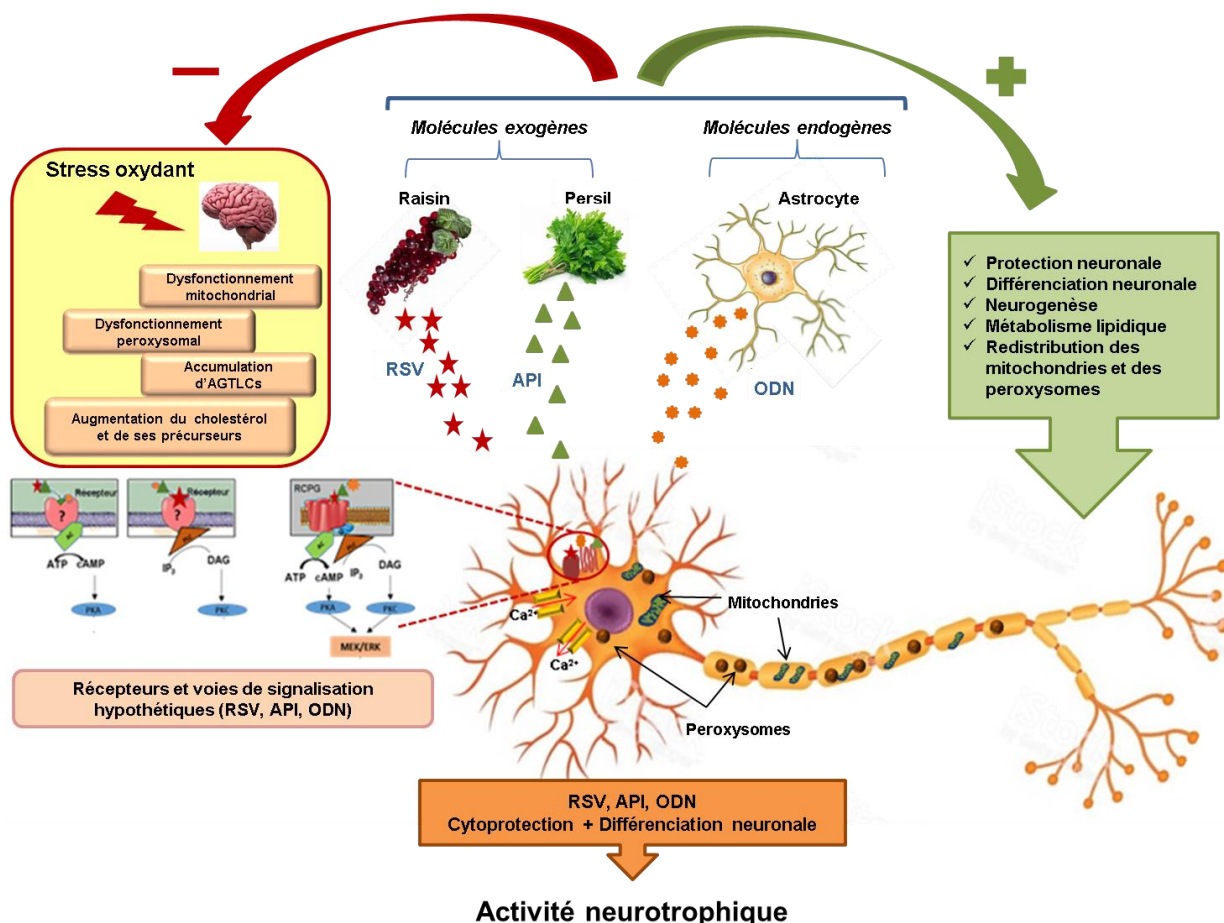


Figure 76 : Représentation schématique de l'activité neurotrophique du RSV, API et ODN
RCPG : Récepteur couplé à une protéine G incluant les récepteurs métabotropiques

Ces travaux sont des preuves de concept qui permettront d'avoir une meilleure connaissance des capacités différenciatrices de l'ODN et des polyphénols pour les utiliser en conditions optimales comme médicaments ou nutriments afin de favoriser la biogénèse neuronale dans des maladies neurodégénératives nécessitant un renouvellement de neurones comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

Références

A

- A, N. (2011). Neurodegenerative diseases and neuroprotectio: current views and prospects. *J App Biomed*, 9, 173-183.
- Ačimović J & Rozman D. (2013). Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis. *Molecules.*, 18(4):4002-17. Review.
- Agostinho P, C. R. (2010). Neuroinflammation, oxida-tive stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. . *CurrPharm Des* , 16(25):2766—78.
- Agrawal G & Subramani S. (2016). De novo peroxisome biogenesis: Evolving concepts and conundrums. *Biochim Biophys Acta.* , 1863(5):892-901.
- Alfonso, J. L. (2012). Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell*, 10, 76-87.
- Alho H, B. P. (1989). Cellular and subcellular localization of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor: immunohistochemical studies in the rat brain. *J Chem Neuroanat*, 2(6):301-18.
- Alho H, C. E.-M. (1985). Diazepam-binding inhibitor : a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science* , 229: 179-82.
- Alho H, F. R. (1988). Diazepam binding inhibitor gene expression: location in brain and peripheral tissues of rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(18): 7018-22.
- Altman J & Das G D. (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. . *Nature.* , 207:953–56.
- Altman J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.*, 145:573–91.
- Amit T, e. a. (2008). Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorativeiron chelators. . *FASEB J* , 22(5):1296—305.
- Amrein I. (2015). Adult hippocampal neurogenesis in natural populations of mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a021295.
- Anding AL & Baehrecke EH. (2017). Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev Cell.* , 41(1):10-22. Review.
- Angelova PR, A. A. (2014). Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of A β -induced neurotoxicity. *Biochem Soc Trans* , 42(5): 1286-90.
- Arbor SC, L. M. (2016). Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. . *Yale J Biol Med.* , 89(1):5-21.
- Arterburn LM, H. E. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. . *Am J Clin Nutr.*, 83(6 Suppl):1467S-1476S.
- Astarita G, J. K. (2010). Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. . *PLoS One.* , 5(9):e12538.
- Axelsen PH, K. H. (2011). Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. . *Physiology (Bethesda).*, 26(1):54-69.

B

- B, B., M, B., A, A., E, R., A, F.-M., L, G.,A, F. (2007). Neurotrophic effects of PACAP in cerebellar cortex. *Peptides*, 28, 1746-1752.
- Baarine M, R. K.-M. (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. . *J. Neurochem.* , 111, 119–131.

- Bahdoudi S, G. I.-K. (2018). Neuroprotective effects of the gliopeptide ODN in an in vivo model of Parkinson's disease. . *Cell Mol Life Sci.* , 75(11):2075-2091.
- Baker A, C. D. (2015). Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism. . *Biochem. Soc. Trans.* , 43, 959–965.
- Balazs Z, P. U. (2004). Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *J Neurochem* , 89:939-50.
- Baldi, I. L.-B. (2003). Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. . *Am J Epidemiol*, 157,409-414.
- Barbaccia, M. L. (1986). Diazepam-binding inhibitor. A brain neuropeptide present in human spinal fluid: studies in depression, schizophrenia, and Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry*, 43, 1143-1147.
- Beffert U, D. K. (1998). The Danik M, neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 27:119-42.
- Beking K, V. A. (2011). Flavonoid intake and disability-adjusted lifeyears due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutr*, 13(9):1403—9.
- Bengzon J, K. Z. (1997.). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. . *Proc Natl Acad Sci*, 94: 10432–10437.
- Berger J, D. F.-P. (2016). Peroxisomes in brain development and function. *Biochim Biophys Acta*, 1863(5):934-55.
- Bergmann O, S. K. (2015). Adult neurogenesis in humans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7:a018994. .
- Berkovich A, M. P. (1990). A natural processing product of rat diazepam binding inhibitor, triakontatetrapeptide (diazepam binding inhibitor 17-50) contains an alpha-helix, which allows discrimination between benzodiazepine binding site subtypes. *Mol Pharmacol*, 37, 164-172.
- Berr, C. P.-G. (2009). Olive Oil and Cognition: Results from the Three-City Study. . *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, 28, 357–364.
- Besman MJ, Y. K. (1989). Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis : stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 4897-901.
- Bhatti JS, B. G. (2017). itochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, 1863(5):1066-1077.
- Birt DF, M. D. (1997). Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. . *Anticancer Res.*, 17:85-91.
- Bishop NA, L. T. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. . *Nature* , 464: 529–535.
- Björkhem I & Meaney S. (2004). Brain Cholesterol FAM. Long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 806–15.
- Bocco A. (1997). *Pouvoir antioxydant des polyphénols extraits de sous-produits d'agrumes*. ENSIA de Massy: thèses des sciences alimentaires.
- Bormann J. (1991). Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) on GABAA receptors. *Neuropharmacology*, 30(12B): 1387-9.
- Bormann J, F. P. (1 985). Neuropeptide modulation of GABA receptor Cl⁻ channels. *Regul Pept*, 4 : 33-8.
- Bothwell M. (2016). Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Res*, 5:1885.

