



**HAL**  
open science

# Préparation et caractérisation d'extraits d'*Argania spinosa* et d'huile d'argan et évaluation de leurs effets neuroprotecteurs *in vivo* et *in vitro*

Asmaa Badreddine

## ► To cite this version:

Asmaa Badreddine. Préparation et caractérisation d'extraits d'*Argania spinosa* et d'huile d'argan et évaluation de leurs effets neuroprotecteurs *in vivo* et *in vitro*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS032 . tel-01499664

**HAL Id: tel-01499664**

**<https://theses.hal.science/tel-01499664>**

Submitted on 31 Mar 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE HASSAN I – Settat – Maroc**  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE – Dijon – France**  
FACULTE DES SCIENCES GABRIEL  
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SANTE

**THESE de DOCTORAT**

**En cotutelle**

Pour l'obtention du titre de

**Docteur**

Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Préparation et Caractérisation d'Extraits**  
***d'Argania spinosa* et d'Huile d'Argan**  
**Et Evaluation de leurs Effets Neuroprotecteurs *In Vivo* et *In Vitro***

Présentée et soutenue publiquement par

**Asmaa BADREDDINE**

Le 13 Décembre 2016

**Membre de jury**

<b>Abdelkhalid ESSAMADI</b>	Université Hassan I, Settat, Maroc	<b>Président du jury</b>
<b>Mohamed BLAGHEN</b>	Université Hassan II, Casablanca, Maroc	<b>Rapporteur</b>
<b>Claude LAMBERT</b>	Université de Saint Etienne, France	<b>Rapporteur</b>
<b>Khadija MOUSTAID</b>	Université Hassan I, Settat, Maroc	<b>Examineur</b>
<b>Pierre ANDREOLETTI</b>	Université de Bourgogne-Franche-Comté, France	<b>Examineur</b>
<b>Gérard LIZARD</b>	Université de Bourgogne-Franche-Comté, France	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Boubker NASSER</b>	Université Hassan I, Settat, Maroc	<b>Directeur de thèse</b>

**Mustapha CHERKAOUI MALKI** Université de Bourgogne-Franche-Comté, France

**Membre invité**

# Avant-propos

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

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

- Laboratoire de Biochimie et Neurosciences (LBN) à la Faculté des Sciences et Technique, Université Hassan 1<sup>er</sup>, Settat, Maroc, pour la partie *in vivo*, sous la direction du Professeur Boubker **NASSER**.

Les travaux de cette thèse ont reçu le soutien financier du Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain (CMIFM, AIMA/10/238, EGIDE) du Programme Hubert Curien (PHC) Volubilis, du Ministère des Affaires Etrangères (France), du programme national d'appui à la recherche sectorielle du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST, Maroc), du Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur de la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique (Maroc), du Fond de Solidarité Prioritaire portant sur la réforme de l'enseignement supérieur marocain (FSP ARESM) et de l'Ecole Doctorale des Sciences et Techniques de l'Université Hassan 1er (Maroc). Ce travail a aussi bénéficié du soutien financier de l'Université de Bourgogne Franche Comté et de son Ecole Doctorale Environnement-Santé ainsi que de l'ASSAD (Louhans, France).

# Dédicaces

*A mes parents,*

*Les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne.*

*A mon chéri Salim*

*En témoignage de mon affection et reconnaissance pour tout ce qu'il m'a donné ; Sans toi je ne serais jamais arrivée jusqu'au là, et cette Thèse n'aurait jamais vu le jour ; je te remercie pour ton soutien et ton amour inconditionnel.*

*Tu n'as jamais hésité à te sacrifier pour ma réussite et mon bonheur.*

*A ma sœur Ilham*

*Je ne trouve pas toujours les mots pour te remercier de l'amour que tu m'as témoigné au cours de ces années, des paroles d'encouragement que tu as su prononcer et du soutien extraordinaire que tu m'as offert.*

*A mes frères, Jalal, Younes et Simo*

*A toute la famille Badreddine*

*A ma belle-famille*

*En témoignage de leur aide, leur disponibilité et surtout leur compréhension précieuse de ma situation dont je suis reconnaissante.*

*A mes adorables neveux, Nizar, Yasmine, Nada et Simo*

*A mes belles sœurs, Nadia, Meriem, Siham et Nouha*

*A mes beaux-frères, Larbi, Nawfal et Oussama*

*A mes amis, cette Thèse est la vôtre.*

# **Remerciements**

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent  
du bonheur; elles sont les charmants jardiniers  
par qui nos âmes sont fleuries.*

Marcel PROUST

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il! Alors j'y cède en disant un grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette Thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au Professeur **Boubker NASSER**, directeur de Thèse au Maroc, pour son soutien, son encadrement, son enthousiasme communicatif et sa confiance. Je lui suis également reconnaissante de son aide scientifique et administrative, de ses conseils et de la patience qu'il m'a accordée tout au long de ce travail.

J'adresse de chaleureux remerciements au Docteur **Gérard LIZARD** directeur de Thèse en France, qui fut pour moi un directeur attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. Je rends hommage à son honnêteté scientifique et morale. Je le remercie également pour les longues heures de travail sur ce manuscrit.

J'adresse mes vifs remerciements à **Abdelkhalid ESSAMADI**, à **Mohamed BLAGHEN** et à **Claude LAMBERT** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier **Khadija MOUSTAID** et **Pierre ANDREOLETTI** de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de Thèse.

Un grand Merci au Professeur **Mustapha CHERKAOUI-MALKI**, Professeur à l'Université de Bourgogne, Membre du Laboratoire de Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique et responsable du PHC Toubkal MA/14/310 au sein du laboratoire pour sa disponibilité, son aide scientifique et administrative, sa gentillesse et ses conseils, ses discussions tout au long de mon séjour au laboratoire à Dijon.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe de Laboratoire Bio-PeroXIL (EA7270, Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique) de l'université de Bourgogne Franche Comté, Dijon.



Merci à *Nathalie, Doriane, Catherine, Pierre, Stéphane, Quentin et Marie-Geneviève* pour votre accueil, votre sympathie. Merci en particulier à **Thomas NURY** pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide.

*Anne Vejux*, je te remercie pour tous les bons moments que l'on a passé ensemble, je me suis réjoui de ton amitié et je n'oublierai jamais nos discussions incessantes, et tes petites expressions bien marrantes. Je n'oublierai jamais quand tu m'appelles «*Asmaaaaaaaaaaaaaaaaa, attention hein...* ». Tu n'arrêtais pas de me taquiner en pauses déjeuner, café, au laboratoire..... C'était sympa!! Merci pour ta bonne humeur. Bravo pour l'ambiance que tu as su créer au laboratoire. Restes toi-même.

Mention spéciale à **El Mostafa KARYM**, qui m'a supporté et m'a permis de me lever motivée, le coeur léger et l'esprit tranquille depuis le début de ma Thèse. Très humblement, je voudrais te dire merci pour ton soutien pendant mes périodes de doutes et pour tes multiples encouragements répétés. Tu as su mettre en musique les paroles de ma composition scientifique. Je suis sincèrement reconnaissante de ton aide, ta collaboration. 11 ans de connaissance n'ont fait que consolider notre amitié, t'es vraiment quelqu'un de bien et j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir comme ami. C'est un peu fou à dire, mais, après toutes ces années, je me rappelle de notre première rencontre, la 1<sup>ère</sup> année SVT, lorsque je suis venue te parler des exercices de mathématique, et tu me répondais sans me regarder.... Tu connais la fin d'histoire. C'était vraiment fou!!

Je présente mes vifs remerciements à ma soeur de coeur **Wahiba**, pour le travail fastidieux qu'elle a fait pour m'aider à écraser les noix d'arganier et récupérer l'amande.

Les rencontres du hasard vous marquent parfois plus que d'autres. Il y a des gens qui marquent leur passage dans ton coeur d'une encre indélébile. Merci à **Nadia MEKAHLI**, une jeune femme passionnée d'écriture et positive, merci pour tes écrits qui m'ont fait du bien et qui m'apaisent aux moments de détresse. Ca va me manquer ton expression du jour «*Asma, regardes le côté positif des choses; la vie est belle, le ciel est bleu et les oiseaux chantent*». Je te souhaite tout le courage qu'il te faudra pour aller au bout de tes projets.

J'ai développé une spéciale amitié lors de mon stage à Dijon, avec **Meryem DEBBABI, Wiem MEDDEB, Maryem BEZZINE**. Merci les filles pour nos fous rires, nos délires en pause café et en pause déjeuner, qui m'ont toujours touché. On a passé d'agréables moments ensemble, ça va beaucoup me manquer.

Merci du fond du coeur à mes collègues au Maroc (*Talal, Soufiane, Abdelbasset, Riad, Fatiha, Ikram, Fatima-zahra, Laarbi*), qui ont tous participé à la bonne ambiance du labo, et avec qui j'ai passé des moments inoubliables. *Talal et Soufiane*, mon duo préféré et mes deux amis de lycée, merci pour vos sourires, votre bonne humeur et votre gentillesse. Tous ces délires, fous rires et discussions sur tout et n'importe quoi m'ont apporté toute la bonne humeur dont j'avais besoin pour cette Thèse. Je ne raterai pas cette occasion pour vous remercier vivement pour le jour du sacrifice de mes rats. Ce n'était pas toujours facile, mais avec votre persévérance et encouragements, nous avons pu finir le travail.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à mes amies : *Houda, Ilham, Sanaa, Jihane, Fadwa, Zineb, Houda, Zineb, Sarah, Asmaa et Hanane* pour leurs soutiens et leurs encouragements tout au long de ma Thèse. Et comme on garde toujours le meilleur pour la fin, je tiens à remercier chaleureusement mes chères cousines: *Mouna, Oumaima* et *Hajar* pour leurs mots d'encouragements dans mes moments de doutes et je leur suis très reconnaissante. La liste des personnes que je dois remercier s'est allongée avec des années et je ne pourrais pas toutes les citer ici par crainte d'en oublier, mais qui se reconnaîtront.

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

# Résumé

**Résumé :** Parmi les huiles naturelles, l'huile d'argan suscite beaucoup d'intérêt. Elle a été utilisée en médecine traditionnelle, en usage externe par les femmes berbères pour les soins corporels et capillaires, et en usage interne pour prévenir certaines maladies cardiovasculaires. L'huile d'argan se caractérise par ses fonctions hypocholestérolémiantes, anti-diabétique et antiproliférative sur des lignées cancéreuses humaines de prostate. Riche en acides gras insaturés, l'huile d'argan est caractérisée également par ses composés mineurs : polyphénols, tocophérols et stérols qui lui confèrent des propriétés antioxydantes. Le rôle des antioxydants alimentaires dans la fonction neurologique et dans certaines maladies liées à l'âge est centrée sur la vitamine E qui est une molécule majoritaire de l'huile d'argan dotée. L'objectif de ce travail a consisté dans un premier temps en une étude phytochimique et en une évaluation du pouvoir antioxydant des extraits d'arganier de deux régions marocaines. Une caractérisation biochimique de la composition de l'huile d'argan a aussi été réalisée. Dans un second temps, une évaluation des effets protecteurs de l'huile d'argan ou certains de ces composés majoritaires a été réalisée *in vitro* sur des oligodendrocytes murins 158N et *in vivo* sur des rats. ces effets ont été spécifiés dans un environnement pro-oxydant et cytotoxique mimé par le 7-cétocholestérol (7KC) et l' $\text{AlCl}_3$ . La cytotoxicité du 7KC induit divers effets au niveau de la mitochondrie (modification fonctionnelle), ce qui conduit à une rupture de l'équilibre RedOx (surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène), à une induction d'apoptose et d'autophagie, à une perte d'adhésion, à une diminution de la prolifération et à des dysfonctions du lysosome. Le 7KC affecte aussi l'expression des marqueurs peroxysomaux (ABCD1, ABCD2, ACOX1) ainsi que l'expression de facteur de transcription PPAR $\alpha$  au niveau cellulaire. L'étude *in vivo* réalisée sur des rats Wistar traités à 100 mg/kg d' $\text{AlCl}_3$ , a montré qu' $\text{AlCl}_3$  induit une rupture de l'équilibre RedOx en diminuant les activités des enzymes anti-oxydantes (catalase, superoxyde dismutase, les glutathions) au niveau du cortex, une altération des fonctions cognitives qui ont été étroitement liées aux maladies neurodégénératives, et des modifications des paramètres plasmatiques.  $\text{AlCl}_3$  induit une légère perte du poids corporel des rats tout au long de la période de traitement. Dans son ensemble, le travail réalisé montre que l'huile d'argan est capable de s'opposer au stress oxydatif induit par 7KC et  $\text{AlCl}_3$ . L'huile d'argan pourrait être potentiellement être intéressante pour traiter les maladies neurodégénératives. Elle pourrait exercer des effets cytoprotecteurs et antioxydants ce qui permet d'envisager de nouveaux domaines d'applications pour cette huile.

**Mots clés :** huile d'argan, 7-cétocholestérol, aluminium, neurodégénérescence

# **Abstract**

**Abstract:** Argan oil has lot of interest for human health. It has been used in traditional medicine for several centuries. The rich composition of argan oil in term of tocopherols and unsaturated fatty acid makes it a very interesting oil regarding its potential actions on risk factors for cardiovascular diseases, hyperlipidemia, hypercholesterolemia and hypertension. Argan oil is also used for skin infections. Previous studies have shown the antiproliferative and pro-apoptotic effects on prostate cancer cell lines. The role of dietary antioxidants in neurological function and in some aged related diseases is centered on vitamin E which is a major molecule of argan oil. The objective of this work was 1) to do a phytochemical study and to evaluate the argan extracts antioxidant properties of argan oils from two Moroccan regions, and 2) to characterize the biochemical composition of argan oils used in this study. Third, we evaluated the protective effects of argan oil and of some of its major compounds in vitro on 158N murine oligodendrocytes, and in vivo in the rat. The effects have been specified in a pro-oxidant environment and cytotoxic mimicked by the 7-ketocholesterol (7KC) and AlCl<sub>3</sub>. Different methodologies were used: phase contrast microscopy, fluorescence microscopy, histochemistry, flow cytometry, western blotting, and several biochemical methods. Furthermore, 7KC affect the expression of peroxisomal markers (ABCD1, ABCD3, ACOX1) as well as expression of PPAR $\alpha$  at the cellular level. The results show that argan oil has cytoprotective and antioxidant effects on 158N murine oligodendrocytes. Argan oil is able to attenuate the overproduction of reactive oxygen species, mitochondrial and lysosomal dysfunctions, loss of cell adhesion and decreased proliferation, cell death by apoptosis and autophagy. We investigate also the effect of aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) on brain function and neuronal oxidative stress. Male Wistar rats received daily AlCl<sub>3</sub> 100 mg/kg for 42 days. AlCl<sub>3</sub> exposed group showed a significant reduction in spatial memory performance. Moreover, AlCl<sub>3</sub> – treated rats exhibited a marked deterioration of oxidative markers; SOD, CAT, GSH, and changes in the plasma parameters. AlCl<sub>3</sub> slightly affects the body weight of rat. Argan oils (or some of their compounds) have cytoprotective and antioxidant effects on 158N murine oligodendrocytes. These different molecules attenuate oxidative stress and could be potentially useful for treating neurodegenerative diseases. Argan oil could exert cytoprotective and antioxidant effects which allows to consider new fields of application for this oil. It is possible to envisage that a controlled diet or functional foods with argan oil could help to prevent some forms of neurodegeneration.