- Bourtchuladze R, et al. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79(1):59–68.
- Boussen S, L. D. (2018). Brain Oxygen Optimization in Severe Traumatic Brain Injury and Outcome. *Crit Care Med.*, 46(4):e349-e350.
- Bovolin P, S. J. (1990). Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. *Regul Pept*, 30;29(2-3):267-81.
- Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev*, 56, 317–333. [.
- Breitling, & R. (2004). Pathogenesis of peroxisomal deficiency disorders (Zellweger syndrome) may be mediated by misregulation of the GABAergic system via the diazepam binding inhibitor. *BMC Pediatr*, 12;4:5.
- Bribes E, C. D.-L. (2004). Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in human tissues. *J Histochem Cytochem*, 52(1):19-28.
- Brown R C, L. A. (2005). Neurodegenerative Diseases: An overview of Environmental Risk Factors. (1250 (9), 1250-1256).
- Brown, R. L. (2005). Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. 9(1250-1256).
- Bu G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*, 10: 333-44.
- Budry, L. B. (2016). DBI/ACBP loss-of-function does not affect anxiety-like behaviour but reduces anxiolytic responses to diazepam in mice. *Behav Brain Res*, 313, 201-207.
- Burke SN, B. C. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*, 7(1):30–40.
- Burlot M-A, B. J.-P. (2015). Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Hum. Mol. Genet*, 24, 5965–5976.
- Burton M, R. T. (2005). Evolution of acyl-CoA binding protein (ACBP). 392(Pt2), 299-307.
- Butterfield D A, R. T. (2007). Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic. Biol. Med.*, 43, 658–677.

C

- Cabral M, A. C. (2006). Genetic evidence that the acyl coenzyme A binding protein AcbA and the serine protease/ABC transporter TagA function together in Dictyostelium discoideum cell differentiation. *Eukaryot Cell*, 5(12):2024-32.
- Calabrese EJ. (2008). Neuroscience and hormesis: overview and general findings. *Crit Rev Toxicol*, 38(4):249–52.
- Canevelli, M. L. (2016). Nutrition and Dementia: Evidence for Preventive Approaches? *Nutrients*, 8, 144.
- Carito V, C. M. (2016). Neurotrophins' modulation by olive polyphenols. *Curr Med Chem*, 23, 3189–3197.
- Carrasquillo MM, A. M. (2017). A candidate regulatory variant at the TREM gene cluster associates with decreased Alzheimer's disease risk and increased TREM1 and TREM2 brain gene expression. *Alzheimers Dement.*, 13(6):663-673.
- Cartocci V, S. M. (2016). Modulation of the Isoprenoid/Cholesterol Biosynthetic Pathway During Neuronal Differentiation In Vitro. *J Cell Biochem.*, 117(9):2036-44.
- Casadesus G, et al. (2004). Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutr Neurosci*, 7(5–6):309–16.

- Chan PH. (2001). Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. . *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.*, 21:2–14.
- Chan YC, e. a. (2006). Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in senescence-accelerated mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 52(4):266—73.
- Chang J.L, T. H. (1996). Carp cDNA sequence encoding a putative diazepam-binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Biochim Biophys Acta*, 1298(1), 9-11.
- Chen CY, e. a. (2005). Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* , 331(4):993—1000.
- Chen G D & Zhao H B. (2007). Effects of intense noise exposure on the outer hair cell plasma 1103 membrane fluidity,. *Hear. Res.*, 14–21.
- Chen JC, e. a. (2005). Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor- κ B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. . *Eur J Pharma-col* , 521(1—3):9—20.
- Chistiakov DA, S. I. (2014). Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. . *BioMed research international*. , 2014:238463. .
- Chkhikvishvili I, S. T. (2016). Constituents of French Marigold (*Tagetes patula* L.) Flowers Protect Jurkat T-Cells against Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*, 4216285.
- Cho DH, K. Y. (2018). Pexophagy: Molecular Mechanisms and Implications for Health and Diseases. *Mol Cells*. , 41(1):55-64. .
- Christian, C. A. (2013). Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20278-20283.
- Christian, C. A. (2013). Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20278-20283.
- Christian, C. A.-F. (2013). Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron*, 78, 1063-1074.
- Chye, M. (1998). Arabidopsis cDNA encoding a membrane-associated protein with an acyl-CoA binding domain. 38(5), 827-838.
- Cipolla CM & Lodhi IJ. (2017). Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases. . *Trends Endocrinol Metab*. , 28(4):297-308.
- CIRAD. (2007, Avril 05). *La nutrition*. Récupéré sur La nutrition.fr: <https://www.lanutrition.fr/forme/les-fruits-et-legumes-les-plus-riches-en-polyphenols>
- Clavaguera F, A. H. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 9535–9540.
- Clavier T, B. E.-S. (2016). Increased hypothalamic levels of endozepines, endogenous ligands of benzodiazepine receptors, in a rat model of sepsis. . *Shock* , 45(6): 653-9.
- Clavier T, T. M. (2014). Increased plasma levels of endozepines, endogenous ligands of benzodiazepine receptors, during systemic inflammation: A prospective observational study. . *Crit Care*, 18(6): 633.
- Cobb CA, C. M. (2015). Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* , 84: 4-21.
- Comley J.C, R. M. (1989). Colorimetric quantification of filarial viability. *Int. J. Parasitol*, 19, 77-83.
- Compere, V. L. (2003). Effect of intracerebroventricular administration of the octadecaneuropeptide on the expression of proopiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNAs in rat hypothalamus. . *J Neuroendocrinol*, 15, 197-203.

- Compere, V. L. (2004). In vivo action of a new octadecaneuropeptide (ODN) antagonist on gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain. *Neuroscience* , 125, 411-415.
- Compere, V. L. (2005). In vivo action of a new octadecaneuropeptide antagonist on neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNA levels in rat. *Brain Res Mol Brain Res* , 141, 156-160.
- Cookson MR. (2017.). RNA-binding proteins implicated in neurodegenerative diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 8: e1397.
- Cooper TA, W. L. (2009). RNA and disease. . *Cell* , 136:777–793.
- Cooper-Kuhn CM, W. J. (2004). Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. . *J Neurosci Res* , 77: 155–165.
- Corona R, L.-S. J. (2011). Paced-mating increases the number of adult new born cells in the internal cellular (granular) layer of the accessory olfactory bulb. *PloS One.* , 6:e19380.
- Cosentino M, M. F. (2000). Diazepam-binding inhibitor-derived peptides induce intracellular calcium changes and modulate human neutrophil function . *J LeukocBiol*, 67(5):637-43.
- Costa E, C. M. (1983). On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepine and beta carboline derivatives.
- Costa E, C. M. (1983). On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepine and beta-carboline derivatives. *Neuropharmacology*, 22, 1481-1492.
- Costa S L, S. V.-A. (2016). Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. *Neurotox Res*, 30, 41–52.
- Csaki C, M. A. (2009). Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 β -induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. . *Arthritis Res Ther.* , 11(6):R165.
- Cunningham D, D. A. (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. . *Hum Mol Genet.* , 24:2808–25.

D

- Dai J, a. M. ((2010)). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. . *Mol. Basel Switz.* , 15, 7313–7352.
- Dasgupta B & Milbrandt J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 7217–7222.
- De Chevigny A & Lledo PM. (2006). Olfactory bulb neurogenesis and its neurological impact. *Med Sci* , 22(6-7):607-13.
- de Mateos-Verchere, J. G. (2001). The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol*, 414, 225-231.
- De Mateos-Verchere, J. G. (2001). The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol*, 414, 225-231.
- De Sampaio e Spohr TC et al.. (2010). Effects of the flavonoid casticin from Brazilian *Croton betulaster* in cerebral cortical progenitors in vitro: direct and indirect action through astrocytes. . *J Neurosci Res* , 88:530–541. .
- Debbabi, M. N. (2016). Protective Effects of α -Tocopherol, γ -Tocopherol and Oleic Acid, Three Compounds of Olive Oils, and No Effect of Trolox, on -Ketocholesterol-Induced Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunction in Microglial BV-2 Cells. *Int J Mol Sci.*, 25;17(12). .

- DeBernadi MA, C. R. (1988). Chromosomal location of the human diazepam binding inhibitor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* , 85 : 6561-5.
- Defraigne, J.-O. a. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. . *Rev. Médicale Liège*, 63, 10.
- Dejda A, S. P. (2005). Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol Rep* , 57(3): 307-20.
- Del Parigi A, P. F. (2006). Nutritional factors, cognitive decline, and dementia.l. *Brain Res Bul*, 15;69(1):1-19.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.*, 18, 1818–1892.
- Delmas D, L. A. (2006). Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. . *Curr Drug Targets*, 7(4):423-42.
- Demeester N, C. G. (2000). Characterization and functional studies of lipoproteins, lipid transfer proteins, and lecithin : cholesterol acyltransferase in CSF of normal individuals and patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res*, 41:963-74.
- Deori NM, K. A. (2018). Peroxisomes: role in cellular ageing and age related disorders. . *Biogerontology.*, 19(5):303-324.
- Depreter M, E. M. (2003). Human peroxisomal disorders . *Microsc Res Tech* , 61(2):203-23. Review.
- Dias G P Cocks G, d. N. (2016). Resveratrol: A Potential Hippocampal Plasticity Enhancer. *Oxid Med Cell Longev*, 9651236.
- DiMauro S & Schon EA. (2008). Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.*, 31:91-123.
- Dizdaroglu M E & Karakaya A. (2012). Advances in DNA Damage and Repair: Oxygen Radical Effects, Cellular Protection, and Biological Consequences. (*Springer Science & Business Media*).
- Doetsch F, G.-V. J.-B. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. . *J Neurosci* , 17 : 5046-61.
- Dominguez-Escriba L, H.-R. V.-N.-V. (2006). Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. . *Eur J Neurosci* , 24: 586–594. .
- Dong, E. M. (1999). Involvement of diazepam binding inhibitor and its fragment octadecaneuropeptide in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Life Sci*, 64, 1779-1784.
- Do-Rego, J. L.-N.-T. (2001). The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem*, 76,128-138.
- Dramane G, A.-A. S. (2012). STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *J Clin Invest*, 122 (6): 2267-82.
- Dringen R, H. J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *BiolChem*, 384(4): 505-16.
- DuBoff B, F. M. (2013). Why size matters - balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. . *Trends Neurosci.* , 36, 325–335.

E

- Ebadi M, B. R. (1997). Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *30*(347-374).

- Ebrahimi-Fakhari D, W. L. (2012). Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. . *Acta Neuropathol*, 124:153–172.
- Eckert A, N. R. (2014). March separate, strike together--role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* , 1842, 1258–1266.
- Ehrnhoefer DE, e. a. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. . *Nat Struct Mol Biol* , 15(6):558—66.
- ELIAS K. (2015). De Biochemie van Peroxisomen.
- Engelhart MJ, e. a. (2004). Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study. . *Arch Neurol*, 61(5):668—72.
- Eriksson PS, P. E.-E. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. . *Nat Med* , 11 : 1313-7.
- Ernst A & Frisén J. (2015). Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. . *PLoS Biol* , 26;13(1):e1002045.
- Exner N, L. A. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J* , 31:3038–3062 .

F

- Fahn S. (2003). Description of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991:1-14.
- Fahy E, C. D. (2011). Lipid classification, structures and tools. . *Biochim. Biophys. Acta* , 1811, 637–647.
- Fahy E, S. S. (2005). A comprehensive classification system for lipids. . *J. Lipid Res.* , 46, 839–861.
- Faigle R & Song H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. . *Biochim. Biophys. Acta.* , 1830(2):2435–48.
- Farrer LA, C. L. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A metaanalysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. . *JAMA*, 278(16):1349– 56.
- Farzaei, M., Abbasabadi, Z., Ardekani, M., Rahimi, R., & Farzaei, F. (2013). Parsley: A review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. . *J. Tradit. Chin. Med.*, 33, 815–826.
- Farzampour Z, R. R. (2015). Endozepines. *Adv Pharmacol*, 72:147-64.
- Ferdinandusse S, J.-S. G. (2014). A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Hum Mol Genet*.
- Ferrarese, C. A. (1990). Cerebrospinal fluid levels of diazepam-binding inhibitor in neurodegenerative disorders with dementia. *Neurology*, 40, 632-635.
- Ferrero, P. B. (1988). Diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity (DBI-LI) in human CSF. Correlations with neurological disorders. . *J Neurol Sci*, 87, 327-349.
- Ferrero, P. S.-T. (1986). Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 827-831.
- Field DT, W. C. (2011). Consumption of cocoa flavanols results in an acute improvement in visual and cognitive functions. . *Physiol Behav* , 103(3—4):255—60.
- Figueira I, Garcia, G., Pimpão, R., Terrasso, A., Costa, I., Almeida, A., . . . al., e. (2017). Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Sci. Rep.*, 7, 11456.
- Folch J, L. M.-S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* , 226, 497–509.

- Frank-Cannon T, A. L. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? . *Mol Neurodegener* , 4:47–60. .
- Fransen M, L. C. (2017). The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? *Int J Mol Sci*, 18(6).
- Fransen, M. e. (2013.). Aging, age-related diseases and peroxisomes. In: del Rio, L.A., editor. Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism. . *Springer*; , p. 45-65. .
- Friedman JR & Nunnari J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*. , 505:335–343. .
- Friesse MA, S. B. (2014). Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. . *Nat Rev Neurol* , 10(4):225-38. .
- Funfschilling U, J. W. (2012). Critical time window of neuronal cholesterol synthesis during neurite outgrowth. . *J Neurosci* , 32(22):7632–45.

G

- G, R. G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in. *J Leukoc Biol.*, 47 (5): 440-8.
- Gage F H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 2, 87, 1433–8.
- Gakhar-Koppole N, H. P. (2008). Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur J Neurosci* , 28:871-882.
- Galli, R. F. (2002). Emx2 regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system. . *Dev Suppl* , 129, 1633–44.
- Gandolfo, P. P. (1997). The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca²⁺ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol*, 322, 275-281.
- Gandolfo, P. P. (1997). The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca²⁺ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol*, 322, 275-281.
- Gao, J. N. (2012). An exploratory analysis on gene-environment interactions for Parkinson disease. . *Neurobiol Aging*., 33, 2528 e2521-2526.
- Gash, D. M. (1996). Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, 380, 252-255.
- Gastaldi G, G. J. (2008). Metabolic syndrome, a mitochondrial disease? . *Revue medicale suisse* , 4:1387–1388. 1390–1381.
- Gelder, B. v. (2007). Fish consumption, n–3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. . *Am. J. Clin. Nutr.*, 85, 1142–1147.
- Gersuk V, R. T. (1995). Molecular cloning and chromosomal localization of a pseudogene related to the human acyl-CoA binding protein/diazepam binding inhibitor. *Genomics*, 25(2), 469-476.
- Gersuk V.H, R. T. (1995). Molecular cloning and chromosomal localization of a pseudogene related to the human acyl-CoA binding protein/diazepam binding inhibitor. *Genomics*, 25(2),469-476.
- Ghouili I, B. S. (2018). Endogenous expression of ODN-related peptides in astrocytes contributes to cell protection against oxidative stress: Astrocyte-neuron crosstalk relevance for neuronal survival. *Mol Neurobiol* , 55(6): 4596-4611.
- Gołembiowska K, W. J.-S. (2013). Effects of adenosine receptor antagonists on the in vivo LPS-induced inflammation model of Parkinson’s disease. . *Neurotox Res* , 24:29–40.

- Gomazkov OA. (2007). Growth and neurotrophic factors in the regulation of stem cell transformation and neurogenesis. *Neirokhimiya*, 24, 101-112.
- Gomes BAQ, S. J. (2018). Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. *Oxid Med Cell Longev.*, 8152373.
- Gonzalez B.J, M, B., D, V., A, F., & H., V. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rt cerebellar neuroblasts. *Neuroscience*, 78, 419-430.
- Goritz C, M. D. (2005). Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. . *Mol Cell Neurosci.*, 29:190–201.
- Gray PW, G. D. (1986). Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of an allosteric regulatory site of the γ -aminobutyric acid type A receptor. 83 . 7547-51.
- Gray, P. (1987). Molecular biology of diazepam binding inhibitor. *Neuropharmacology*, 26(7B), 863-865.
- Guerreiro R & Hardy J. (2013). TREM2 and neurodegenerative disease. . *N Engl J Med.*, 17;369(16):1569-70.
- Guerreiro R, W. A. (2013). Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 variants in Alzheimer's disease. . *N Engl J Med.*, 10;368(2):117-27. .
- Guerrero C, M.-R. M. (2006). Isolation and characterization of a cDNA encoding a membrane bound acyl-CoA binding protein from *Agave americana* L.epidermis. *Plant Physiol Biochem*, 44(1), 85-90.
- Guida M, M. T. (2013). Inhibition of nuclear Nox4 activity by plumbagin: effect on proliferative capacity in human amniotic stem cells. . *Oxid Med Cell Longev.*, 680816.
- Guidotti A, F. C. (1983). Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptidewith agonistic action on benzodiazepine receptors. 80(11):3531-5.
- Guillebaud F, G. C. (2017). Glial endozepines inhibit feeding-related autonomic functions by acting at the brainstem level. . *Front Neurosci*, 11: 308.
- Guitart K, L. G. (2016). Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia*, 64(6): 896-910.
- Guo L, W. L.-P. (2017). Resveratrol Induces Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells. *Stem Cells Int*, 1651325.
- Guzzi, G. D. (2016). Critical reappraisal of DBS targeting for movement disorders. *J Neurosurg Sci*, 60, 181-188.