**Key words :** argan oil, 7-ketocholesterol, aluminium, neurodegeneration

# Liste des travaux scientifiques

## A. Publications de Recherche

### - Article 1

Meryam Debbabi, Amira Zarrouk, Thomas Nury, Meryem Bezzine, **Asmaa Badreddine**, El Mostafa Karym, Stéphane Grégoire, Lucie Martine, Stéphane Guyot, Lionel Bretillon, Mustapha Cherkaoui-Malki, Thibaut Moreau, Boubker Nasser, Mohammed Hammami, Gérard Lizard. *Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, decosahexanoic acide) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol- induced oxidative stress and oxiaoptophagy on microglial BV-2 cells*, *Int J Mol Sci*. 2016 Nov 25;17(12).

### - Article 2

**Asmaa Badreddine**, El Mostafa Karym, Thomas Nury, Amira Zarrouk, Lucie Martine, Stéphane Grégoire , Lionel Bretillon, Anne Vejux, Mustapha Cherkaoui Malki, Boubker Nasser, Gérard Lizard. *Cytoprotective effects of Argan oils on 7-ketocholesterol - treated murine oligodendrocyte cells*. (Manuscrit en préparation, 2016).

### - Article 3

Zarrouk A, Debbabi M, Bezzine M, Karym EM, **Badreddine A**, Rouaud O, Moreau T, El Ayeb M, Nasser B, Hammami M & Lizard L. *Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease*. *Current Alzheimer Research*, 2016. (Accepté pour publication).

### - Article 4

Karym E M, **Badreddine A**, Nury T, El Kebbaj M S, Latruffe N, Andreoletti P, Cherkaoui-Malki M, Lizard G et Nasser B. *Protective effect of resveratrol on the toxicity induced by iron in the protozoan Tetrahymena pyriformis*. (Manuscrit en préparation, 2016).

### - Article 5

**Badreddine A**, Karym E M, Zarrouk A, Nury T, Kharrassi Y, Nasser B, Cherkaoui Malki M, Lizard G, Samadi. M. *An expeditious synthesis of spinasterol and schottenol, two phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, and evaluation of their biological activities on cells of the central nervous system*. *Steroids*, vol. 99, no. PB, pp. 119–124, 2015.

### - Article 6

Karym E M, El Kharrassi Y, **Baddreddine A**, Andreoletti, Joseph Vamecq, M'Hammed Saïd El Kebbaj, Norbert Latruffe, Gérard Lizard, Boubker Nasser, Mustapha Cherkaoui-Malki. *Nopal Cactus (Opuntia ficus-indica) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease*. *Molecules*, vol. 19, no. 9, pp. 14879–14901, 2014.



## **B. Communications présentées à des Congrès Nationaux et Internationaux**

### **a. Communications Orales**

#### **- Communication orale 1**

**A. Badreddine**, EM Karym, S. El Kamouni, T. Essabraoui, K. Essamadi, K. Moustaid, M. Cherkaoui-malki, G. Lizard, B. Nasser. *Evaluation des effets protecteurs de l'huile d'argan sur la perturbation des fonctions cognitives induite par le chlorure d'aluminium in vivo*. Colloque International « Substances Naturelle ; Stress et métabolisme cellulaire ». 15-16 Décembre à la faculté des Sciences et Techniques de Settat (2016).

#### **- Communication orale 2**

Debbabi M, Meddeb W, **Badreddine A**, Karym EM, Zarrouk A, Nasser B, Cherkaoui-Malki M, Lizard G. *Identification et caractérisation des molécules naturelles biologiquement actives par cytométrie en flux*. Colloque International « Substances Naturelle ; Stress et métabolisme cellulaire ». 15-16 Décembre à la faculté des Sciences et Techniques de Settat (2016).

#### **- Communication orale 3**

Asmaa Badreddine, Meryam Debbabi, El Mostafa Karym, Amira Zarrouk, Wiem Meddeb, Thomas Nury, Boubker Nasser, Gérard Lizard. *Atténuation par l'huile d'argan du stress oxydant et des dysfonctions mitochondriales induites par le 7-cétocholestérol sur des oligodendrocytes murins 158N*. 1er symposium sur les effets bénéfiques de l'huile d'argan sur la santé humaine. 04-05 Mai à la faculté des des Sciences et Techniques d'Errachidia (2016).

#### **- Communication orale 4**

**Badreddine A**, Karym E.M, Meddeb W, Nury T, Zarrouk A, Cherkaoui-Malki M, Nasser B, Lizard G. *Protection par l'huile d'argan de la cytotoxicité induite par le 7-cétocholestérol sur des oligodendrocytes murins 158N et des neurones humains SK-N-BE*. Congrès International : Substances Naturelles et Développement Durable. 19-21 Mai à la faculté des Sciences de Rabat, Maroc (2016).

#### **- Communication orale 5**

Karym E M, **Badreddine A**, Irchad A, El kebbaj M S, Cherkaoui-malki M, Lizard G, Nasser B. *L'effet protecteur d'opuntia ficus indica sur la cytotoxicité induite par le fer : Etude in-vitro chez le protozoaire Tetrahymena pyriformis*. 2ème Edition du Congrès International «Substances Naturelles et Développement Durable ». Université Mohammed V de Rabat, Maroc, Mai 2016.

- **Communication orale 6**

Karym E M, **Badreddine A**, Lizard G. *Substances naturelles et propriétés anti-oxydantes : applications aux maladies liées à l'âge*. Colloque Substances Naturelles : Stress et Métabolisme Cellulaires. 26 et 27 Mai à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I<sup>er</sup>, Settat, Maroc 2016.

- **Communication orale 7**

**Badreddine A**, Karym E.M, Zarrouk A, Nury T, El Kharrassi Y, Cherkaoui-Malki M, Nasser B, Lizard G. *Evaluation des effets cytoprotecteurs d'huiles d'argan sur des oligodendrocytes murins 158N traités au 7-cétocholestérol*. Congrès International Scientifique sur l'Arganier. Agadir, Maroc.18-20 Décembre 2015.

- **Communication orale 8**

Karym E M, **Badreddine A**, Marmouzi I, Moustaid K, Cherkaoui Malki M, Lizard Gerard & Boubker Nasser. *Analyse phytochimique et activité anti-oxydante de la graine de cactus : comparaison entre trois stades et deux régions*. 1<sup>er</sup> Symposium Santé-Environnement-Développement durable. El-Jadida, Maroc. 28 Février 2015.

- **Communication orale 9**

Karym E M, **Badreddine A**, Saih F Z, Moustaid K, Cherkaoui-Malki M, Lizard G et Nasser B. *Profil phytochimique de la raquette de cactus : étude comparative entre deux régions et trois stades de croissance*. Colloque International : Santé, Environnement et Entreprise, Mohamadia, Maroc. 22 Novembre 2014.

- **Communication orale 10**

Karym E M, **Badreddine A**, Moustaid K, Cherkaoui Malki M, Lizard G & Nasser B. *Profil phénolique de la fleur de cactus : étude comparative entre deux régions et trois stades de croissance*. Rencontre Internationale des Jeunes Chercheurs sur les Plantes Aromatiques et Médicinales, octobre 2014.

**b. Communication affichées**

- **Communication affichée 1**

**A. Badreddine**, E M Karym, T. Nury, M. Cherkaoui-malki, B. Nasser, G. Lizard. *Atténuation par l'huile d'argan de la mort cellulaire et du stress oxydant induit par 7-cétocholéstérol sur les oligodendrocytes murins 158N*. Colloque International des substances naturelles : stress et métabolisme cellulaire. 15-16 Décembre à la faculté des Sciences et Techniques de Settat (2016).

- **Communication affichée 2**

Thomas Nury, Meryam Debbabi, Amira Zarrouk, Franck Ménétrier, Randa Sghaier, **Asmaa Badreddine**, El Mostafa Karym, Maryem Bezine, Anne Vejux, Stéphane Savary, Mustapha Cherkaoui-Malki, Thibault Moreau, Patrick Aubourg, Gérard Lizard. *Incidence of 7-ketocholesterol, a cholesterol auto-oxidation product found at enhanced level in the plasma of X-ALD patients, on oligodendrocytes and microglial cells dysfunctions*. 5ème rencontre européenne des peroxysomes. 14-16 Septembre 2016. Université médicale de Vienne.

- **Communication affichée 3**

Karym E M, **Badreddine A**, Nury T, El Kebbaj M S, Latruffe N, Andreoletti P, Cherkaoui-Malki M, Lizard G & Nasser B. *Protective effect of resveratrol on the toxicity induced by iron in the protozoan Tetrahymena pyriformis*. Rencontre Régionale sur le Resvératrol. Dijon, France. 2015.

- **Communication affichée 4**

**Badreddine A**, Karym E M, Essamadi A, Cherkaoui Malki M, Lizard G & Nasser B. « *Etude du profil phénolique et organoleptique de graine d'argania spinosa de deux régions : Nord (Berkane)-Sud (Agadir) Maroc* ». Colloque international sous le thème santé, environnement et entreprise. 21-22 Novembre à la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammadia. 2014.

- **Communication affichée 5**

**Badreddine A.**, Karym E M, El Kharrasi Y, Zarrouk A, Nury T, Doria M, Vejux A, Nasser B, Cherkaoui-Malki M, Lizard G, Samadi M. *An expeditious synthesis of spinasterol and schotenol, two phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, and evaluation of their biological activities on cells of the central nervous system*. 4th ENOR symposium translational research on oxysterols. 18-19 september, Coimbra, Portugal (2014).

- **Communication affichée 6**

**Badreddine A**, Karym E M, Moustaid K, Cherkaoui Malki M, Lizard G & Nasser B. *Etude comparative de l'extraction des composés phénoliques de la graine d'arganier (Argania spinosa L) des deux régions Agadir et Berkane*. Journée nationale « Biologie, Santé et Environnement » 24 Mai 2014 à la faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1<sup>er</sup>, Settat, Maroc (2014).

- **Communication affichée 7**

Karym E M, **Badreddine A**, Essamadi A, Lizard G et Nasser B. *Implication des acides gras à très longue chaîne dans la neurotoxicité induite par le fer*. Journée nationale « Biologie, Santé et Environnement », 24 Mai 2014 à la faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I<sup>er</sup>, Settat, Maroc (2014).

- **Communication affichée 8**

Karym E M, **Badreddine A**, Moustaid K, Cherkaoui-Malki M, Lizard G et Nasser B. *Profile phénolique de la raquette de cactus : étude comparative entre deux régions et trois stades de croissance*. Journée nationale « Biologie, Santé et Environnement », faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I<sup>er</sup>, Settat, Maroc (2014).

- **Communication affichée 9**

El Kharrassi Y, Maata N, Moustaid K, **Badreddine A**, El Mzouri H, El Kebbaj MS, Essamadi AK, Cherkaoui-Malki M, Nasser B. *Antioxidant compounds identification and quantification in seed oil and in essential oil from young cladode of the Moroccan Cactus*. 13<sup>ème</sup> congrès international antioxydants, Marrakech, Maroc (2012).

# Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Aire de répartition de l'arganier au Maroc. ....	<b>4</b>
<b>Figure 2:</b> Arganier .....	<b>6</b>
<b>Figure 3:</b> Fruit de l'arganier .....	<b>7</b>
<b>Figure 4:</b> La noix (graine) d'arganier.....	<b>7</b>
<b>Figure 5:</b> Arganier et nourriture animale.....	<b>9</b>
<b>Figure 6:</b> Procédé traditionnel de fabrication de l'huile d'argan (Charrouf, 1991) .....	<b>11</b>
<b>Figure 7:</b> Machines utilisées pour l'extraction par presse mécanique de l'huile d'argan.....	<b>12</b>
<b>Figure 8:</b> Procédé semi industriel de la fabrication de l'huile d'argan (Charrouf, 1991) .....	<b>13</b>
<b>Figure 9:</b> Structure chimique des tocophérols.....	<b>17</b>
<b>Figure 10:</b> Structure chimique du Schotténol et Spinastérol.....	<b>18</b>
<b>Figure 11:</b> Composés phénoliques de l'huile d'argan.....	<b>19</b>
<b>Figure 12:</b> Les zones de cerveau et la mémoire .....	<b>29</b>
<b>Figure 13:</b> Différents types cellulaires utilisables pour l'étude de la neurodégénérescence...	<b>35</b>
<b>Figure 14:</b> Représentation schématique des étapes du développement oligodendrocytaire (Baumann and Pham-Dinh, 2001).....	<b>36</b>
<b>Figure 15:</b> Mécanismes potentiels des interactions oligodendrocytes - neurones .....	<b>39</b>
<b>Figure 16:</b> Lésions histologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer mises en évidence par des techniques de colorations d'après Kövari <i>et al.</i> (2011) .....	<b>44</b>
<b>Figure 17:</b> Comparaison de sections de cerveau de sujet sain et de sujet atteint par la maladie d'Alzheimer.....	<b>45</b>
<b>Figure 18:</b> Structure de l'APP .....	<b>46</b>
<b>Figure 19:</b> Clivage enzymatique de l'APP.....	<b>48</b>
<b>Figure 20:</b> Stabilité des microtubules, hyperphosphorylation de Tau et dégénérescence neurofibrillaires d'après Mokhtar <i>et al.</i> (Mokhtar et al., 2013) .....	<b>50</b>
<b>Figure 21:</b> Progression de la dégénérescence neurofibrillaire au cours de la Maladie d'Alzheimer.....	<b>52</b>
<b>Figure 22:</b> Absorption quotidienne et distribution de l'aluminium dans l'organisme humain (Gourier-Fréry and Fréry, 2004) .....	<b>61</b>
<b>Figure 23:</b> Ultrastructure mitochondriale.....	<b>68</b>
<b>Figure 24:</b> Chaîne de transport des électrons au niveau mitochondrial .....	<b>70</b>
<b>Figure 25:</b> Identification des peroxysomes par microscopie électronique à transmission.....	<b>73</b>
<b>Figure 26:</b> Cascade d'importation des protéines membranaires peroxysomales .....	<b>74</b>
<b>Figure 27:</b> Schéma de la $\beta$ -oxydation peroxysomale .....	<b>77</b>
<b>Figure 28:</b> Mode d'action des acides gras sur la transcription des gènes par PPAR .....	<b>79</b>