H

- Haag M. (2003). Essential fatty acids and the brain. . *Can. J. Psychiatry Rev. Can. Psychiatr.*, 48, 195–203.
- Hagg T. (2005). Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: An integrated view. *Trends Neurosci.*, 28(11):589–95.
- Halasz N & Shepherd GM. (1983). Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. . *Neuroscience*, 10 : 579-619.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed.. *Oxford University Press; Oxford*.
- Halliwell B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97(6):1634—58.

- Hamdi Y, K. H.-K. (2012 a). The octadecaneuropeptide ODN protects astrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis via a PKA/MAPK-dependent mechanism. *Plos One*, 7 (8), e42498.
- Hamdi Y, K. H.-K. (2012 b). The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide ODN on astroglial antioxidant enzyme systems is mediated through a GPCR. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 138.
- Hamdi Y, K. H.-K. (2015). Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes. *Peptides*, 71, 56-65.
- Hamdi, Y. M.-K. (2011). Protective effect of the octadecaneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*, 118, 416-428.
- Hamon Y, L. M. (1997). Interleukin-1 beta secretion is impaired by inhibitors of the ATP binding cassette transporter, ABC1. *Blood*, 90 (8), 2911-2915.
- Hampel H & Carrillo MC. (2012). Alzheimer's Disease: Modernizing Concept, Biological Diagnosis and Therapy . (Karger Medical and Scientific Publishers).
- Harborne JB, (. (1993). *Methods in Plant Biochemistry, Plant phenolics*. London: Academic Press.
- Hartman RE, S. A. (2006). Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. . *Neurobiol Dis*, 24(3):506-15.
- Herb A, W. W. (1992). The third gamma-subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 : 1 433-7.
- Hoffman, R. a. ((2013)). *The Mediterranean Diet: Health and Science (John Wiley & Sons)*.
- Hoglinger GU, R. P. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. . *Nat Neurosci*, 7:726-735. .
- Homberg J R, M. R. (2014). The serotonin-BDNF duo: developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev*, 43, 35-47.
- Hruban Z, V. E. (1972). Microbodies: constituent organelles of animal cells. . *Lab Invest.* , 27(2):184-91.
- Hu F & Liu F. (2011). Mitochondrial stress: a bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases? *Cellular signalling.*, 23:1528–1533.
- Huang W J, Z. X. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed. Rep.* , 4, 519–522.
- Hussain G, W. J. (2019). Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis.* , 18(1):26.
- Hwang I, e. a. (2012). Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. . *Diabetes.*, 61:728–738. .

I

- Imanaka T. (2018). Biogenesis, the Function of Peroxisomes, and Their Role in Genetic Disease: With a Focus on the ABC Transporter. . *Yakugaku Zasshi.*, 138(8):1067-1083 Review.
- Impey S, e. a. (1998). Stimulation of cAMP response element(CRE)-mediated transcription during contextual learning. . *NatNeurosci* , 1(7):595—601.
- Infanger DW, S. R. (2006). NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal*, 8(9-10): 1583-96.
- Iovino M, A. S.-R.-H. (2015). Early maturation and distinct tau pathology in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with MAPT mutations. *Brain.* , 138(Pt 11):3345-59.

J

- Jagannatha Rao KS et al.. (2017). Mechanisms, Molecular Pathways in Normal Aging and Neurodegeneration:and Therapeutics. *J Alzheimers Dis*, 60(s1):S1-S2.
- Jang M, C. L. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. . *Science*. , 275(5297):218-20.
- Jarry M, D. M. (2010). The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem J*, 428(1): 113-24.
- Jellinger KA, S. C. (2001). Problems of cell death in neu-rodegeneration and Alzheimer's Disease. . *J Alzheimers Dis.*, 3(1):31—40.
- Johansson O, H. M. (1991). Immunohistochemical localization of porcine diazepam-binding inhibitor (DBI) to rat endocrine pancreas. *Cell Tissue Res* , 263 : 395-8 .
- Johnson Ej & Schaefer Ej. (2006). Potential Role of Dietary N-3 Fatty Acids In The Prevention Of Dementia And Macular Degeneration. *Am J Clin Nutr*, 83:1494s-1498s.
- Joseph JA, e. a. (1999). Reversals of age-related declines in neuronalsignal transduction, cognitive, and motor behavioral deficitswith blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementa-tion. . *J Neurosci* , 19(18):8114—21.
- Joseph JA, S.-H. B. (2005). Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations. *Neurochem Res*, 30(6-7):927-35.
- Julien C, B. L.-T. (2006). Postmortem brain fatty acid profile of levodopa-treated Parkinson disease patients and parkinsonian monkeys. . *Neurochem. Int.* , 48, 404—41.
- Julien C, T. C. (2010). High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. . *Neurobiol. Aging* , 31, 1516—1531.
- Justesen U, K. P. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.*, 799:101-110.

K

- K, A. J. (2004). Oxidative stress in neurodegeneratio: cause or consequence? *supp 5*, 18-25.
- kaddour H, H. Y.-K. (2013). The octadécaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPK-dependent pathway. *J Neurochem*, 620-633.
- Kaddour, H. H. (2013). The octadecaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPKdependent pathway. . *J Neurochem*, 125, 620-633.
- Kang H J, Y. Y. (2011). Antiproliferation and redifferentiation in thyroid cancer cell. *J Korean Med Sci*, 26, 893—899.
- Kao TK, e. a. (2010). Inhibition of nitric oxide production by quer-cetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. . *Life Sci*, 86(9—10):315—21.
- Katakura M, H. M. (2013). Omega-3 polyunsaturated Fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. *Stem Cells Int*, 2013:490476.
- Katsnelson A, D. S. (2016). Neurodegeneration: From cellular concepts to clinical applications. . *Sci Transl Med.* , 9;8(364):364ps18.
- Kaufman S K, S. D.-A. (2016). Tau prion strains dictate patterns of cell pathology, progression rate, and regional vulnerability in vivo. *Neuron*, 23;92(4):796-812.

- Kaur T, e. a. (2008). Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. . *Brain Cogn* , 67(1):25—30.
- Kavaliers M, H. M. (1986). An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. . *Brain Res*, 383 :343-9.
- Kesse-Guyot E, e. a. (2012). Total and specific polyphenol intakes in midlife are associated with cognitive function measured 13 years later. *J Nutr* , 142(1):76—83.
- Khalil, M., Sulaiman, S., & Boukraa, L. (2010). Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorders. . *Open Nutraceut. J.*, 3, 6–16.
- Kim H-Y, M. H.-S. (2011). N-Docosahexaenoyl ethanolamide promotes development of hippocampal neurons. *Biochem. J.* , 435, 327–336.
- Kim JA, W. Y. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. . *Circulation research.*, 102:401–414.
- Kıray H, L. S. (2016). The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Exp Neurol.* , 541–9.
- Kıray H, L. S. (2016). The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. . *Exp Neurol.* , 541–9.
- Knobloch M. (2017). The Role of Lipid Metabolism for Neural Stem Cell Regulation. *Brain Plast*, 3(1):61-71.
- Knoflach F, B. K. (1992). Pharmacological and electrophysiological properties of recombinant GABAA receptors comparing the alpha3, beta1 and gamma2 subunits. *Eur J Neurosci*, 4 : 1-9.
- Koch S, D. N. (2001). Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. *J Lipid Res* , 42:1143-51.
- Kolmer M, R. C. (1994). Tissue-specific expression of the diazepam binding inhibitor in *Drosophila melanogaster*: cloning, structure and localization of the gene. *Mol Cell Biol*, 14(10), 6983-6995.
- Kontush MJ & Chapman A, I. U. (2009, avril 25). *La Lettre de la NSFA n° 43*,. Récupéré sur « Dyslipidémies, Inflammation et Athérosclérose dans les Maladies Métaboliques », Hôpital de la Pitié, Paris: <http://www.nsfa.asso.fr/chercheurs/ressources-medicales/atherosclerose-physiopathologie/hdl-et-maladies-neurodegeneratives?language=fr>
- Kornack DR & Rakic P. (2001). The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 : 4752-7.
- Kou J, K. G.-P. (2011). Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. . *Acta Neuropathol.* , 122(3):271-83.
- Koudinov AR & Koudinova NV. (2001). Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J.*, 15(10):1858–60.
- Kowaltowski AJ, d. S.-P. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. . *Free radical biology & medicine.* , 47:333–343. .
- Kraft AD, J. D. (2004). Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J Neurosci* , 24(5):1101—12.
- Kragelund B.B, P. K. (1999). Conserved residues and their role in the structure, function, and stability of acyl-coenzyme A binding protein. *Biochemistry*, 38, 2386-2394.
- Kravitz BA, C. M. (2009). Elevated C-reactive protein levels are associated with prevalent dementia in the oldest-old. . *Alzheimers Dement* , 5(4):318—23.
- Kuhn HG, E. A. (2015). Detection and phenotypic characterization of adult neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, a025981.

Kuo ML, L. K. (1992). Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. . *Mutat Res.*, 270:87-95.

L

Lacor, P. G. (1990). Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res*, 815, 70-80.

Ladu MJ, R. C. (2000). Lipoproteins in the central nervous system. . *Ann N Y Acad Sci* , 903:167-75.

Lafon-Cazal M, A. O. (2003). Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse. Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *J Biol Chem*, 278(27): 24438-48.

Lai R, C. D. (1973). Structure of carboxystearic acids obtained through the Koch reaction . *Chem Phys Lipids.*, 10(4):291-302.

Lamacz, M. T.-R. (1996). The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*, 37, 290-296.

Lançon A, D. D. (2004). Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. . *Biochem Biophys Res Commun.* , 16;316(4):1132-7.

Lanfray, D. A. (2013). Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes*, 62, 801-810.

Langcake P, P. R. (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia.*, 15;33(2):151-2.

Latruffe N. (2017). Natural Products and Inflammation. *Molecules.*, 12;22(1).

Latruffe N, L. A.-M. (2015). Exploring new ways of regulation by resveratrol involving miRNAs, with emphasis on inflammation. . *Ann N Y Acad Sci.*, 1348(1):97-106.

Latruffe, N. a.-P. (2013). Bioactive polyphenols from grapes and wine emphasized with resveratrol. . *Curr. Pharm. Des.* , 19, 6053–6063.

Laywell ED, R. P. (2000.). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. . *Proc Natl Acad Sci* , 97: 13883–13888.

Ledda F& Paratcha G. (2016). Assembly of neuronal connectivity by neurotrophic factors and leucine-rich repeat proteins. . *Front Cell Neurosci* , 10:199. .

Lee A, H. Y. (2018). Emerging roles of mitochondria in synaptic transmission and neurodegeneration,. *Curr Opin Physiol.*, 3:82-93.

Lee JM, J. J. (2004). An important role of Nrf2-ARE path-way in the cellular defense mechanism. . *J Biochem Mol Biol*, 37(2):139—43.

Leprince J, C. D. (2006). Catabolism of the octadecaneuropeptide ODN by prolyl endopeptidase: identification of an unusual cleavage site. *Peptides* , 27, 1561-1569.

Leprince, J. O. (2001). Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN Design of a potent endozepine antagonist. *Eur J Biochem*, 268, 6045-6057.

Letenneur L, e. a. (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. . *Am J Epidemiol*, 165(12):1364—71.

Letenneur L, e. a. (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol* , 165(12):1364—71.

Li Q, e. a. (2009). Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6J mice by regulating hippocampal cyclic AMP-response element binding protein signaling cascade. . *Neuroscience*, 159(4):1208—15.

- Liao F, Y. H. (2017). Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease. . *Curr Opin Lipidol.* , 28(1):60-67. .
- Lihrmann I, P. J. (1994). Frog diazepam-binding inhibitor: peptide sequence, cDNA cloning and expression in the brain. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 91(15),6899-6903.
- Lin MT & Beal MF. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. . *Nature.* , 19;443(7113):787-95. Review.
- Linetti A, F. A. (2010). Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Sci.* , 123(Pt 4):595–605.
- Lismont C, N. M. (2015). Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front Cell Dev Biol*, 3:35.
- Liu B, T. A. (2017). Astroglia as a cellular target for neuroprotection and treatment of neuropsychiatric disorders. *Glia* , 65(8): 1205-26.
- Liu JP, T. Y. (2010). Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. . *Mol Cell Neurosci Elsevier Inc.*, 43(1):33–42.
- Liu M, Z. T. (2005). AcDNA encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein in *Helicoverpa armigera*: molecular characterization and expression analysis associated with pupal diapause. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 141(2), 168-176.
- Liu S, W. J. (J Neurosci). Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. 2003., 23: 732–736.
- Liu, F.-C. T.-F.-I.-P. (2015). Anti-Inflammatory and Organ-Protective Effects of Resveratrol in Trauma-Hemorrhagic Injury. . *Mediators Inflamm.*, 643763.
- Lizard G, R. O.-M. (2012). Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. *J. Alzheimers Dis. JAD*, 29, 241–254.
- Lo EH, D. T. (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. . *Nature reviews. Neuroscience.* , 4:399–415. .
- Lois C & Alvarez-Buylla A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264 : 1145-8.
- Loomis W.F, B. M. (2010). Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl CoA binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes. *J Biol Chem*, 285(28),21359-21365.
- Losi, G., Puia, G., Garzon, G., Vuono, M., & Baraldi, M. (2004). Apigenin modulates GABAergic and glutamatergic transmission in cultured cortical neurons. . *Eur. J. Pharmacol.*, 502, 41–46.
- Lotharius J, F. J. (2005). Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. . *J Neurosci* , 25(27): 6329-42.
- Lotito SB, Z. W. (2011). Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. . *Free Radic Biol Med.* , 51:454–63.
- Luo X, C. C. (2017). Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. . *Mol Cancer.* , 11;16(1):76.
- Luskin MB, P. J. (1993). Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. . *J Neurosci.* , 13(4):1730-50.

M

- Ma D.K, K. W. (2009). Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. . *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1170:664–73.

- Ma T, T. M. (2014). "Resveratrol as a therapeutic agent for Alzheimer's disease," . *BioMed Research International*, Article ID 350516,13 pages.
- Malagon M, V. H.-a. (1992). Distribution and characterization of endozepine-like immunoreactivity in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. . *peptides*, 13: 99-107.
- Malagon, M. V. (1992). Localization and characterization of diazepam-binding inhibitor (DBI)-like peptides in the brain and pituitary of the trout (*Salmo gairdneri*). . *Brain Res*, 576, 208-214.
- Malagon, M. V.-N. (1993). Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* , 57, 777-786.
- Manabe, Y. T. (2001). Effect of diazepam binding inhibitor (DBI) on the fluid intake, preference and the taste reactivity in mice. *Behav Brain Res*, 126, 197-204.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* , 79, 727–747.
- Mandel S, e. a. (2007). Iron dysregulation in Alzheimer's disease:multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessingneuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents. . *ProgNeurobiol* , 82(6):348—60.
- Mandel SA, e. a. (2008). Mandel SA, et al.. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG). *J Alzheimers Dis*, 15(2):211—22.
- Mandrup S, H. P. (1991). Gene synthesis, expression in *Escherchia coli*, purification and charcterization of the recombinant bovine acyl-COA-binding protein. 276 (*Pt3*), 817-823.
- Mann R K & Beachy P A. (2000). Cholesterol modification of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* , 1529, 188–202.
- Maraldi T, V. D. (2014). Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology . *Oxid Med Cell Longev*, 576363.
- Martinez R & Gomes F. (2002). Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* , 277:49311–49318.
- Masmoudi O, G. P. (2003). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism. *FASEB J*, 17(1): 17-27.
- Masmoudi O, G. P. (2005). Somatostatin downregulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. *J Neurochem* , 94(3): 561-71.
- Masmoudi-Kouki O, G. P. (2006). PACAP stimulates biosynthesis and release of endozepines from rat astrocytes. *Ann N Y Acad Sci* , 1070: 411-6.
- Masmoudi-Kouki O, H. Y. (2018). Neuroprotection with the Endozepine Octadecaneuropeptide, ODN . *Curr Pharm Des*, 24(33):3918-3925.
- Matsuda, K. K. (2010). The anorexigenic action of the octadecaneuropeptide (ODN) in goldfish is mediated through the MC4R- and subsequently the CRH receptor-signaling pathways. *J Mol Neurosci*, 42, 74-79.
- Matsuda, K. W. (2007). Effect of the diazepam-binding inhibitor-derived peptide,octadecaneuropeptide, on food intake in goldfish. *Neuroscience*, 150, 425-432.
- Mattson MP, C. A. (2006). Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. . *Trends Neurosci*, 29(11):632—9.