<b>Figure 29:</b> Diverses réactions impliquant soit les ERO, soit les enzymes anti-oxydantes.....	<b>83</b>
<b>Figure 30:</b> Structure du cholestérol .....	<b>86</b>
<b>Figure 31:</b> Structures du cholestérol et de certains dérivés oxydés (oxystérols) (Vejud <i>et al.</i> , 2011).....	<b>87</b>
<b>Figure 32:</b> Différents types d'autophagie.....	<b>94</b>
<b>Figure 33:</b> Carte du Maroc situant les régions de récolte d'arganier .....	<b>99</b>
<b>Figure 34:</b> Principe du test DPPH. ....	<b>104</b>
<b>Figure 35:</b> Réduction du fer ferrique de couleur jaune par les anti-oxydants en fer ferreux de couleur bleu (Test FRAP) .....	<b>104</b>
<b>Figure 36:</b> Etapes d'extraction traditionnelle de l'huile d'argan.....	<b>106</b>
<b>Figure 37:</b> Etapes d'extraction traditionnelle de l'huile d'argan.....	<b>107</b>
<b>Figure 38:</b> Réaction de réduction du MTT en bleu de formazan, catalysée par la succinate-déshydrogénase en présence du coenzyme (NAD) (Test MTT) .....	<b>117</b>
<b>Figure 39:</b> Oxydation de DHE en HE sous l'action de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	<b>118</b>
<b>Figure 40 :</b> Complexation de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) avec le Morin formant un complexe « Al Morin » .....	<b>119</b>
<b>Figure 41:</b> Protocole expérimental de traitement des rats avec le chlorure d'aluminium.....	<b>129</b>
<b>Figure 42:</b> Schéma des tests comportementaux réalisés au cours du traitement avec le chlorure d'aluminium.....	<b>129</b>
<b>Figure 43 :</b> Dispositif de la piscine de Morris avec un exemple de trajectoires suivie par un rat depuis le 1er point de lâché jusqu'à la plateforme invisible .....	<b>131</b>
<b>Figure 44:</b> Entrée du rat dans un bras garnis de récompenses. Les 4 bras garnis sont toujours les mêmes afin d'apprendre à l'animal à ne trouver la nourriture que dans ces 4 bras parmi les 8.....	<b>133</b>
<b>Figure 45:</b> Structures cérébrales étudiées.....	<b>134</b>
<b>Figure 46:</b> Quantité des polyphénols totaux exprimée en mg d'acide gallique / g de matière sèche, contenue dans les différentes parties d'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) de deux régions Agadir (A) Berkane (B) .....	<b>145</b>
<b>Figure 47:</b> Quantité des flavonoïdes exprimée en mg de quercétine / g de matière sèche, contenue dans les différentes parties d'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) des deux régions Agadir (A) et Berkane (B) .....	<b>147</b>
<b>Figure 48:</b> Activité antioxydante exprimée en mg de trolox / g de matière sèche, des différentes parties d'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) des deux régions Agadir (A) et Berkane (B).....	<b>149</b>

<b>Figure 49:</b> Activité antioxydante par la méthode FRAP exprimée en mg de trolox / g de matière sèche, des différentes parties d'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) des deux régions Agadir (A) et Berkane (B) .....	<b>151</b>
<b>Figure 50:</b> Accumulation du chlorure d'aluminium associé ou non aux huiles d'argan, à l' $\alpha$ -tocophérol, spinastérol, schotténol et à l'acide férulique dans les oligodendrocytes murins 158N .....	<b>158</b>
<b>Figure 51:</b> Observation des cellules par microscopie en contraste de phase .....	<b>160</b>
<b>Figure 52:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur la viabilité cellulaire des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>162</b>
<b>Figure 53:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'adhérence cellulaire des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>163</b>
<b>Figure 54:</b> Effets de spinastérol, schotténol et acide férulique sur la croissance cellulaire ..	<b>164</b>
<b>Figure 55:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'activité mitochondriale des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>166</b>
<b>Figure 56:</b> Effets du spinastérol, schotténol et d'acide férulique sur l'activité mitochondriale des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>167</b>
<b>Figure 57:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur le potentiel transmembranaire mitochondriale des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>169</b>
<b>Figure 58:</b> Effet de chlorure d'aluminium associé ou non aux huiles d'argan, à l' $\alpha$ -tocophérol, spinastérol, schotténol et à l'acide férulique sur le potentiel transmembranaire mitochondriale des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>171</b>
<b>Figure 59:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur la production des ions superoxydes des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>173</b>
<b>Figure 60:</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non aux huiles d'argan, à l' $\alpha$ -tocophérol, schotténol, spinastérol et à l'acide férulique sur la production des ions superoxydes des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>175</b>
<b>Figure 61:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'activité des lysosomes des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>177</b>
<b>Figure 62:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>179</b>
<b>Figure 63:</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non avec les huiles d'argan, à l' $\alpha$ -tocophérol, schotténol, spinastérol et l'acide férulique sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes murins 158N .....	<b>181</b>



<b>Figure 64:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur la fragmentation nucléaire induite sur les oligodendrocytes murins 158N .....	<b>183</b>
<b>Figure 65:</b> Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou de l' $\alpha$ -tocophérol sur l'apoptose et l'autophagie induite sur les oligodendrocytes murins 158N ..	<b>185</b>
<b>Figure 66:</b> Incidence du 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'expression des ARNm des gènes ABCD1, ABCD3 sur les oligodendrocytes murins 158N.....	<b>187</b>
<b>Figure 67:</b> Incidence de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'expression des ARNm des gènes PPAR $\alpha$ , ACOX1 et MFP2 sur les oligodendrocytes murins 158N .....	<b>188</b>
<b>Figure 68:</b> Influence du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur la variation du poids corporel.....	<b>190</b>
<b>Figure 69:</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur le nombre d'entrée erronée des rats aux bras de labyrinthe radial .	<b>192</b>
<b>Figure 70:</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur la latence et la distance parcourue par les rats pour rejoindre la plateforme du labyrinthe aquatique Morris .....	<b>194</b>
<b>Figure 71 :</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier n sur la masse relative du foie, reins, rate et poumons.....	<b>196</b>
<b>Figure 72:</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur la masse relative du cerveau, pancréas, coeur et testicules .....	<b>198</b>
<b>Figure 73:</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur l'activité enzymatique de la catalase ( $\mu$ mol/min/mg protéine) de l'hippocampe, cortex et foie .....	<b>202</b>
<b>Figure 74:</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase ( $\mu$ mol/min/mg protéine) de l'hippocampe, cortex et foie.....	<b>204</b>
<b>Figure 75:</b> Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur l'activité enzymatique du glutathion peroxydase ( $\mu$ mol/min/mg protéine) de l'hippocampe et le cortex .....	<b>206</b>
<b>Figure 76:</b> Effet de chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur l'activité du glutathion réduit ( $\mu$ mol/min/mg protéine) de l'hippocampe, cortex et foie.....	<b>208</b>

# **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1:</b> Classification botanique de l'arganier.....	<b>5</b>
<b>Tableau 2:</b> Caractéristiques physicochimiques de l'huile d'argan.....	<b>14</b>
<b>Tableau 3:</b> Pourcentage d'acide gras dans l'huile d'argan .....	<b>15</b>
<b>Tableau 4:</b> Pourcentage des tocophérols dans l'huile d'argan.....	<b>16</b>
<b>Tableau 5:</b> Pourcentage des stérols dans l'huile d'argan .....	<b>18</b>
<b>Tableau 6:</b> Composés phénoliques de l'huile d'argan .....	<b>19</b>
<b>Tableau 7 :</b> Classification des démences (d'après Backchine et Habert 2007) .....	<b>41</b>
<b>Tableau 8:</b> Composition des différents types de gel d'acrylamide .....	<b>122</b>
<b>Tableau 9:</b> Conditions d'utilisation des anticorps primaires pour le western blotting.....	<b>123</b>
<b>Tableau 10:</b> Séquences des différentes amorces utilisées pour les qPCR .....	<b>126</b>
<b>Tableau 11:</b> Conditions de traitement des rats en présence et ou en absence de chlorure d'aluminium avec une alimentation enrichie en huiles (huile d'argan, huile d'olive, huile de colza et poudre de graine d'arganier) .....	<b>128</b>
<b>Tableau 12:</b> Composition chimique de différentes parties de la plante d'Argania spinosa..	<b>143</b>
<b>Tableau 13:</b> Quantité des stérols ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), d'huile d'olive et d'huile de colza.....	<b>153</b>
<b>Tableau 14:</b> Quantité des tocophérols ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), d'huile d'olive et d'huile de colza.....	<b>154</b>
<b>Tableau 15:</b> Quantité d'acide gras ( $\text{g kg}^{-1}$ des lipides totaux) d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), d'huile d'olive et d'huile de colza .....	<b>155</b>
<b>Tableau 16:</b> Quantité des polyphénols exprimés en équivalent quercétine $\text{mg} / 100 \text{ g}$ d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), d'huile d'olive et d'huile de colza.....	<b>156</b>
<b>Tableau 17 :</b> Capacité anti-oxydante des huiles d'argan (alimentaire et cosmétique), vitamine E et acide férulique.....	<b>157</b>
<b>Tableau 18:</b> Concentration en aluminium en ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tissu frais).....	<b>189</b>
<b>Tableau 19:</b> Effet de chlorure d'aluminium associé ou non associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur les paramètres lipidiques, rénaux, glycémiques et hépatiques.....	<b>200</b>

# **Liste des abréviations**



**AAPH** :  $\alpha,\alpha$ -Azodiisobutyramidine dihydrochloride  
**24S-OHC** : 24(S)-hydroxycholestérol  
**27-OHC** : 27-hydroxycholestérol  
**4-HNE** : Hydroxynonenal  
**7KC** : 7-cétocholestérol  
**ADP** : Adénosine diphosphate  
**AGLC** : Acides gras à longue chaîne  
**AGMI** : Acide gras monoinsaturé  
**AGPI** : Acide gras polyinsaturé  
**AGTLC** : Acide gras à très longue chaîne  
**Al** : Aluminium  
**ALAT** : Alanine aminotransférase  
**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'Aluminium  
**AO** : Acridine orange  
**AOAC**: The Association of Analytical Communities  
**APP** : Amyloïd Precursor Protein  
**As** : Arsenic  
**ASAT** : Aspartate aminotransférase  
**ATP** : Adénosine tri-phosphate  
**BSTFA** : Bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide  
**CAT** : Catalase  
**Cd** : Cadmium  
**CMHII** : Complexe majeur histocompatibilité type II  
**Ct** : Cycle Thershold  
**Cu** : Cuivre  
**DHA** : Acide docosahexaénoïque  
**DHE** : Dihydroethidine  
**DiOC<sub>6</sub>(3)** : 3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide  
**DL** : Dose létale  
**DLT** : Dépression à long terme  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**DMF** : Diméthyle fumarate

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**DNF** : Dégénérescence neurofibrillaire  
**DPPH** : Diphényl picryl-hydrate  
**DTNB** : 5-5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)  
**EAG** : Acide gallique  
**EBr** : Extrait brut  
**EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique  
**ELi** : Extrait Lipidique  
**ENI** : Extrait non lipidique  
**EQ** : Equivalent quercétine  
**ERO** : Espèce réactive de l'oxygène  
**FADH<sub>2</sub>** : Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée  
**Fe** : Fer  
**Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique  
**FRAP** : Pouvoir réducteur de fer  
**GPx** : Glutathion Peroxydase  
**GSH** : Glutathion réduit  
**GSSG** : Glutathion oxydé  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Eau oxygénée  
**HDL** : Light density lipoprotein  
**HT** : Hormones thyroïdiennes  
**IP** : Iodure de propidium  
**Jr** : Jour  
**LDL** : Low density lipoprotein  
**LXR** : Liver X Receptor  
**m** : Mètre  
**MA** : Maladie d'Alzheimer  
**MAPs** : Microtubule associated protein  
**MCT** : Mémoire à court terme  
**MDA** : Malonalaldéhyde  
**MFP2** : Multifunctional protein-2  
**MLT** : Mémoire à long terme  
**Mn** : Manganèse  
**Morin** : 2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone

**MS** : Matière sèche

**MTT** : 3 [4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium bromure

**NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase

**NBT** : Nitro Bleu de Tétrazolium

**O<sup>2•-</sup>** : Anion superoxyde

**OL** : Oligodendrocytes

**OPCs** : Précurseurs des oligodendrocytes

**Pb** : Plomb

**PBS** : Phosphate Buffer Salin

**PFA** : Paraformaldéhyde

**PHFs** : Paired Helical Filaments

**PLT** : Potentialisation à long terme

**PMP** : Protéines membranaires du peroxysome

**PPAR** : Peroxysome Proliferator Activated Receptor

**qPCR** : Quantitative Polymerase Chain Reaction

**RT-qPCR** : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction

**SOD** : Superoxyde Dismutase

**SVF** : Sérum de Veau Foetal

**TBARS**: Acide thiobarbiturique

**TBS** : Tampon Tris Salin

**TCA** : Acide tricholoacétique

**TMCS** : Trimethylchlorosilane

**Zn** : Zinc



# Sommaire

<b>A.</b>	<b>Publications de Recherche .....</b>	<b>1</b>
<b>B.</b>	<b>Communications présentées à des Congrès Nationaux et Internationaux.....</b>	<b>2</b>
-	<b>Communication affichée 1 .....</b>	<b>3</b>
-	<b>Communication affichée 2 .....</b>	<b>4</b>
	<b>Synthèse Bibliographique .....</b>	<b>1</b>
<b>I.</b>	<b>ARGANIER ET HUILES D'ARGAN .....</b>	<b>1</b>
<b>B.</b>	<b>Culture de l'arganier .....</b>	<b>1</b>
1.	Historique .....	1
2.	Aire de répartition géographique .....	3
3.	Classification et description botanique .....	5
4.	Intérêt et usage multiple .....	8
4.1	Intérêt écologique .....	8
4.2	Intérêt économique .....	8
<b>C.</b>	<b>Extraction d'arganier .....</b>	<b>10</b>
1.	Extraction de l'huile d'argan .....	10
1.1	Extraction traditionnelle .....	10
1.2	Extraction par presse mécanique .....	12
1.3	Extraction par solvant organique.....	13
2.	Phytochimie de l'huile d'argan.....	14
2.1	Caractéristiques physicochimiques .....	14
2.2	Composition chimique .....	14
3.	Utilisation de l'huile d'argan .....	19
4.	Vertus de l'huile d'argan .....	20
4.1	Préventions des maladies cardiovasculaires.....	20
4.2	Prévention du diabète .....	21
4.3	Prévention du cancer de la prostate .....	22
4.4	Huile d'argan en dermocosmétique.....	23
4.5	Prévention des maladies neurodégénératives .....	23
4.6	Influence sur le profil hormonal de la thyroïde .....	26