- Mauch DH, N. K. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* (80-). *American association for the Advancement of Science.*, 294:1354–7.
- McDougall GJ. (2017). Phenolic-enriched foods: sources and processing for enhanced health benefits. *Proc Nutr Soc.*, 76(2):163-171.
- McKay R. (1997). Stem cells in the central nervous system. . *Science* , 276, 66–71.
- Mercado G, V. ' (2013). An ERcentric view of Parkinson's disease. . *Trends Mol Med* 19:165–173 , 19:165–173 .
- Meredith GE, T. S. (2009). Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 219, 334–340.
- Miachon, S. T. (1991). Quantitative evaluation of octadecaneuropeptide-like immunoreactivity in hippocampus, cortex and cerebellum of longterm isolated male Wistar rats. *Neuropeptides*, 19, 179-182.
- Michael T Lin & M Flint Beal. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases , . *Nature* , , vol. 443 p. 787-795.
- Ming GL & Song H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: Significant answers and significant questions. . *Neuron* . , 70(4):687–702.
- Mitsui J, M. I. (2009). Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. . *Arch Neurol* . , 66(5):571-6.
- Mocchetti E, E. R. (1986). Putative diazepam-binding inhibitor peptide : cDNA clones from rat. *Proc Natl Acad Sei USA*, 83 : 7547-51.
- Mogensen IB, S. H. (1987). A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. Effect on fatty acid synthesis. 1;241(1):189-92.
- Möhler H. (2014). Endogenous benzodiazepine site peptide ligands operating bidirectionally in vivo in neurogenesis and thalamic oscillations. *Neurochem Res*, 39(6):1032-6.
- Mohler H, O. T. (1 978). Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by [3H]diazepam binding. *Life Sei* , 22 : 985-96.
- Moosavi F, H. R. (2015). Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. 10(23-42).
- Moreira PI, C. C. (2010). Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. . *Biochim Biophys Acta.*, 1802(1):2-10.
- Moreira PI, C. S. (2006). The key role of mitochondria in Alzheimer's disease,. *J. Alzheimer's Dis*. 9, 101–110.
- Moreira PI, S. M. (2007). Alzheimer's disease: a lesson from mitochondrial dysfunction, *Antioxid. Redox. Signal*. 9 , 1621–1630.
- Mori T, e. a. (2012). Tannic acid is a natural beta-secretaseinhibitor that prevents cognitive impairment and mitigatesAlzheimer-like pathology in transgenic mice. . *J Biol Chem*, 287(9):6912—27.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methos* 65, 55-63.
- Mukherjee S, Z. X. (1989). Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. . *Biophys. J.* , 75, 1915–1925.
- Murphy MP. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. . *The Biochemical journal.* , 417:1–13.
- Mykytczuk NCS, T. J. (2007). Fluorescence polarization in 1100 studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress, . *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 60–82. .

N

- Nadkarni S, J. P. (2008). Astrocytes optimize the synaptic transmission of information. . *PLoS Comput Biol* , 4:e1000088. .
- Nathanson N M. (2012). Regulation of neurokinine receptor signaling and trafficking. *Neurochem. Int.*, 61, 874-878.
- Nelson DL & Cox MM. (2005.). Lipid Biosynthesis. In: Principles of Biochemistry. New York: W.H. Freeman and Company,, 787-815.
- Nielsen SE, Y. J. (1999). Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br J Nutr.* , 81:447-455.
- Nimmerjahn A, K. F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in neocortex in vivo. *Nature Methods*, 1 (1): 31-7.
- Nissant A, B. C. (2009). Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat. Neurosci.*, 12:728–30.
- Nitz I, D. F. (2005). Identification of new acyl-CoA binding protein transcripts in human and mouse. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2395-2405.
- Noori N, D. R.-Z. (2011). Dietary Omega-3 Fatty Acid, Ratio of Omega-6 to Omega-3 Intake, Inflammation, and Survival in Long-term Hemodialysis Patients. . *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* , 58, 248–256.
- Norat, T. B. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. . *J. Natl. Cancer Inst.*, 97, 906–916.
- Nury T, S. R.-M. (2018). Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol: Attenuation by α -tocopherol. *Biochimie*, 153:181-202.
- Nussbacher JK, B. R.-T. (2015). RNA-binding proteins in neurodegeneration: seq and you shall receive. . *Trends Neurosci* , 38: 226–236.

O

- O’Keeffe GC, T. P. ((2009)). Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 106:8754-8759. .
- Oghalai J S, P. A. (1998). Fluorescence-imaged microdeformation of the outer hair cell lateral wall, . *J. Neurosci.* , 48–58. .
- Okonkwo DO, S. L.-A. (2017). Brain Oxygen Optimization in Severe Traumatic Brain Injury Phase-II: A Phase II Randomized Trial. . *Crit Care Med.*, 45(11):1907-1914.
- Omer S, M. D. (2006). Evidence for the role of adenosine 5'-triphosphate-binding cassette (ABC)-A1 in the externalization of annexin 1 from pituitary folliculostellate cells and ABCA1-transfected cell models. . *Endocrinology*, 147(7):3219-27.
- Organ L E & Raphael R M. (2009). Lipid lateral mobility in cochlear outer hair cells: regional differences and regulation by cholesterol, . *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* , 383–396.
- Owens G.P, S. A. (1989). Sequence and expression of the murine diazepam binding inhibitor. *Brain Res Mol Brain Res*, 6(2-3),101-108.

P

- Palmer TD, R. J. (1995.). FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*, 6:474– 486.
- Pandak WM, R. S. (2002). Transport of cholesterol into mitochondria is rate-limiting for bile acid synthesis via the alternative pathway in primary rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 277(50):48158-64.
- Papadopoulos V, L. L. (2009). Translocator protein (18 kDa) TSPO: An emerging therapeutic target in neurotrauma. *Exp Neurol*, 219(1): 53-7.
- Parpura V et al.. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*, 121:4–27.
- Pasinetti G M, W. J. (2015.). “Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer’s disease prevention and treatment,” . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1852, no. 6, pp. 1202–1208,.
- Patte C, G. P. (1999). GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia*, 25(4): 404-11.
- Patte C, V. H. (1995). The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes. *FEBS Lett*, 362(2): 106-10.
- Pelletier G, T. Y. (1991). Localization of endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) and peripheral benzodiazepine receptors in the rat prostate. . *Mol Androl* , 3: 95-108.
- Pencea V, B. K. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. . *Exp Neurol* , 172 : 1-16.
- Peretto P & Paredes RG. (2014). *Social Cues, Adult Neurogenesis, and Reproductive Behavior*. In: Mucignat-Caretta C, editor. *Neurobiology of Chemical Communication* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014. Chapter 13.
- Perfeito R, C.-O. T. (2013). Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free Radic Biol Med* , 62: 186-201.
- Perry V, N. J. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. . *Nat Rev Neurol* , 6:193–201. .
- Pham-Marcou TA, B. H. (2008). Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain.* , 30;140(2):274-83.
- Piecznik SR & Neustadt J. (2007). Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and molecular pathology*., 83:84–92.
- Pratico D, T. J. (2000). Inflammatory hypotheses: novel mechanisms of Alzheimer’s neurodegeneration and new therapeutic targets? . *Neurobiol Aging* , 21(3):441—5 [discussion 451—3].
- Puia G, V. S. (1992). Different sites of action of neurosteroids and benzodiazepines on natural and recombinant GABAA receptors. . *Adv Biochem Psychopharmacol.* , 47: 103-10.

Q

- Qian Z, B. T. (2008). Acyl coenzyme A-binding protein (ACBP) is phosphorylated and secreted by retinal Müller astrocytes following protein kinase C activation. . *J Neurochem*, 105(4): 1287-99.
- Quan G, X. C. (2003). Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. . *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 146, 87–98.

R

- Ramirez MR, e. a. (2005). Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. . *Pharmacol Res*, 52(6):457—62.
- Reddy PH. (2009). Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. . *CNS spectrums*. , 14:8–13. discussion 16-18.
- Remesy C., M. C. (1996). Valorisation des polyphénols végétaux dans les alimentations. *Article Médecine et Nutrition*, T.32_N°1_Intérêts.
- Rendeiro C, e. a. (2013). Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. . *PLoS One* , 8(5):e63535.
- Repa JJ, L. E. (2006). Disruption of the Sterol 27-Hydroxylase Gene in Mice Results in Hepatomegaly and Hypertriglyceridemia Reversal by cholic acid feeding. *J. Biol.Chem.* , 275, 39685–39692.
- Rhéaume E, T. M. (1990). Localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide in the rat testis. *Endocrinology*, 127(4):1986-94.
- Ricciutelli, M., Marconi, S., Boarelli, M., Caprioli, G., Sagratini, G., Ballini, R., & Fiorini, D. (2017). Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim. *J. Chromatogr. A*, 1481, 53–63.
- Richardson, M. A. (1998). A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J. Immunol. Methods*, 219, 187-193.
- Rietze R, P. P. (2000.). Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. . *J Comp Neurol*, 424: 397–408.
- Rose TM, S. E. (1992). Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. 89 : 11287-91. .
- Rothstein, J. D. (1989). Cerebrospinal fluid content of diazepam binding inhibitor in chronic hepatic encephalopathy. *Ann Neurol*, 26, 57-62.
- Rouet-Smih, F. T. (1992). Characterization of endozepine-related peptides in the central nervous system and in peripheral tissues of the rat. *Peptides*, 13,1219-1225.
- Roy, & A. (1991). Cerebrospinal fluid diazepam binding inhibitor in depressed patients and normal controls. *Neuropharmacology*., 30(12B):1441-4.
- Rubinsztein DC. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. . *Nature*. , 19;443(7113):780-6. Review.
- Ruela-de-Sousa RR, F. G. (2010). Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell Death Dis.*, 1:e19. .
- Ruiz C, C. M. (2012). Protection by glia-conditioned medium in a cell model of Huntington disease . . *PLoS Curr* , 4:e4fbca54a2028b.
- Ruscio M.G, S. T. (2008). Pup exposure elicits hippocampal cell proliferation in the prairie vole. *Behav. Brain Res.*, 187(1):9–16.