4.7	Influence sur le système immunitaire.....	26
4.8	Propriétés d'anaphylaxie .....	27
<b>II.</b>	<b>SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....</b>	<b>28</b>
1.	Généralité.....	28
2.	Bases biologiques de la mémoire .....	29
3.	Cellules gliales du système nerveux central .....	31
3.1	Les cellules microgliales .....	32
3.2	Les astrocytes .....	33
3.3	Les oligodendrocytes.....	35
3.1	Les cellules épendymaires.....	39
<b>III.</b>	<b>CONTEXTE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....</b>	<b>40</b>
1.	Maladie d'Alzheimer : une démence amnésique.....	40
1.1	Définition de la démence.....	40
1.2	Epidémiologie .....	41
1.3	Manifestation Clinique .....	42
1.4	Physiopathologie .....	43
1.5	Plaques amyloïdes .....	45
1.6	Dégénérescence neurofibrillaire.....	48
1.7	Les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer .....	52
1.8	Modèle d'étude de la maladie d'Alzheimer .....	54
1.9	Traitements de la maladie d'Alzheimer .....	57
2.	Aluminium et maladie d'Alzheimer .....	58
2.1	Les métaux .....	58
2.2	L'aluminium dans l'environnement .....	59
2.3	Absorption de l'Aluminium .....	61
2.4	Transport et distribution de l'aluminium .....	64
2.5	Elimination de l'aluminium .....	65
2.6	Implication de l'aluminium dans la maladie d'Alzheimer.....	66
3.	Implication des mitochondries dans la maladie d'Alzheimer .....	68
3.1	Structure et fonctionnement des mitochondries .....	68
3.2	Dysfonction mitochondriale et maladie d'Alzheimer .....	70
4.	Implication des peroxysomes dans la maladie d'Alzheimer .....	72
4.1	Structure et fonctionnement des peroxysomes.....	72

4.2	$\beta$ -oxydation peroxysomale .....	74
4.3	Dysfonctionnement peroxysomale et maladie d'Alzheimer .....	79
5.	Stress oxydatif et maladie d'Alzheimer.....	81
5.1	Stress oxydatif et systèmes de défense.....	81
5.2	Domage cellulaire induit par le stress oxydant .....	83
5.3	Domage cellulaire induit par le stress oxydant .....	83
5.4	Implication du stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer .....	84
6.	Cholestérol et neurodégènerescence.....	86
6.1	Structure du cholestérol et oxystérols .....	86
6.1	Stress oxydatif et oxystérols.....	87
6.2	Implication du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer.....	88
7.	Mort cellulaire et maladie d'Alzheimer.....	90
7.1	Généralité .....	90
7.2	Apoptose.....	91
7.1	Autophagie .....	93
7.1	Nécrose.....	95
7.2	Types de mort cellulaire et maladie d'Alzheimer .....	95
	<b>Objectifs et Modèles d'Etude.....</b>	<b>97</b>
	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>99</b>
	<b>I. ARGANIER ET HUILES D'ARGAN .....</b>	<b>99</b>
1.	Arganier .....	99
1.1	Préparation des extraits d'Argania spinosa .....	99
1.2	Détermination des propriétés chimiques des extraits d'Argania spinosa.....	100
1.3	Dosage des métabolites secondaires des extraits d'Argania spinosa .....	102
1.4	Potentiels antioxydants des extraits d'arganier .....	103
2.	Huile d'Argan .....	106
2.1	Préparation de l'huile d'argan .....	106
2.2	Etude de la composition chimique de l'huile d'argan.....	107
	<b>II. MODELE CELLULAIRE .....</b>	<b>112</b>
1.	Lignée cellulaire .....	112
2.	Culture des cellules.....	112
3.	Traitement des cellules .....	113
4.	Analyse de la morphologie cellulaire .....	114

4.1	Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie en contraste de phase .	114
4.2	Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342.....	114
5.	Effet sur la viabilité cellulaire .....	114
5.1	Numération cellulaire en présence de bleu trypan .....	114
5.2	Quantification des cellules adhérentes par coloration au crystal violet .....	115
5.3	Evaluation de la mortalité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium ..	115
6.	Effet sur l'activité mitochondriale des cellules 158N.....	116
6.1	Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par coloration au 3,3' dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC <sub>6</sub> (3)).....	116
6.2	Mesure de l'activité mitochondriale et/ou de la prolifération cellulaire par le test MTT	116
7.	Effet sur stress oxydatif .....	117
7.1	Evaluation de la production d'anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux.....	117
8.	Coloration des lysosomes par l'acridine orange.....	118
9.	Evaluation de l'accumulation du chlorure d'aluminium par la coloration au Morin Hydrate.....	119
9.1	Détermination de la concentration de l'aluminium dans les cellules.....	119
10.	Quantification des protéines par western blot.....	120
10.1	Extraits des extraits protéines.....	120
10.2	Dosage des protéines .....	120
10.3	Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes .....	121
10.4	Migration des protéines .....	122
10.5	Transfert des protéines sur membrane.....	122
11.	RT-qPCR.....	123
11.1	Extraction d'ARN .....	123
11.2	Dosage des ARN .....	124
11.3	RT-PCR: Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction.....	124
11.4	qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction .....	125
11.5	Analyse des résultats de qPCR.....	126
<b>III.</b>	<b>MODELE ANIMAL.....</b>	<b>127</b>
1.	Conditions d'élevage .....	127

1.1	Conditions expérimentales .....	127
1.2	Préparation des aliments.....	127
1.3	Traitement des rats .....	127
2.	Contrôle du poids des rats .....	130
3.	Etude de comportement des rats .....	130
3.1	Procédure de labyrinthe aquatique de Morris (water maze).....	130
3.2	Procédure de labyrinthe 8 bras (arm maze).....	132
4.	Sacrifice des rats .....	134
4.1	Prélèvements des organes.....	134
5.	Dosage des paramètres plasmatiques chez le rat .....	135
6.	Dosages d'activités enzymatique chez le rat .....	135
6.1	Préparation des homogénats .....	135
6.2	Dosage des activités enzymatiques des marqueurs de stress oxydatif .....	135
7.	Détermination de la teneur en aluminium par la spectroscopie d'émission atomique par plasma à coulage inductif (ICP-AES).....	138
8.	Effet sur la fragmentation d'ADN .....	139
8.1	Extraction de l'ADN .....	139
8.2	Dosage de l'ADN .....	139
9.	Gel d'agarose .....	139
10.	Coupes histologiques .....	140
	<b>Résultats .....</b>	<b>143</b>
<b>I.</b>	<b>Caractérisation de l'arganier et de l'huile d'argan .....</b>	<b>143</b>
1.	Arganier .....	143
1.1	Détermination des paramètres chimiques de différentes parties d'Argania spinosa.....	143
1.2	Détermination des composés phénoliques .....	143
1.3	Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits d'arganier.....	148
2.	L'huile d'argan .....	152
2.1	Analyse des constituants chimiques de l'huile d'argan .....	152
<b>II.</b>	<b>In vitro .....</b>	<b>157</b>
1.	Evaluation de l'accumulation de l'Aluminium cellulaire.....	157
2.	Effets du 7-cétocholestérol sur la prolifération cellulaire, le dysfonctionnement des organites et la mort cellulaire.....	159

2.1	Effet de 7-cétocholestérol sur la prolifération .....	159
3.	Effets du 7-cétocholéstérol sur les mitochondries .....	164
3.1	Evaluation de l'activité mitochondriale .....	164
3.2	Effet sur le potentiel transmembranaire mitochondrial .....	168
4.	Effets du 7-cétocholestérol et du chlorure d'aluminium sur le stress oxydant.....	172
5.	Evaluation des effets de 7-cétocholestérol sur l'intégrité des lysosomes.....	176
6.	Caractérisation de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol et le chlorure d'aluminium.....	177
6.1	Evaluation de l'intégrité de membrane cytoplasmique par coloration à l'iodure de propidium .....	177
6.2	Effet du 7-cétocholestérol sur la fragmentation nucléaire.....	182
6.3	Effets du 7-cétocholestérol sur l'apoptose et l'autophagie .....	183
7.	Impact du 7-cétocholestérol sur le niveau d'expression de gène peroxysomale : ABCD1, ABCD3, ACOX1, MFP2 et PPAR $\alpha$ .....	186
<b>III.</b>	<b>In vivo .....</b>	<b>189</b>
1.	Accumulation de chlorure d'aluminium dans l'hippocampe, cortex et foie .....	189
1.	Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur l'évolution du poids corporel	190
2.	Effet de l'huile d'argan et le chlorure d'aluminium sur le comportement .....	190
2.1	Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur la capacité mémorative au cours du labyrinthe radial à 8 bras.....	191
2.2	Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur la capacité mémorative au cours du labyrinthe de Morris.....	193
3.	Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur la masse relative des organes	195
3.1	Variation de la masse relative du foie, rein, rate et poumons .....	195
3.2	Variation de la masse relative du cerveau, testicules, coeur et pancréas .....	197
4.	Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur les paramètres plasmatiques	199
4.1	Effet sur le cholestérol total et les triglycérides .....	199
4.2	Effet sur la glycémie .....	199
4.3	Effet sur les transaminases et l'urée .....	199

5. Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur l'activité des enzymes du stress oxydatif .....	201
5.1 Incidence sur l'activité enzymatique de la catalase.....	201
5.2 Incidence sur l'activité enzymatique de superoxyde dismutase totale.....	203
5.3 Incidence sur l'activité enzymatique du glutathion peroxydase .....	205
5.4 Quantification du glutathion réduit .....	207
6. Fragmentation d'ADN .....	209
7. Histologie.....	209
<b>Discussion .....</b>	<b>210</b>
<b>I. Chapitre : Evaluation des paramètres chimiques d'<i>Argania spinosa</i> et de l'huile d'argan et évaluation de leur potentiel anti-oxydant .....</b>	<b>210</b>
1. Détermination de la teneur des polyphénols des extraits d'arganier .....	210
2. Détermination de la teneur de flavonoïdes des extraits d'arganier .....	211
3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits d'arganier par piégeage du radical libre DPPH et réduction du fer.....	212
4. Composition de l'huile d'argan .....	213
<b>II. Chapitre : Evaluation des effets protecteurs de l'huile d'argan sur la toxicité induite par le 7-cétocholestérol et le chlorure d'aluminium.....</b>	<b>214</b>
1. Evaluation des effets protecteurs de l'huile d'argan sur la cytotoxicité induite par le 7-cétocholestérol: effets sur les organites cellulaires (mitochondries, peroxysomes et lysosomes) et sur l'activation de la mort cellulaire.....	215
1.1 Effets du chlorure d'aluminium : accumulation, stress oxydatif et mort cellulaire	215
1.2 Effet du 7-cétocholestérol et du chlorure d'aluminium sur la mitochondrie et l'activation de la mort cellulaire.....	217
1.3 Effet du 7-cétocholestérol sur les lysosomes et l'activation de la mort cellulaire	220
1.4 Effet du 7-cétocholestérol et du chlorure d'aluminium sur le stress oxydatif .	221
1.5 Effet du 7-cétocholestérol sur l'expression de marqueurs peroxysomaux.....	224
1.6 Evaluation des effets protecteurs de l'huile d'argan sur la toxicité induite par le 7-cétocholestérol et le chlorure d'aluminium.....	226
<b>III. Chapitre : Evaluation des effets de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur le comportement des rats, le poids et les marqueurs du stress oxydant .....</b>	<b>231</b>



1. Accumulation du chlorure d'aluminium dans le cerveau .....	231
2. Effet du chlorure d'aluminium sur le comportement des rats .....	233
3. Effet du chlorure d'aluminium sur le poids corporel des rats et la masse relative des organes .....	235
4. Effet du chlorure d'aluminium sur les paramètres plasmatiques .....	236
5. Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur les marqueurs du stress oxydant.....	238
<b>Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>244</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>247</b>

# **Introduction**

## Introduction

L'huile d'argan est extraite à partir du fruit de l'arganier, qui est un arbre endémique du Maroc et représentant de la famille des Sapotacées. L'arganier est un arbre très résistant à la sécheresse et à la chaleur et qui pousse d'une façon sauvage et en abondance dans les zones arides et semi-arides du sud-ouest marocain. C'est un arbre qui est au cœur de la vie sociale et économique de plus de 3 millions de personnes, dont 2,2 millions en milieu rural. Il représente une ressource précieuse pour l'économie et l'environnement, car il constitue l'un des derniers remparts contre l'avancée du désert. L'arganier est typiquement multi-usage, il représente le pivot de systèmes agroforestiers qui ont réussi jusqu'à maintenant à subvenir aux besoins des habitants de ces zones fortement marquées par les aléas climatiques (**Chaussod *et al.*, 2005**). La disparition de l'arganier entraîne inéluctablement la disparition de nombreuses espèces, conduisant à une réduction du patrimoine génétique pour l'arbre lui-même ainsi que pour les autres espèces animales et végétales. L'arganeraie est traditionnellement habitée par la population Amazigh qui a développé à travers les âges, une manière particulière de vie centrée sur l'arganier. Il a permis la création de plusieurs emplois via la création de coopératives féminines qui pratiquent un travail fastidieux et manuel pour extraire l'huile d'argan avec minutie (la meule et les pierres). Ces femmes ont un savoir-faire ancestral qui a été transmis de mère à fille afin de préserver cette tradition et valoriser leur produit local. L'arganier permet une stabilité de la population ce qui limite l'exode rurale. Deux catégories d'huile d'argan existent: l'huile cosmétique provenant des amandes non torréfiées, et l'huile alimentaire extraite à partir des amandes torréfiées. Les propriétés physico-chimiques de ces deux types d'huile d'argan ont été bien étudiées (**Matthäus *et al.*, 2010 ; Hilali *et al.*, 2005**). L'huile d'argan représente un produit international relativement nouveau, exportée uniquement par le Maroc. Les distributeurs en Europe et en Amérique du Nord redistribuent l'huile dans le monde entier sur les marchés étrangers en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. En raison des propriétés uniques de l'huile d'argan, on peut supposer que les exportations augmenteront dans l'avenir (**Zougagh *et al.*, 2011**). Cette huile a été, depuis des siècles, utilisée en médecine traditionnelle, notamment par les femmes berbères pour les soins corporels et capillaires. Elle est dotée des propriétés cosmétiques contre l'acné, les vergetures, les gerçures, les brûlures, les lentigos, les soins des ongles et des cheveux. Elle ralentit le vieillissement cutané, et améliore l'hydratation. Son pouvoir hydratant et antioxydant compense la dénutrition de la peau. Les qualités organoleptiques font de l'huile d'argan une huile appréciée dans l'art culinaire. Ces différentes actions sont assurées par sa composition

chimique intéressante, riche en antioxydants, comme la vitamine E, molécules dotées de fortes propriétés anti-oxydantes, ainsi que par la présence de polyphénols et de stérols spécifiques (**Adlouni, 2010**), qui sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et pourrait donc contribuer à prévenir la neurodégénérescence (**Ferri et al., 2015 ; Saeed et al., 2015**). La forte teneur en tocophérol et la faible teneur en acide linoléique sont responsables de sa résistance à l'oxydation. Les phospholipides de l'huile d'argan contribuent à la préservation de l'huile (**Gharby et al., 2012**). Des études d'observations expérimentales et des essais d'intervention ont montré que la consommation d'huile d'argan peut réduire le risque cardiovasculaire à travers un mécanisme biologique passant par des actions sur la pression artérielle, les lipides plasmatiques et le statut antioxydant (**Adlouni, 2010**). L'huile d'argan a également montré qu'elle présente un effet hypocholestérolémiant (**Cherki et al., 2005**), antioxydant (**Drissi et al., 2004**), anti-diabète (**Bellahcen et al., 2013**) et un effet antiprolifératif sur des lignées cancéreuses humaines de prostate (**Drissi et al., 2006 ; Bennani et al., 2007**).

Actuellement, l'intérêt pour l'huile d'argan et pour ses effets physiologiques s'est considérablement développé, ce qui a eu pour résultat, de faire passer le statut de cette huile d'un produit alimentaire diététique à celui d'un produit très prisé pour ces qualités anti-oxydantes et nutritionnelles. En effet, la neuroprotection par les antioxydants a donc suscité beaucoup d'intérêt. Bien qu'ils soient présents en petite quantité, ces antioxydants jouent un rôle spectaculaire dans des processus physiopathologiques conduisant au vieillissement tissulaire, à l'athérosclérose et au cancer. La majorité des recherches sur le rôle des antioxydants alimentaires dans la fonction neurologique et dans certaines maladies liées à l'âge est centrée sur la vitamine E. Il a été démontré que la vitamine E a un rôle essentiel dans le maintien de la fonction neurologique. La supplémentation par voie orale de la vitamine E atteint le liquide céphalorachidien et le cerveau (**Sen et al., 2004**). La teneur élevée des tocophérols dans l'huile d'argan lui confère certains effets protecteurs contre les maladies neurodégénératives. La composition de l'huile d'argan a déclenché des travaux de recherche afin de susciter l'utilisation de l'huile d'argan comme produit pharmacologique. À l'heure actuelle, son bénéfice sur les cellules nerveuses ne sont pas connus.

Le cholestérol est une molécule essentielle au niveau cérébral. Le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol dans le corps, il n'est donc pas surprenant qu'il contienne des oxystérols, et qu'il doit être étroitement régulé (**Björkhem and Meaney, 2004 ; Ragot et al., 2011**), et par conséquent, des altérations du métabolisme du cholestérol peuvent conduire à

des niveaux cérébraux anormaux des oxystérols qui peuvent être formés par voie enzymatique ou par auto-oxydation (**Nelson et al., 2004 ; Iuliano, 2011 ; Yin et al., 2011**). Cela peut contribuer à certaines maladies neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer (MA). Jusqu'à ce jour, la pathogenèse de la maladie d'alzheimer (décrite en 1906 par le neurologue allemand Aloïs Alzheimer) est encore mal comprise, mais plusieurs études supposent un lien entre les troubles du métabolisme des lipides et MA (**Zarrouk et al., 2016a**). La MA est une maladie neurodégénérative progressive et irréversible caractérisée par une perte neuronale dans l'hippocampe, le cortex entorhinal et le cortex associé, ce qui conduit à un déclin cognitif qui se manifeste comme une démence (**Schaeffer et al., 2009**). Un élément clé dans la pathogenèse de la MA est l'accumulation et dépôt extracellulaire des « plaques séniles » de l'amyloïde- $\beta$  (A $\beta$  1-42), dérivé de la protéine précurseur de l'amyloïde (**Geschwind, 2003**). Ceci est suivi par la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires intraneuronaux de la protéine tau hyperphosphorylée associée aux microtubules (**Hardy and Higgins, 1992**). La MA a été classée comme étant principalement un trouble neuronal, mais elle affecte non seulement les neurones, 50% de tous les cas de la MA montrent une perte des oligodendrocytes et d'autres substances blanches, potentiellement due à l'excitotoxicité du glutamate et le stress oxydatif (**Brun and Englund, 1986 ; Mattson, 2008**). Des études ont fourni des arguments qui montrent qu'une augmentation du stress oxydatif a été enregistrée dans le cerveau des patients Alzheimer, cela pourrait avoir un rôle dans la dégénérescence des neurones et la mort cellulaire (**Markesbery, 1997 ; Markesbery and Ehmann, 1993**).

Un certain nombre de théories sur les causes de la maladie d'alzheimer ont été avancées et sont actuellement évaluées. Elles mettent en cause en particulier des facteurs génétiques, des protéines anormales, des agents infectieux, des facteurs environnementaux comme la présence d'aluminium ou d'autres métaux, et des changements métaboliques. Parmi les facteurs de risque associés à la MA, la perturbation du métabolisme du cholestérol entraînant une diminution de la synthèse de la 24S-hydroxycholestérol (considéré comme un marqueur des neurones métaboliquement actives) via CYP46A1 semble aussi contribuer (**Leoni and Caccia, 2011**). La diminution de 24S - hydroxycholestérol dans le plasma est associée à la sévérité de la démence et de l'atrophie du cerveau (**Solomon et al., 2009**). Toutefois, l'augmentation des niveaux de 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC) exercent également une activité neurotoxique (**Kolsh et al., 1999 ; Noguchi et al., 2015**). Le 7-cétocholestérol (7KC) résultant de l'auto-oxydation du cholestérol (**Iuliano, 2011**) et qui peut être formé en conséquence de stress oxydatif et souvent observé dans la MA (**Vaya and**

**Schipper, 2007; Baarine et al., 2012)** et d'autres grandes maladies neurodégénératives telles que X-linked adrénoleucodystrophie (X-ALD), la sclérose en plaques et la maladie Niemann-Pick (**Leoni et al., 2005 ; Mukhopadhyay et al., 2016 ; Zhornitsky et al., 2016 ; Nury et al., 2016**). Des niveaux accrus du 7KC dans le liquide céphalorachidien (LCR) et/ou dans le plasma des patients pourraient être un marqueur biochimique putatif de la dégradation des cellules nerveuses, y compris les oligodendrocytes. Sur divers types de cellules, en particulier sur les oligodendrocytes, qui sont des cellules synthétisant la myéline, le 7KC est connu pour déclencher un mode complexe de la mort cellulaire (oxiaptophagie) associée au stress oxydatif et des dysfonctionnements mitochondriaux conduisant à l'apoptose et l'autophagie (**Monier et al., 2003; Nury et al., 2014; Nury et al., 2015**). Sur les cellules U937 monocytes humains, le 7KC a également été montré pour déclencher des processus inflammatoires, y compris une amélioration de cytokines inflammatoires (**Vejux and Lizard, 2009**). Ainsi, des niveaux accrus du 7KC dans le liquide céphalo-rachidien pourraient constituer un facteur de risque contribuant à une démyélinisation via ses activités pro-inflammatoires et pro-oxydantes, mais aussi par sa capacité à déclencher la mort cellulaire.

Un autre facteur associé à la MA est l'Aluminium (Al). L'Al est bien connu depuis les 100 dernières années pour sa neurotoxicité (**Oshima et al., 2013**). C'est le facteur de risque majeur pour la cause et le développement de la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Parkinson (**Singla and Dhawan, 2014**). La relation entre l'Al et la MA a, en fait, été établie lorsque différentes études ont rapporté que ce métal, injecté en intracérébral, induisait la formation de dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau de différents animaux. Par ailleurs, la présence de l'Al dans le cerveau pourrait renforcer des événements oxydants et inflammatoires, menant aux dommages tissulaires (**Campbell, 2002**). Il est bien connu que la sévérité et l'évolution clinique de l'intoxication aux métaux dépend principalement de la dose, la voie et la durée d'exposition ainsi que de différentes espèces. En dépit de ces observations, le rôle causal de l'Al dans la MA a été bien étudié.

La recherche actuelle porte essentiellement sur l'étude des molécules antioxydantes d'origine naturelle. Notre étude s'inscrit dans cette optique et consiste à faire dans un premier temps un criblage phytochimique et une évaluation de l'activité antioxydante des extraits de différentes parties d'*Argania spinosa* et dans un second temps, étudier la composition de l'huile d'argan en terme de tocophérols, stérols, polyphénols.... Cette caractérisation de l'arganier et de l'huile d'argan nous a parue utile pour notre étude *in vivo* et *in vitro*. Et donc, afin de préciser la part prise par le 7KC et l'Al dans la neurodégénérescence et

particulièrement dans la maladie d'alzheimer, l'huile d'argan ou certains de ses composants s'opposent, entre autres, aux effets délétères induits par le 7KC et l'Al (activités pro-oxydantes, induction de mort cellulaire,...). Des études ont été réalisées *in vitro* sur des cellules d'oligodendrocytes murins 158N et *in vivo* sur des rats Wistar. Les résultats révèlent une nouvelle activité biologique de l'huile d'argan sur des cellules nerveuses qui pourrait avoir de l'intérêt pour prévenir les maladies neurodégénératives. De nos jours, aucune étude sur l'effet protecteur de l'huile d'argan contre les maladies neurodégénératives n'a été mise en évidence. Il est donc, possible d'envisager une alimentation contrôlée ou fonctionnelle avec l'huile d'argan (ou certains de ses composés) afin de prévenir certaines formes de neurodégénérescences comme la maladie d'Alzheimer.

Le travail de la présente Thèse s'inscrit dans le cadre de la continuité des séries de recherches thérapeutiques visant à utiliser des molécules naturelles issues de l'arganier pour pallier à la neurotoxicité induite par le 7KC et l'AlCl<sub>3</sub>. Les travaux de Thèse ont été dirigés selon deux volets complémentaires.

- Le premier volet a consisté en une analyse phytochimique de différentes parties d'arganier permettant de caractériser les extraits et molécules naturelles (huiles d'argan et certains constituants) dotés d'une activité antioxydante et /ou chélatrice du fer.
- Le second volet a consisté à tester les extraits d'arganier (huile, molécules (phytostérols et VitE en particulier)) sur un modèle animal (rat) et sur un modèle cellulaire : d'oligodendrocytes murins 158N, pour tenter d'évaluer les effets protecteurs contre la neurotoxicité induite par le 7KC et l'AlCl<sub>3</sub>.

Pour présenter ces deux volets, le manuscrit est organisé en 5 parties :

- La première partie « **Etude Bibliographique** » détaillant en premier lieu l'arganier, le contexte économique de la filière, les différents procédés d'extraction de l'huile d'argan, sa composition chimique et les bienfaits nutritionnels. Cette partie présente également les différentes notions du système nerveux central, les bases biologiques de la mémoire dans le contexte des maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer ; elle s'achève par les mécanismes du métabolisme du chlorure d'aluminium et du 7KC.
  - La deuxième partie « **Objectif et Modèles d'Étude** » éclaircit les approches et le choix des modèles utilisés.
  - La troisième partie « **Matériels et Méthodes** » détaille les méthodologies utilisées pour les différentes analyses effectuées.

- La quatrième partie « **Résultats** » présente les résultats obtenus.
- La cinquième partie est une « **Discussion** » vis-à-vis des résultats scientifiques obtenus par les autres chercheurs.
- La dernière partie « **Conclusion et Perspectives** » résume les points forts de l'étude et aborde les perspectives qui s'y rapportent.



## Synthèse Bibliographique

### I. ARGANIER ET HUILES D'ARGAN

#### B. Culture de l'arganier

##### 1. Historique

L'historique de l'arganier est bien présenté dans l'ouvrage « Arganier » de **M'hirit** et ses collaborateurs (**M'hirit et al., 1989**).

Les premiers à avoir mentionné l'existence de cet arbre remarquable au Marghreb sont les géographes et savants arabes. En effet, aux X<sup>ème</sup>, XI<sup>ème</sup>, XII<sup>ème</sup> siècle, les usages du fruit d'arganier ont été relatés par Ali-Ibn-Rodhoan, El Bechri et El Idrissi. Au XIII<sup>ème</sup> siècle et plus précisément vers 1219, le célèbre médecin égyptien, Ibn-Al-Baytar, dans son ouvrage « Traité des simples » traduit en français par le Dr Leclerc en (1877-1883), parle de l'arganier et le décrit comme « un arbre de haute taille, épineux, donnant un fruit du volume d'une amande et contenant un noyau que l'on recueille, l'on triture et dont on extrait l'huile pour l'employer dans les préparations alimentaires ».

En 1515, Hassan Ben Mohammed Al Ouazzan, dans sa description de l'Afrique (Jean-Léon l'Africain), a parlé de l'huile d'argan comme étant d'une mauvaise odeur et servant pour l'alimentation et l'éclairage. En 1906, Gentil précise que, dans la région d'Essouira et dans la vallée de l'Asif-N-Ait-Moussa, la répartition de l'arganier est liée aux conditions hygrométriques et thermiques du littoral atlantique.

Des sources ont montré que les Phéniciens ont connu l'arbre et l'ont exploité pour en extraire ces huiles (particulièrement dans la région d'Essaouira).

En outre, les récits des voyageurs et des agents consulaires anglais au Maroc, au 18<sup>ème</sup> siècle, révèlent que les forêts d'arganier étaient très denses et s'étendaient d'Ouadaï au Nord de Safi, aux confins du Sahara.

1737, Carl Von Linne a baptisé l'arganier, et a donné à partir d'échantillons desséchés et sans fleurs la description spécifique de l'espèce dans son *Hortus cliffortianus*, sous le nom de *Sideroxylon Spinosun L* du genre *Rhammus* (*Sapotacées*).

En 1791, au Maroc, Schousboe, Consul Danois, publie ses observations sur la flore marocaine et en particulier sur l'arganier. En 1801, de nombreux auteurs tels Correa de Serra

(1806), De Candolle (1844), Vicomté de Noe (1853) et Engler (1897) ont précisé et détaillé les caractères morphologiques de l'arbre.

En 1888, Cotton isole un principe actif à partir du tourteau du fruit de l'arbre et l'identifie comme mélange de saponines et l'appelle arganine.

En 1924, Emberger définit la distribution géographique de l'arganier dans la région de Rammani et plus précisément dans le bassin supérieur d'Oued Grou. La même année, les travaux de Braun-Blanquet et Maire sur la végétation et la flore marocaine définissent et individualisent un secteur biogéographique à arganier.

En 1925, Emberger a découvert un autre îlot sur le versant nord du massif montagneux des Beni Snassen, non loin d'Oujda.