S

- S, P. (2003). Neurodegeneration: What is it and where are we? *Clin, Invest*, 111:3-10.
- Sabbagh M & Cummings J. (2011). Progressive cholinergic decline in Alzheimer's Disease: consideration for treatment with donepezil 23 symptomatology. . *BMC Neurol* , 11:21. .
- SACN (Scientific Advisory Committee on Nutrition) Committee on Toxicity. (2004). Advice on fish consumption: benefits and risks. London: The Stationary Office.

- Saher G, Q. S. (2011). Cholesterol: a novel regulatory role in myelin formation. *Neuroscientist*, 79–93.
- Salvatore DiMauro & Eric A Schon. (2008). « Mitochondrial Disorders in the Nervous System », . *Annual Review of Neuroscience*, , vol. 31 p. 91-123 .
- Sampaio TB, S. A. (2017). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neural Regen Res*, 12(4):549-557. Review. .
- Sanai N, N. T.-V.-B. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. . *Nature*. , 28;478(7369):382-6.
- Sanai N, T. A.-H. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* , 427 : 740-4.
- Sandberg E, H. A. (1998). Porcine diazepam binding inhibitor occurs in the gamma-cells of porcine and human islets, and modulates pancreatic hormone secretion. *Diabetologia* , 32 : 537 A.
- Sanders D W, K. S. (2014). Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. . *Neuron* , 82, 1271–1288 .
- Sangameswaran L, F. H. (1986). Purification of a benzodiazepine from bovine brain and detection of benzodiazepine-like immunoreactivity in human brain. . *Proc Natl Acad Sci USA* , 83 : 9236-40.
- Santana S, S. I. (2013). Oxidative Stress Enhances Neurodegeneration Markers Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Human Neuroblastoma Cells. *PLoS ONE* , 8, e75842.
- Santello M & Volterra A. (2008). Synaptic modulation by astrocytes via Ca²⁺ -dependent glutamate release. . *Neuroscience* , 158:253–259.
- Santhakumar AB, B. M., & Alvarez-Suarez, J. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food Chem. Toxicol.*, 113, 49–65.
- Sardiello M, P. M. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. . *Science.*, 325(5939):473-7.
- Savary S, T. D. (2012). Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation. *Curr Drug Metab.*, 13(10):1358-70.
- Scalbert A, M. C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. 56(276-282).
- Schieber M & Chandel NS. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. . *Curr. Biol.* , 24, R453–R462.
- Schnell C, H. Y. (2012). Active sulforhodamine 101 uptake into hippocampal astrocytes. *Plos One*, 7 (11).
- Scholey AB, e. a. (2010). Consumption of cocoa flavanols results in acute improvements in mood and cognitive performance during sustained mental effort. *J Psychopharmacol*, 24(10):1505—14.
- Schrader M, C. J. (2015). Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J Inherit Metab Dis*, 38(4):681-702.
- Schreurs B G. (2010). The Effects of Cholesterol on Learning and Memory. . *Neurosci. Biobehav. Rev.* , 34, 1366–1379.
- Schroeter H, e. a. (2007). (-)-epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and upregulates GLUR2 in cortical neurons. . *J Neurochem*, 101:1596—606.
- Schroeter H, e. a. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. . *Biochem J*, 358(Pt 3):547—57.

- Seaborn T, M.-K. O. (2011). Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Curr Pharm Des*, 204-2014.
- Segatto M, D. G. (2013). Analysis of the protein network of cholesterol homeostasis in different brain regions: an age and sex dependent perspective. *J Cell Physiol.* , 228:1561–7.
- Settembre C, D. M. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science.*, 332(6036):1429-33.
- Shankar G M & Walsh D M. (2009). Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Mol. Neurodegener*, 4, 48.
- Shay J, E. H. (2015). Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.*, 181260.
- Shi Y, e. a. (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.
- Shobab LA, H. G. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* , 4(12):841-52. Review.
- Shubair, M. M. (2005). Mediterranean dietary components and body mass index in adults: the peel nutrition and heart health survey. *Chronic Dis. Can*, 26, 43–51.
- Simopoulos, A. (2001). The Mediterranean Diets: What Is So Special about the Diet of Greece? The Scientific Evidence. *J. Nutr.* , 131, 3065S–3073S.
- Singleton, A. B. (2013). The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord* , 28, 14-23.
- Smith M T, P. V. (2001). Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Horm. Behav.*, 39:11–21. .
- Söderberg M, E. C. (1991). Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids.*, 26(6):421-5.
- Sofi, F. A. (2010). Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* , 92, 1189–1196.
- Sousa, M. G. (2015). Prevention of Alzheimer's disease: The role of the Mediterranean diet. *Rev. Nutr.*, 28, 691–703.
- Spalding KL, B. O. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153: 1219–1227.
- Spencer JP, e. a. (2001). Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 31(9):1139—46.
- Spencer JPE, A. E.-E. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys*, 423:148—61.
- Spires TL, H. B. (2005). Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx* , 2(3):423—37.
- Steyaert H, T. M.-R. (1991). Distribution and characterization of endogenous benzodiazepine receptor ligand (endozepine)-like peptides in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology*, 129: 2101-9.
- Stillwell W & Wassall SR. (2003). Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids* , 126, 1–27.
- Strittmatter WJ & Roses AD. (1996). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* , 19: 53-77 .
- Su B, W. ., (2008). Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* 5, 525–532.

- Su G, G. D. (2019). A distal enhancer maintaining Hoxa1 expression orchestrates retinoic acid-induced early ESCs differentiation. *Nucleic Acids Res* , pii:gkz482.
- Sun J, K. P. (2012). *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources and Health Benefits*.
- Swarup V & Julien JP. (2011). ALS pathogenesis: recent insights from genetics and mouse models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35:363-369.
- Szekely CA, e. a. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. . *Neuroepidemiology* , 23(4):159—69.

T

- Taram F, I. E. (2018). Neuroprotection Comparison of Rosmarinic Acid and Carnosic Acid in Primary Cultures of Cerebellar Granule Neurons . *Molecules*. , 13;23(11). .
- Taylor J, M. B. (2013). Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. . *Neurochem Int*, 62:803–819 .
- Taylor JP, B. R. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature.*, 539(7628):197-206.
- Tekedereli I, A. U.-B. (2019). Autophagy is Required to Regulate Mitochondria Renewal, Cell Attachment, and All-trans-Retinoic Acid-Induced Differentiation in NB4 Acute Promyelocytic Leukemia Cells . *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 38(1):13-20.
- Tekpli X, L. N. (2013). DNA methylation at promoter regions of interleukin 1B, interleukin 6, and interleukin 8 in non-small cell lung cancer, *Cancer Immunol. Immunother.*, 337–345. 1.
- Terlecky SR, e. a. (2012). Peroxisomes, oxidative stress, and inflammation. . *World J Biol Chem.* , 3:93–97. .
- Texel SJ & Mattson MP. (2011). Impaired adaptive cellular responses to oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. . *Antioxid Redox Signal.* , 14:1519–1534.
- Thid D, B. J. (2007). DHA-induced changes of supported lipid membrane morphology. . *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* , 23, 5878–5881.
- Tili E, M. J. (2008). Tili E, Michaille JJ, Costinean S, Croce CM. MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease. . *Nat Clin Pract Rheumatol.* , 4(10):534-41.
- Tili E, M. J. (2010). Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGFβ signaling pathway in SW480 cells. *Biochem Pharmacol.* , 15;80(12):2057-65.
- Tobert JA. (2003). Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. . *Nat Rev Drug Discov. Review*, 2(7):517-26. .
- Todd S, N. S. (1992). New chromosomal mapping assignments for argininosuccinate synthetase pseudogene 1, interferon-beta 3 gene, and the diazepam binding inhibitor gene. *Somat Cell Mol Genet*, 18(4),381-385.
- Tokay T, H. R.-K. (2008). Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia*, 56(13): 1380-9.
- Tokay T, M. O. (2005). Beta-amyloid peptides stimulate endozepine biosynthesis in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*, 94(3): 607-16.
- Tokay T, M. O. (2005). Beta-amyloid peptides stimulate endozepines biosynthesis in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*, 94(3), 607-616.
- Toledano A, Á. M.-D. (2016). Brain local and regional neuroglial alterations in Alzheimer's Disease: cell types, responses and implications. . *Curr Alzheimer Res.* , 13(4):321-42. Review.
- Tong Y, T. D. (1991). Localization of diazepam-binding inhibitor (DBI) mRNA in the rat brain by high resolution in situ hybridization. . *Neuropeptides* , 20(1): 33-40.