En 1926, Lamaire publie à la suite de ses missions dans la région de Souss un premier article sur la végétation du Sud-ouest marocain, citant deux types d'arganeraies : celle à *Euphorbia Echinus* du littoral atlantique et celle à *Hesperola Barum Platycarpum* (Maire) des montagnes d'Adar – ou - Amane ébauchant ainsi la première classification d'arganeraie des plaines et des montagnes.

En 1929, Battino s'intéresse à l'huile d'argan et à d'autres produits de l'arganier notamment l'arganine isolée par Cotton et à laquelle il prête une action lénolytique *in vivo* et *in vitro*.

En 1938, Emberger publie "Les chèvres et l'arganier" tandis qu'en 1965, Monnier, ingénieur des Eaux et Forêts montre déjà que l'exploitation abusive et le défrichement sont les deux principaux dangers qui guettent l'arganier.

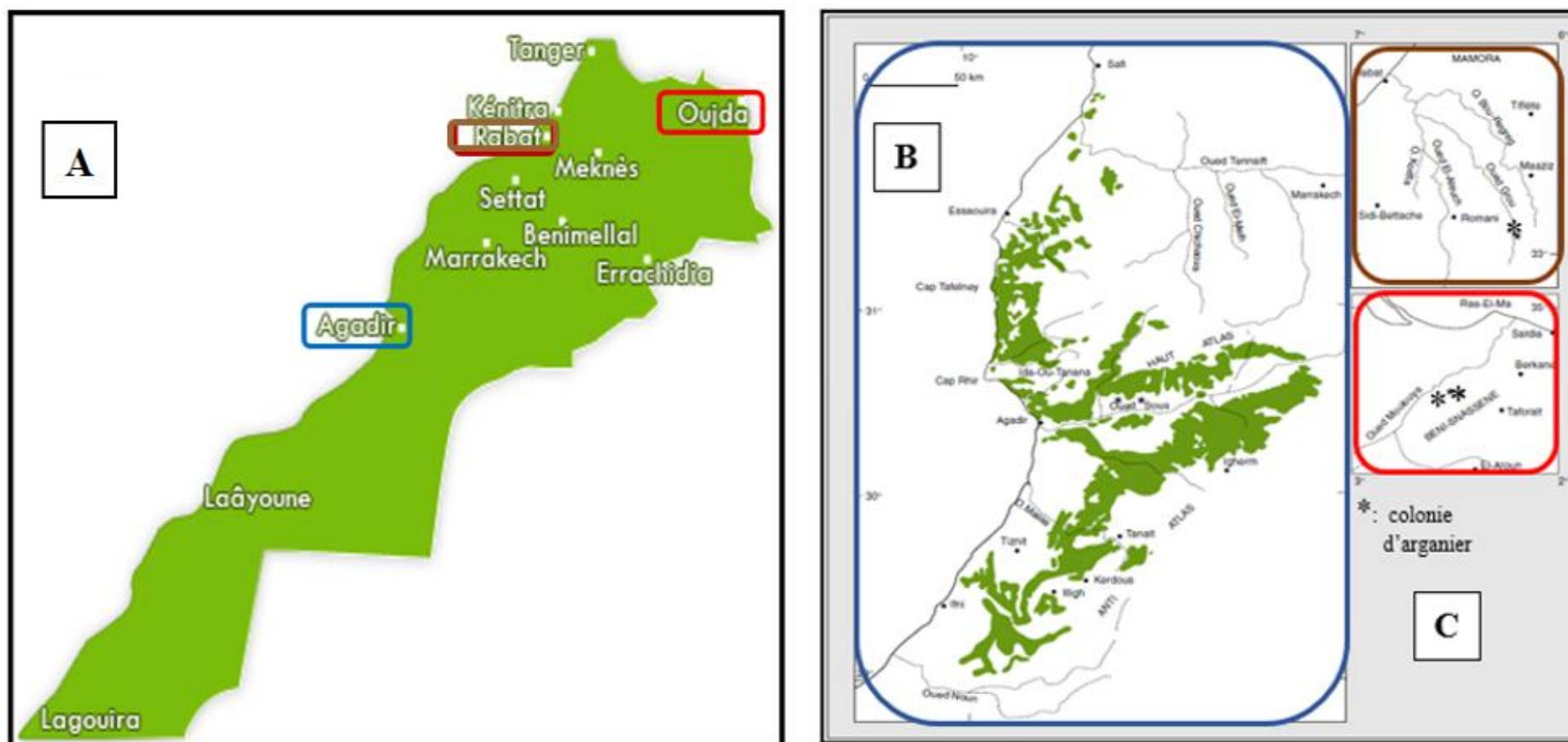
En 1939, ce même auteur publie l'ouvrage « Aperçu général sur la végétation du Maroc » qui reste jusqu'à nos jours, une référence botanique et écologique synthétique d'un grand intérêt pour le Maroc septentrional.

En 1981, Biondi a permis la découverte en Sardaigne d'un bois fossile datant du Tertiaire ayant conduit à la description du genre *Aganioxylon*, dont les affinités avec l'arganier sont importantes. Cette donnée révèle sur le plan historique que les Sapotacées auraient occupé des surfaces très étendues pendant le Tertiaire et que leur disparition et régression, comme le cas pour l'arganier, seraient liées aux bouleversements climatiques du Quaternaire.

## 2. Aire de répartition géographique

L'arganeraie marocaine est subdivisée selon Boudy (1950) en trois blocs distincts : le premier englobe les boisements des Chiadma au nord d'Essaouira où l'espèce apparaît sous forme de grandes tâches pouvant atteindre chacune plusieurs milliers d'hectares, le second se situe au sud d'Essaouira et plus particulièrement sur les plateaux des Haha et au niveau de la région de Tamarar. Le troisième correspond à celui de la région d'Agadir, essentiellement dans la plaine de Souss et sur les versants de Haut-Atlas et de l'Anti-Atlas (**M'herit et al., 1989**).

L'arganier est un arbre endémique du Maroc, représentant de la famille des Sapotacées. Il est localisé principalement dans les zones arides et semi-arides du Sud-Ouest marocain, où il s'étend sur une superficie de 828 000 ha (**Guillaume and Charrouf, 2011**). Sa superficie actuelle le place parmi les toutes premières essences forestières au Maroc où il n'est devancé que par le chêne vert (*Quercus rotundifolia* L) avec 1 364 100 ha, le thuya (*Tetraclinis articulata* Benth), essence très étendue au Maroc aussi, n'occupe que le troisième rang après l'arganier avec une surface évaluée à 607 900 ha. Il se localise essentiellement dans le sud-ouest du Maroc, le long du littoral océanique, depuis l'embouchure de l'oued Tensift au nord, jusqu'à l'embouchure de l'oued Drâa au sud (**Figure 1**). L'arganier se développe aussi dans la plaine du Souss, sur le versant sud du Haut-Atlas occidental et sur les versants septentrionaux et méridionaux de l'Anti-Atlas occidental jusqu'à des altitudes de 1 300-1 500 m (**Msanda, 2005**). Au-delà de cette localisation géographique, deux petites aires d'arganier sont répertoriées dans la haute vallée Grou au sud-est de Rabat et dans le piémont nord-ouest des Béni-Snassen, près d'Oujda (**El Mousadik and Petit, 1996**).



**Figure 1:** Aire de répartition de l'arganier au Maroc. **A:** Carte du Maroc situant la répartition de l'arganier le long du littoral océanique marocain. **B:** Agrandissement de la zone bleu (en A) représentant l'aire géographique de l'arganier depuis l'embouchure de l'oued Tensift au nord, jusqu'à l'embouchure de l'oued Drâa au sud du Maroc et dans la plaine du Souss. **C:** Agrandissement des zones marron et rouge (en A) représentant successivement deux stations isolées de l'arganier au sud-est de Rabat et au nord-ouest des Béni-Snassen. D'après Msanda, 2005.

### 3. Classification et description botanique

Le genre *d'Argania Roem et Schult* est monotype. Il appartient au phylum des Ebénales et à la famille tropicale et subtropicale des Sapotacées qui compte une cinquantaine de genres et plus de 600 espèces (M'Hirit *et al.*, 1998).

L'arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels est synonymes *Argania sideroxylon* Roem. Et *Schult.* = *Sideroxylon spinosum* L. = *Elaeodendron Argan* Retz. Son vernaculaire est argan (berbère). Sa classification botanique se présente comme suit (Tableau 1).

**Tableau 1: Classification botanique de l'arganier**

Nom	<i>Argania spinosa</i> L (Skeels)
Embranchement	Phanérogammes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Ebenales
Famille	Sapotacées
Genre	<i>Argania</i>
Espèce	<i>Spinosa</i>

L'arganier est un arbre oléagineux presque unique au Maroc. C'est un arbre épineux d'où le nom d'espèce « *spinosa* », de taille pouvant atteindre 8 à 10 m de hauteur selon les conditions écologiques, la cime est très grande et étalée, dense et à contours arrondis (Figure 2). Le tronc très vigoureux et court, avec une grande couronne, et l'écorce rugueuse craquelée en « peau de serpent », permettent aux chèvres de grimper dans la couronne pour brouter les feuilles et les fruits. Cela conduit à la réduction de l'arganier à l'état de buissons médiocre (7 à 10 m).

L'arganier est très résistant à la chaleur et à l'aridité. Il peut supporter des températures allant jusqu'à 50°C. Grâce à son système racinaire puissant, l'arganier maintient les sols, entretient leur fertilité et les protège contre l'érosion hydrique et éolienne qui menacent de désertification d'une bonne partie du Maroc.



**Figure 2: Arganier**

Le caractère polymorphe de l'arganier est très frappant du fait qu'on trouve des formes extrêmement variées selon les secteurs et le stade du développement de l'arbre.

Les feuilles alternes, souvent réunies en fascicules, entières lancéolées, généralement longues de 2 à 3 cm, de couleur vert sombre à la face supérieure, plus claire en dessous, glabres, avec une nervure médiane très nette et des nervures latérales très fines et ramifiées. Les feuilles d'arganier sont sub-persistantes même en période de sécheresse.

La fleur de l'arganier est monoïque (hermaphrodite), pentamère, constituée en glomérules localisés au niveau des entrenœuds et à l'aisselle des feuilles et pouvant être composés de 15 fleurs et plus. Celles-ci sont blanches à jaune verdâtre. Le calice de la fleur est composé de cinq sépales pubescents succédant à deux bractées. La corolle, en cloche, est formée de cinq pétales obtus et arrondis. La floraison a lieu en mai-juin et conduit à des fruits qui deviennent matures vers septembre.

Le fruit de l'arganier est une drupe dont la couleur à maturité évolue vers le jaune ou le rouge (**Bani-Aameur et al., 1999**). Il présente six formes différentes: fusiforme ; ovale apiculée, ovale, goutte, arrondie et globuleuse. Sa taille varie de 1 à 5 cm.

Il est formé d'un péricarpe charnu (ou pulpe) qui couvre un noyau très dur (ou noix), représentant environ un quart du poids du fruit frais (**Adlouni, 2010**) (**Figure 3**).



**Figure 3:** *Fruit de l'arganier*

Au centre du fruit se trouve une noix constituée d'une à trois amandes albuminées et huileuses renfermant jusqu'à 55% d'huile (**Figure 4**). A maturation, le fruit prend une couleur jaune ou jaune-brun clair en fonction des arbres. La couleur sombre se développe après abscission.



**Figure 4:** *La noix (graine) d'arganier*

C'est à partir de cette amande que l'huile d'argan est extraite, ce qui donne une huile comestible et un tourteau.

Le bois de l'arganier est très dur et compact, de densité variant de 0,9 à 1, appelé bois de fer, de couleur blanc-jaunâtre. Il est utilisé comme bois de chauffage (**Jaccard, 1926 ; Nouaïm et al., 1991**).

Les racines de l'arganier plongent très profondément dans le sol (30 m de profondeur), ce qui permet ainsi la récupération des eaux à partir de couches profondes, et par conséquent une adaptation de l'arganier à un climat semi-aride et aride (**Mokhtari, 2002**).

L'huile d'argan est une essence forestière parmi les plus originales et remarquables de l'Afrique du Nord par son intérêt botanique et par ses usages multiples à caractère écologique et socio-économique.

#### 4. Intérêt et usage multiple

L'arganier est un arbre typiquement multi-usage, il représente le pivot de systèmes agroforestiers qui ont réussi jusqu'à maintenant à subvenir aux besoins des habitants de ces zones arides et semi-arides fortement marquées par les aléas climatiques (**Chaussod et al., 2005**). En raison de son caractère écologique et socio-économique qu'il occupe, il a été déclaré comme « espèce protégée » par l'Organisation des Nations Unies de l'Education, de la Science et la Culture (UNESCO) en 2007 (**Venegas et al., 2011**).

##### 4.1 Intérêt écologique

Bien que l'arganier soit une essence thermophile et xérophile, il joue un rôle écologique dans la protection du sol contre les érosions hydriques et éoliennes grâce à son système racinaire très puissant qui s'enfonce très profond dans le sol pour capter l'eau, ce qui permet de stabiliser le sol, de réduire l'érosion et de limiter l'avancée du désert (**Emberger, 1960**). Il a une grande adaptation à l'aridité ce qui permet une production agricole non négligeable dans les conditions climatiques défavorables.

L'arganier est polymorphe et la flore qui cohabite avec lui est importante. Le 1/3 de la végétation du Maroc, dont plusieurs espèces endémiques, se trouve dans l'aire de l'Arganeraie. Les chercheurs ont recensé 100 espèces végétales au-dessous de l'arganier (**Nouaïm et al., 1991**).

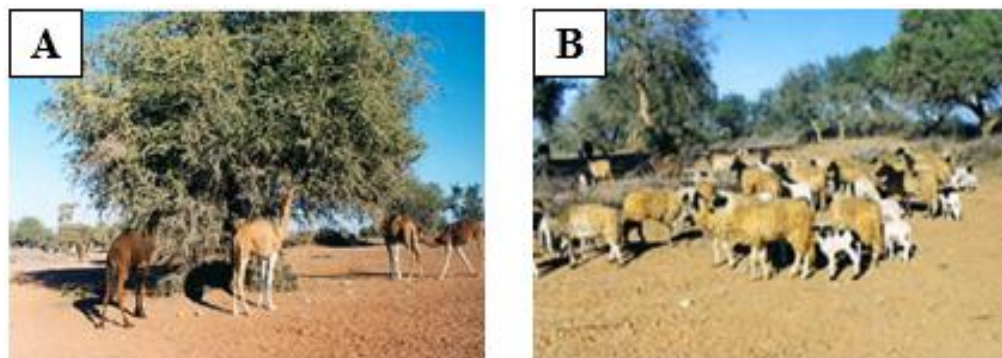
La disparition de l'arganier entraîne inéluctablement la disparition de nombreuses espèces, conduisant à une réduction du patrimoine génétique pour l'arbre lui-même ainsi que pour les autres espèces animales et végétales.

##### 4.2 Intérêt économique

L'arganeraie constitue une source importante de revenus et de nourriture pour les populations berbères selon l'usage qu'elles en ont faites. Il est largement exploité sous différentes formes:



- Ressource fourragère : Le tourteau (résidu issu de la presse de la pâte d'amendons), riche en glucides et protéines (**Charrouf, 1995**), est utilisé pour l'engraissement du bétail (**El Otmani, 1988**), la pulpe des fruits et les feuilles de l'arbre constituent un fourrage pour les animaux (**Figure 5**).



**Figure 5: Arganier et nourriture animale**

**A:** Arganier et chameaux      **B:** Arganier et moutons

- Ressource énergétique: Le bois de l'arganier est massivement utilisé en tant que combustible, sous forme de charbon offrant les moyens de se chauffer. Il est utilisé en menuiserie et en matériaux de construction. Les branches solides de l'arganier sont utilisées par les berbères pour la clôture des maisons. A partir de 1917, une crise de combustible a entraîné la destruction de milliers d'hectares d'arganier (**DE Ponteves et al., 1990**). Par conséquent, le Dahir de 1925 complété par des textes plus récents (1938, 1951, 1983), reste aujourd'hui la base de la réglementation concernant l'arganier. Il fait de l'arganeraie une forêt domaniale dans laquelle les populations locales ont des droits d'utilisation étendus (**Chaussod, 2005**). Ces droits se résument en droit de labour des terrains, droit de collecte et cueillette des fruits et droit de ramassage du bois.
- Ressource alimentaire: L'huile d'argan est indispensable pour la survie de certaines populations qui vivent dans des zones pauvres et difficiles. Celles-ci la consomment quasi quotidiennement pour satisfaire en totalité leur demande métabolique en besoin lipidiques (**Adlouni, 2010**).

L'arganier a permis la création de plusieurs emplois via la création de coopératives féminines qui pratiquent un travail fastidieux et manuel pour extraire l'huile d'argan avec

minutie (la meule et les pierres), ces femmes ont un savoir-faire ancestral qui a été transmis de mère à fille afin de préserver cette tradition et valoriser leur produit local. L'arganier permet une stabilité de la population ce qui limite l'exode rurale. L'huile d'argan représente un produit international relativement nouveau et elle est exportée uniquement par le Maroc. Les distributeurs en Europe et en Amérique du Nord redistribuent l'huile dans le monde entier sur les marchés étrangers en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. En raison des propriétés uniques de l'huile d'argan, on peut supposer que les exportations augmenteront dans l'avenir (**Zougagh et al., 2011**).

- Ressource cosmétique et pharmacologique: l'huile d'argan, extraite de l'amande, couvre une production annuelle qui atteint 4 000 tonnes (**Khallouki et al., 2003**). Cette huile possède des propriétés biologiques remarquables qui favorisent son utilisation dans le domaine de la pharmacopée et la cosmétologie (**Nouaïm et al., 1991**).

### **C. Extraction d'arganier**

L'arganier fructifie dès l'âge de 5 ans. Sa floraison se fait aux mois de Mai et Juin, son fruit apparaît vers la fin des mois de Juillet ou début Août. Sa croissance lente s'étale jusqu'à la période de pluie en septembre (**Adlouni, 2010**).

La graine de l'arganier peut contenir deux à trois amandes à partir desquelles l'huile est extraite. Avant de commencer l'extraction de l'huile, le fruit et l'amande passent par une série de traitements qui rassemblent: le séchage, le dépulpage, le concassage, la torréfaction et la mouture. Une fois ces étapes accomplies, l'extraction de l'huile se fait selon deux procédés: traditionnel ou industriel.

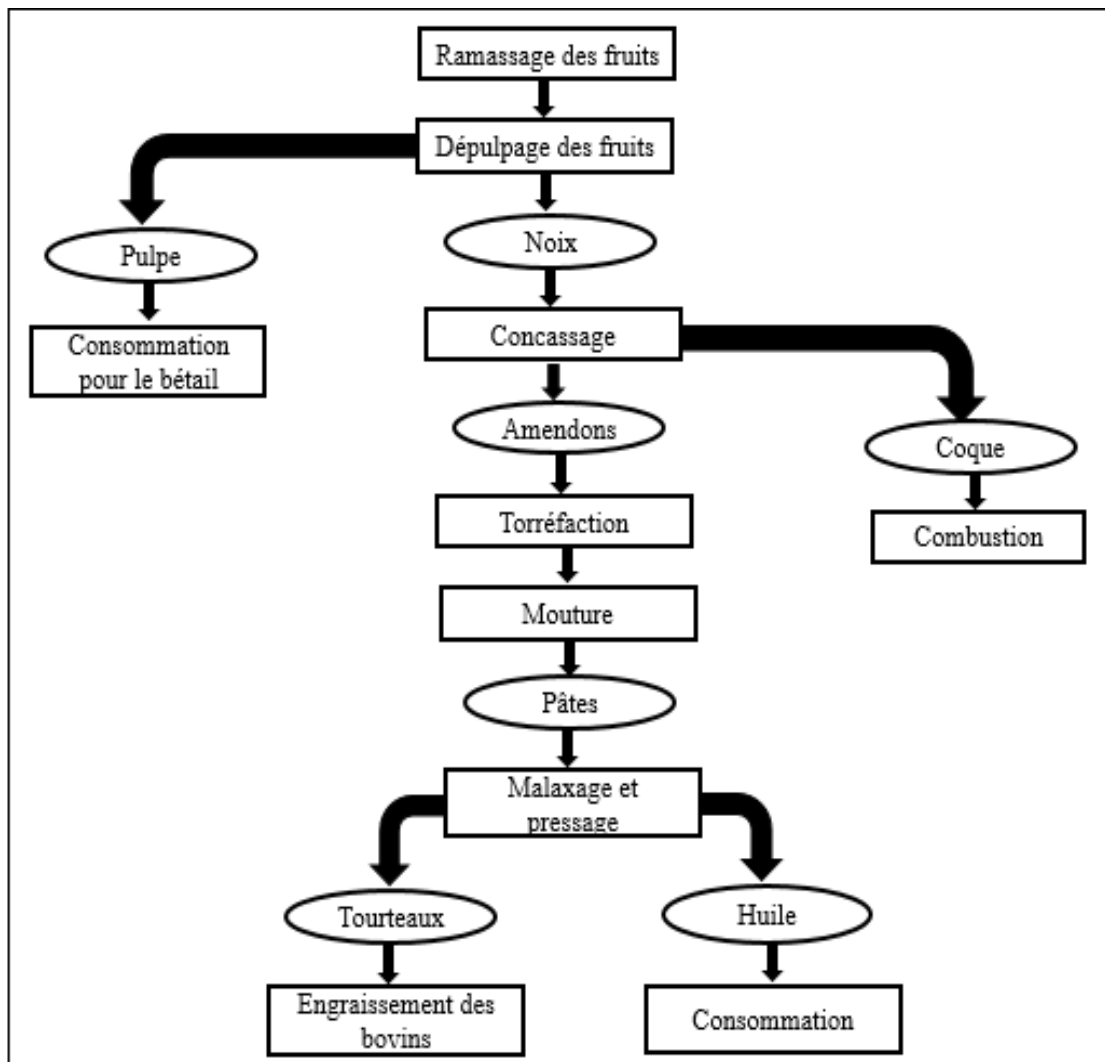
#### **1. Extraction de l'huile d'argan**

Une fois les fruits d'arganier sont arrivés à maturité, les cultivateurs battent les arbres avec des gaules pour faire tomber les fruits qui sont récoltés et mis à sécher au soleil (**Adlouni, 2010**).

##### ***1.1 Extraction traditionnelle***

L'extraction de l'huile d'argan est effectuée par les femmes berbères. Elle se fait en cinq étapes: dépulpage des fruits, concassage de la coque entre deux pierres, torréfaction de l'amande, broyage des amandes torréfiées à l'aide d'une meule en pierre et pression manuelle

de la pâte pour l'obtention de l'huile qui est séparée par décantation (Charrouf, 1991) (Figure 6).



**Figure 6:** Procédé traditionnel de fabrication de l'huile d'argan (Charrouf, 1991)

*Les formes rectangulaires représentent une opération et les formes élipitiques représentent un produit.*

L'extraction traditionnelle de l'huile d'argan est pénible et demande un travail fastidieux. Une personne a besoin de 58 h de travail pour extraire 2-2,5 L de l'huile à partir de 100 kg de fruits secs (Matthäus *et al.*, 2010). Le taux de cette extraction est d'environ 45 % avec un rendement dérisoire qui dépasse rarement 3 % du poids de fruit (Charrouf, 2002).

L'extraction se manifeste par des pertes de 20 à 25 % d'huile dans les tourteaux, et une perte d'ordre sanitaire et hygiénique. En milieu rural, les femmes utilisent l'eau pluviale

stockée dans les puits pour l'extraction de l'huile. Cette eau contient des germes suite à une analyse bactériologique (Charrouf, 2002). Cela pourrait induire des risques d'intoxications du fait qu'elle ne subit aucun traitement de raffinage.

### *1.2 Extraction par presse mécanique*

En 1985, il a été enregistré un brevet sur le premier procédé d'extraction mécanique. Cela a permis d'introduire la production mécanisée de l'huile d'argan dans les coopératives dans le sud-ouest du Maroc, afin de produire de grandes quantités d'huile d'argan de haute qualité. Grâce à cette technologie, 4-6 L d'huile peut être obtenue à partir de 100 kg de fruits secs après 13 h de travail par une seule personne (El Monfalouti *et al.*, 2010).

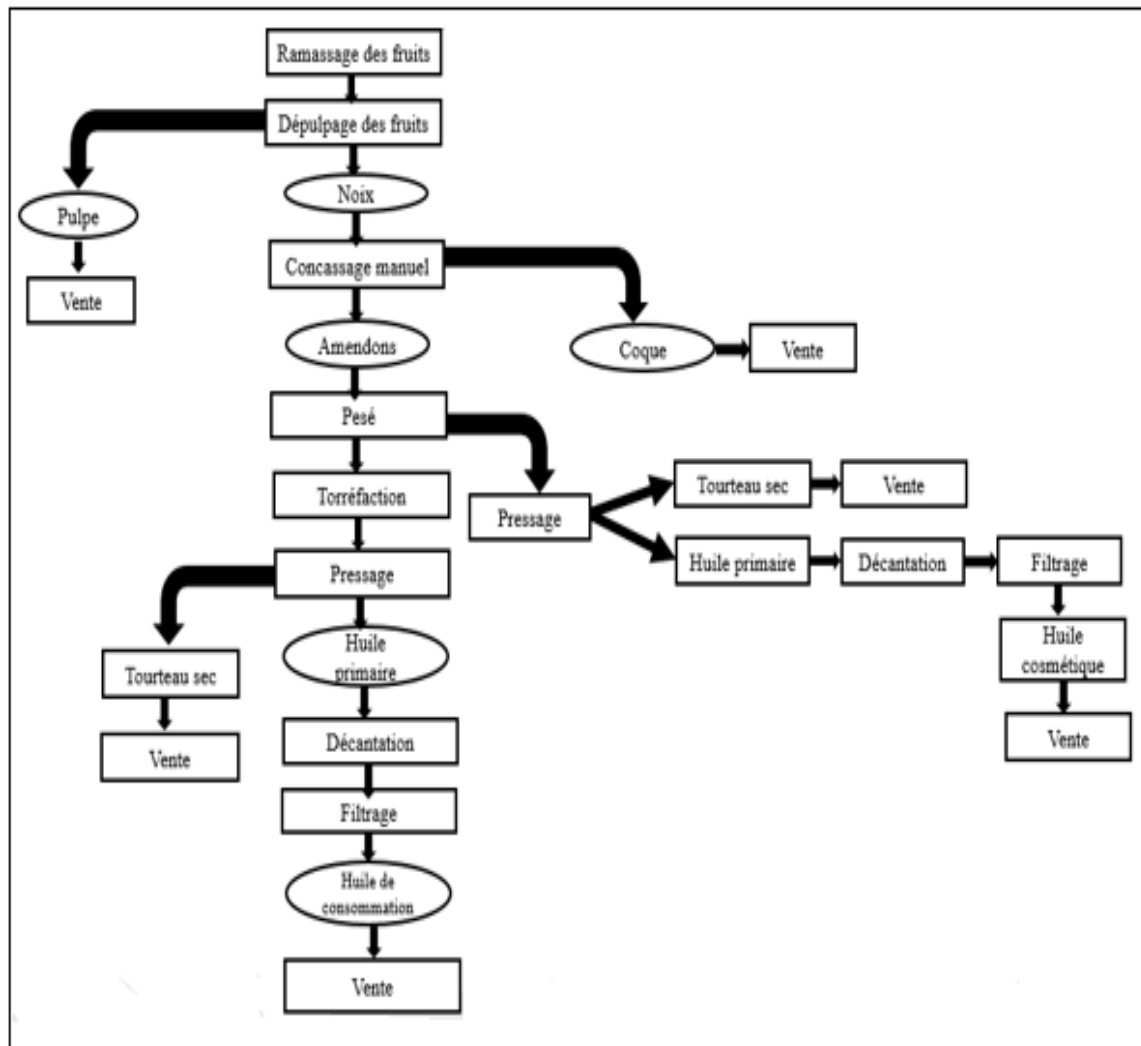
Ce processus a présenté un grand pas en avant dans l'histoire de la production de l'huile d'argan. Il commence par le dépulpage des fruits, l'étape la plus laborieuse qui est réalisée mécaniquement à l'aide d'une « dépulpeuse-gratteuse ». Aucune innovation actuelle n'a été faite sur l'étape de concassage qui reste toujours manuelle. En revanche, l'étape de torréfaction est faite par des torréfacteurs à gaz qui remplacent la torréfaction manuelle, ce qui permet d'obtenir des amandes de couleur homogène. La mouture et le malaxage se font par une presse à froid où la température ne dépasse pas 60°C lors de l'extraction de l'huile, (Figure 7) (Charrouf and Guillaume, 2008). Le pressage mécanique améliore le rendement d'extraction via la récupération de 10 % de l'huile restante dans les tourteaux. L'huile obtenue sera filtrée et mise en bouteille après avoir été décantée pendant 15 jours.



**Figure 7:** *Machines utilisées pour l'extraction par presse mécanique de l'huile d'argan*

A: Dépulpeuse; B: Torréfacteur à gaz; C: Presseuse de pâte

L'huile d'argan comestible est préparée à partir des amandes torréfiées, tandis que les amandes non torréfiées sont utilisées dans la production d'huile d'argan cosmétique (**Figure 8**).