- Tonon M C, L. J. (2006). Endozepines. (I. K. AJ, Éd.) *Handbook of Biologically Active Peptides New York*(813-819).
- Tonon MC, A. S. (1989). Central-type benzodiazepines and the octadecaneuropeptide (ODN) modulate the effects of γ -aminobutyric acid on the release of α -melanocyte stimulating hormone from frog neurointermediate lobe in vitro. *Neuroscience* , 31:485-93.
- Tonon MC, D. L. (1990). Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides*, 15(1): 17-24.
- Tonon MC, L. D. (2013 a). Hypothalamic glucose-sensing: role of Glia-to-neuron signaling. *Horm Metab Res (Review)*, 45(13):955-9.
- Tonon, M. C. (2013 b). Endozepines In *Handbook of Biologically Active Peptides. n: A.J. Kastin (Ed.)*, Elsevier, 760–765.
- Trollor JN, e. a. (2010). Systemic inflammation is associated with MCI and its subtypes: the Sydney Memory and Aging Study. . *Dement Geriatr Cogn Disord* , 30(6):569—78.
- Trompier D, V. A. (2014). Brain peroxisomes. . *Biochimie* , 98, 102–110.
- Trzeciak AR, N. S. (2004). Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis*, 25(8):1359-70.
- Tsang A H K & Chung K K K. (2009). Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1792, 643–650.
- Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–1246.
- Tvrzicka E, K. L. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease. review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 155(2):117-30.

U

- Ulrich J D & Holtzman D M, U. (2016). TREM2 function in Alzheimer's disease and neurodegeneration. . *ACS Chem. Neurosci.* , 7, 420–427 .
- Ulrich RG. (2003). The toxicogenomics of nuclear receptor agonists . *Curr Opin Chem Biol*, 7(4):505-10. Review.
- Upadhyay S, D. M. (2015). Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxid Med*, 504253.
- Upadhyay S, D. M. (2015). Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.*, 504253.

V

- Valenza M & Cattaneo E. (2006). Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: is Huntington's disease in the list? . *Prog. Neurobiol.* , 80, 165–176.
- Valko M, L. D. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. (39, 44-84).
- van Acker SA, v. d. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. . *Free Radic Biol Med*, 20:331-342.
- Van Veldhoven PP. (2010). Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. . *J Lipid Res* , 51:2863–2895.
- Vanderweyde T, Y. K.-Y. (2013). Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review. . *Gerontology* , 59: 524–533.

- Vauzour D, e. a. (2007). Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. . *J Neurochem*, 103(4):1355—67.
- Venturini I, Z. M. (1998). Diazepam binding inhibitor and total cholesterol plasma levels in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Regul Pept*, 24;74(1):31-4.
- Verkhatsky A & Butt A. (2007). Glial neurobiology: a textbook. 1st edn., doi:10.1002/9780470517796.
- Vidnyánszky Z, G. T. (1994). Diazepam binding inhibitor fragment 33-50 (octadecaneuropeptide) immunoreactivity in the cerebellar cortex is restricted to glial cells. *Glia* , 10(2): 132-41.
- Vijayan M & Reddy PH. (2016). Stroke, Vascular Dementia, and Alzheimer's Disease: Molecular Links. . *J Alzheimers Dis.* , 54:427—443. .
- Vilar M & Mira H. (2016). Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles. *Front Neurosci*, 10:26.
- Visioli F, B. G. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. . *Biochem Biophys Res Commun*, 247(1):60—4.
- Voutilainen M H, A. U. (2015). Therapeutic potential of the endoplasmic reticulum located and secreted CDNF/MANF family of neurotrophic factors in Parkinson's disease. *FEBS Lett*, 589, 3739-3748. .

W

- Wadhwani AR, A. A. (2019). Neuronal Apolipoprotein E4 increases cell death and p-tau release in Alzheimer's disease. . *Ann Neurol.* , doi: 10.1002/ana.25455.
- Walker L C & Jucker M. (2015). Neurodegenerative diseases:Expanding the prion concept. . *Annu. Rev. Neurosci.* , 38,87—103.
- Wallace TC. (2015). Dietary Supplements in Health Promotion . (CRC Press).
- Wanders RJ & Waterham HR. (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited,. *Annu Rev Biochem*, 75:295-332. Review.
- Wanders RJ. (2004). Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab*, 83(1-2):16-27. Review. .
- Wanders RJ. (2014). Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie*, 98:36-44. Review.
- Wang JY, W. L. (2006). Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia mediated inflammation. *Curr Pharm Des* , 12(27): 3521-33.
- Wang X & Michaelis EK. (2010;). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. . *Front Aging Neurosci.* , 2:12. .
- Williams CM, e. a. (2008). Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREBphosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF)levels. . *Free Radic Biol Med* , 45(3):295—305.
- Williams RJ & Spencer JP. (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility forAlzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 52(1):35—45.
- Wong A C Y & Ryan A F. (2015). Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in 539 the cochlea,. *Front Aging Neurosci.*, 58.
- Wu, J. a. (2011). Resveratrol: a cardioprotective substance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1215, 16—21.

X

- Xue-Shan Z, J. P.-H.-H.-S.-X.-S. (2016). Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. . *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*
- Xue-Shan Z, J. P.-H.-H.-S.-X.-S. (2016). Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta.* , 1;456:107-114.

Y

- Yanase H, S. H. (2002). Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. *Arch Histol Cytol*, 65(1):27-36.
- Yang M, Z. Q. (2018). Brain-Targeting Delivery of Two Peptidyl Inhibitors for Their Combination Therapy in Transgenic Polyglutamine Disease Mice via Intranasal Administration. . *Mol Pharm.* , doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00938.
- Yehuda S. (2012). Polyunsaturated fatty acids as putative cognitive enhancers. *Med. Hypotheses* , 79, 456–461.
- Yehuda S, R. S. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. . *Neurobiol. Aging* , 23, 843–853.
- Yin Y, A. P. (2000). Constitutive levels of cAMP-dependent protein kinase activity determine sensitivity of human multidrug-resistant leukaemic cell lines to growth inhibition and apoptosis by forskolin and tumour necrosis factor alpha. *Br J Haematol*, 108(3):565-73.
- Yong-Kee C, S. E. (2012). Mitochondrial dysfunction precedes other sub-cellular abnormalities in an in vitro model linked with cell death in Parkinson's disease. . *Neurotox Res*, 21:185–194 .
- Youdim KA, e. a. (2003). Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. . *J Neurochem* , 85(1):180—92.
- Yu JT, T. L. (2014). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. *Annu Rev Neurosci.*, 37:79-100.
- Yuan P, C. C. (2016). TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. . *Neuron.* , 18;90(4):724-39. .
- Yuan P, C. C. (2016). TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron.* , 92(1):252-264.
- Yuan, X. L. (2000). Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products - its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *Free Radic. Biol. Med*, 28, 208-218.

Z

- Zarrouk A, D. M.-M. (2018). Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease. . *Curr Alzheimer Res.* , 15(4):303-312.
- Zechner R, Z. R. (2012). FAT SIGNALS—lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. . *Cell Metab.*, 15(3):279–91. .

- Zhang J & Liu Q. (2015). Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. . *Protein & cell*, 6:254-264.
- Zhang Y, G. G. (2004). A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther.*, 3:885–93.
- Zito G, P. R. (2013). Antioxidant Status and APOE Genotype As Susceptibility Factors for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Rejuvenation Res.*, 16, 51–56.
- Zoghbi HY & Orr HT. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*, 23:217-247.
- Ztaou S, M. N.-C.-L. (2016). Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. . *J Neurosci.*, 31;36(35):9161-72.
- Zuo H, W. R. (2017). Determining the composition of active Cholesterol in the plasma membrane of single cells by using Electrochemiluminescence. . *ChemElectroChem.*, 4:1677–80.