**Figure 8:** Procédé semi industriel de la fabrication de l'huile d'argan (Charrouf, 1991)

*Les formes rectangulaires représentent une opération et les formes élipitiques représentent un produit.*

### 1.3 Extraction par solvant organique

Industriellement, l'huile d'argan cosmétique est préparée par extraction par solvant (ex. hexane) à partir des graines d'arganier écrasées avec un rendement d'extraction de 50 à 55 % (El Monfalouti *et al.*, 2010 ; Charrouf and Guillaume, 1999). Cette huile est exclusivement

destinée à l'usage cosmétologique (préparation des crèmes, shampooings et lotions pour le corps) où certains conservateurs sont souvent ajoutés pour compenser les agents protecteurs naturels perdus lors de l'extraction (tocophérols, les polyphénols, etc.) (El Monfalouti *et al.*, 2010).

## 2. Phytochimie de l'huile d'argan

### 2.1 Caractéristiques physicochimiques

L'huile d'argan se caractérise par un certain nombre de propriétés physicochimiques qui sont légèrement différentes en fonction des procédés d'extraction, de l'origine de l'amande et du mode de conservation (**Tableau 2**).

**Tableau 2:** *Caractéristiques physicochimiques de l'huile d'argan selon la Norme Marocaine 08.5.090 (2003)*

Paramètres	Valeur limite
Densité (g/mL)	0,917 - 0,919
Indice de saponification	189,0 - 199,1
Indice d'iode	99,0 - 102,0
Fraction insaponifiable	≤ 1,1%
Indice de réfraction à (20°C)	1,463 - 1,472

### 2.2 Composition chimique

#### a. Fraction glycérique (saponifiable)

L'huile d'argan renferme 99 % de la fraction saponifiable dont les triglycérides sont largement majoritaires avec 95 %. L'huile d'argan est riche avec des acides gras mono et polyinsaturés dont les plus abondants sont: l'acide oléique (C 18:1) qui représente 45 % des acides gras et l'acide linoléique (C 18:2n-6) qui représente 35 %. Cela confère à l'huile de très bonnes qualités diététiques.

L'acide linoléique est un acide gras essentiel (vitamine F). Il ne peut pas être synthétisé par l'organisme et il doit donc être absorbé sous forme d'huile végétale dans l'alimentation ou dans les produits cosmétiques. L'huile d'argan contient comme acides gras minoritaires; 12 % d'acide palmitique (C 18:2n-6) et 5 % d'acide stéarique (C 18:0)

(Cabrera-Vique *et al.*, 2012). Les autres acides gras sont trouvés à l'état de trace (Tableau 3).

**Tableau 3: Pourcentage d'acide gras dans l'huile d'argan selon la Norme Marocaine 08.5.090 (2003)**

Acide	Pourcentage (%)
Myristique	≤ 0,2
Pentadecaénoïque	≤ 0,1
Palmitique	≤ 11,5 – 15
Palmitoléique	≤ 0,2
Heptadécaneénoïque	-
Stéarique	4,3 - 7,2
Oléique	43 - 49,1
Linoléique	29,3 - 36,0
Linoléénique	≤ 0,2
Arachidonique	≤ 0,5
Gadoléique	≤ 0,5
Behénique	≤ 0,2

Les variations observées dans la composition en acides gras de l'huile d'argan peuvent être attribuées à différents facteurs et notamment à la provenance géographique et à l'effet du climat, en particulier à la pluviosité.

L'huile d'argan «vierge» est essentiellement composée d'acides gras insaturés d'isomérisation géométrique *cis* et, par conséquent, ne présentant aucun problème de digestion et d'assimilation par l'organisme humain. La présence d'acides gras *trans* dans les huiles d'argan «vierges», propres à la consommation, est l'indication de la présence frauduleuse d'huile raffinée. Pour cette raison, la teneur en acides gras *trans* a été limitée par la norme à 0,05 % aussi bien pour l'acide élaïdique que pour la somme des isomères *trans* des acides linoléique et linoléénique (Rahmani, 2005).

#### **b. Fraction insaponifiable**

La fraction insaponifiable est de composition chimique originale, elle représente 1 % de l'huile d'argan avec des propriétés thérapeutiques importantes. L'huile d'argan est riche en

caroténoïdes (37 %), tocophérols (8 %), alcools triterpéniques (20 %), stérols (29 %), et xanthophylles (5 %) (**Charrouf and Guillaume, 2007**).

- Caroténoïdes

Les caroténoïdes appartiennent à la classe des pigments naturels de couleur verte, orange, jaune ou rouge. La classe des caroténoïdes trouvés dans l'huile d'argan sont les xanthophylles avec une teneur de (500 mg/kg), responsables à la coloration rougeâtre de l'huile (**Charrouf and Guillaume, 2002**). L'huile d'argan est pauvre en provitamine A ( $\beta$ -carotène) qui est un précurseur de la vitamine A et l'analyse de la provitamine A dans l'huile d'argan sous forme de trans-  $\beta$ -carotène était négative (**Collier, 1974**).

- Squalène

La teneur en squalène des huiles d'argan est très importante (321 mg/100 g). Elle est nettement élevée par rapport à l'huile de tournesol (6 mg/100 g), et elle reste inférieure à celle de l'huile d'olive (499 mg/100 g) (**Khallouki et al., 2003**).

- Tocophérols

Les tocophérols jouent un rôle central autant que nutriments liposolubles essentiels, ils fonctionnent comme des antioxydants dans le corps humain. Les humains et les animaux ne peuvent pas les synthétiser; ils doivent donc les apporter de la nourriture. Parmi les produits alimentaires qui contiennent de l' $\alpha$ -tocophérol figurent les huiles végétales, les noix, les germes de blé, la laitue et beaucoup de fruits et légumes (**Borel et al., 2013**).

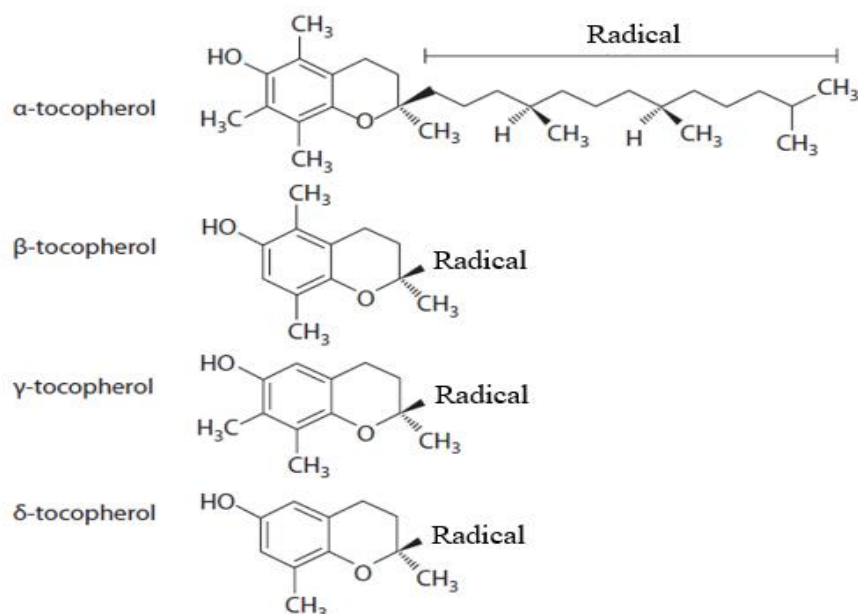
Selon le service de normalisation industrielle Snima, l'huile d'argan extra vierge contient 600 à 900 mg/kg de tocophérols totaux (**Tableau 4**) sous quatre formes, l' $\alpha$ -tocophérol, le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ - tocophérol.

**Tableau 4:** Pourcentage des tocophérols dans l'huile d'argan selon la Norme Marocaine 08.5.090 (2003)

Formes	Pourcentage (%)
$\alpha$ -tocophérol	2,4-4,8
$\beta$ -tocophérol	0,1-0,2
$\gamma$ -tocophérol	81-89
$\delta$ - tocophérol	6,2-8,2
Tocophérol totaux	600-700 mg / 100 g d'huile



L' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) possède la plus grande activité antioxydante ( $\alpha$ -tocophérol >  $\beta$ -tocophérol >  $\gamma$ -tocophérol >  $\delta$ -tocophérol) (Cardenas *et al.*, 2013) (Figure 9).



**Figure 9:** Structure chimique des tocophérols

#### - Alcools triterpéniques

Les alcools triterpéniques identifiées dans l'huile d'argan sont le lupéol (7,1 %), le butyrospermol (18,1 %), le tirucallol (27,9 %), le b-amyrine (27,3 %) et le et le 24-méthylène cycloartanol (4,5 %), ainsi que deux méthylstérols : le 4-a-méthylstigmasta-7,24-28-diène-3 $\beta$ -ol ou citrostadiénol (3,9 %) et le cycloeucaoléol (< 5 %) (Rahmani, 2005).

#### - Phytostérols

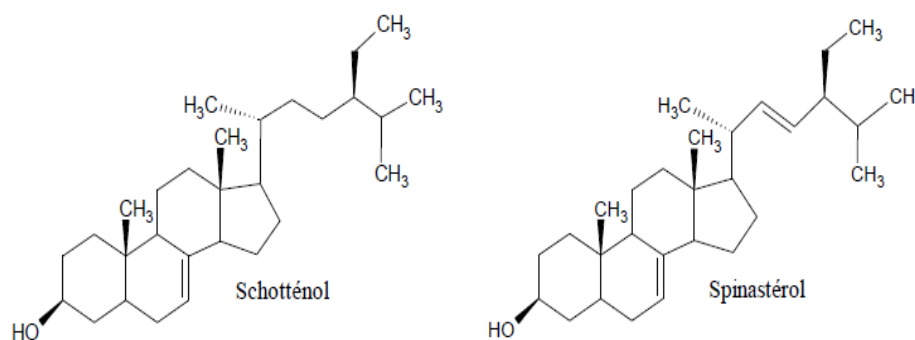
Les phytostérols sont des composés naturels présents dans les plantes oléagineuses (Lecerf, 2007). Ils sont structurellement proche au cholestérol et présentent des résidus méthyl ou éthyl, principalement en C<sub>28</sub> et C<sub>29</sub> (Otaegui-Arrazola, 2010). Les phytostérols sont généralement tirés d'huiles végétales (soja, maïs, tournesol, canola).

L'huile d'argan renferme quatre stérols dérivés du stigmastane, le schotténol (49 %) et le spinastérol (44 %), et en faible quantité le  $\delta$ -7 avénastérol, le stigma-8,22-dien-3 $\beta$ -ol ainsi que le compestérol (Khellouki *et al.*, 2003) (Tableau 5).

**Tableau 5: Pourcentage des stérols dans l'huile d'argan selon la Norme Marocaine 08.5.090 (2003)**

Formes	Pourcentage (%)
Schotténol	44 – 49
Spinastérol	34 - 44
δ- 7 avénastérol	4 – 7 %
Compestérol	≤ 0,14
Stérols totaux	≤ 170 mg/100g

Schotténol et Spinastérol sont présents dans l'huile d'argan et l'huile de graine de cactus (El kharrassi *et al.*, 2014 ; Badreddine *et al.*, 2015) (Figure 10).



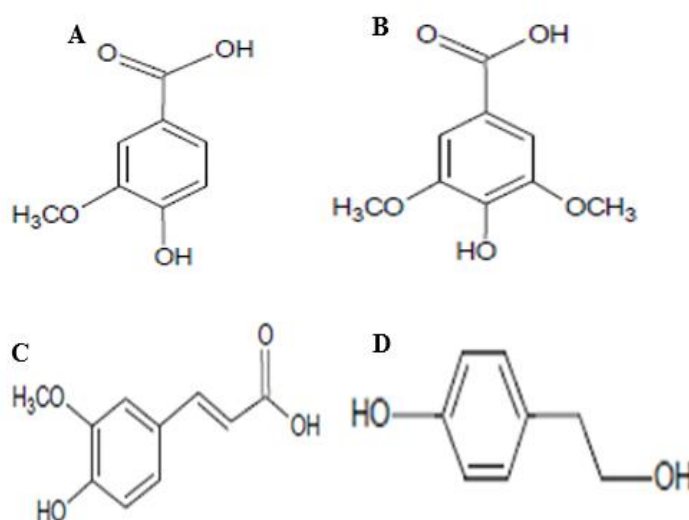
**Figure 10: Structure chimique du Schotténol et Spinastérol**

#### - Polyphénols

Les polyphénols sont particulièrement réputés pour leurs vertus sur la santé. L'huile d'argan contient quatre polyphénols : acide vanillique, acide syringique, acide férulique et tyrosol (Figure 11). L'huile d'argan contient une quantité importante d'acide férulique qui est de l'ordre de 3147 µg / kg d'huile (Khallouki *et al.*, 2003) (Tableau 6).

**Tableau 6: Composés phénoliques de l'huile d'argan**  
(Khallouki et al., 2003)

Composés phénoliques (µg/kg)	
Acide Vanillique	67
Acide Syringique	37
Acide Ferulique	3147
Tyrosol	12
Total	3263



**Figure 11: Composés phénoliques de l'huile d'argan**

**A :** Acide vanillique, **B:** Acide syringique, **C:** Acide férulique;

**D:** Tyrosol

### 3. Utilisation de l'huile d'argan

La composition chimique de l'huile d'argan suscite un grand intérêt aussi bien pour des études liées à ses potentialités nutritionnelles que pour son utilisation en cosmétologie. Majoritairement utilisée comme produit cosmétique, l'huile d'argan l'est aussi en cuisine.

- Utilisation diététique

L'huile d'argan est reconnue depuis des siècles comme ingrédient de base, et de source exclusive de matières grasses végétales dans « l'alimentation Amazighs » (**Charrouf and Guillaume, 2010**), environ deux cuillères à soupe (16 g) assurent la totalité des besoins journaliers en acide linoléique.

L'huile d'argan est utilisée par la population berbères quasi quotidiennement en cuisine pour assaisonner des plats, des salades et des tajines. Elle est consommée au petit-déjeuner ou au goûter, en trempant le pain traditionnel dans un bol rempli d'huile (**Adlouni, 2010**). Elle est servie sous forme tartinée connu par « *amlou* », c'est une recette à base de l'huile d'argan, amandes et cacahuètes.

- Utilisation en médecine traditionnelle

L'huile d'argan est largement reconnue en médecine traditionnelle marocaine en raison de ses diverses propriétés thérapeutiques. C'est un remède naturel précieux. Elle est utilisée pour le traitement des rhumatismes, l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose (**Charrouf, 2002**).

- Utilisation cosmétique

L'huile d'argan renferme des propriétés anti-âges en prévoyant l'apparition des rides, elle régénère et apaise rapidement les peaux les plus sèches et desquamées. L'huile d'argan est utilisée comme une huile hydratante pour le visage, les mains et les pieds. Elle nourrit les cheveux cassants et empêche leur chute (**Moukal, 2004**).

#### 4. Vertus de l'huile d'argan

L'huile d'argan possède des vertus naturelles susceptibles de soigner plusieurs maladies.

##### 4.1 Préventions des maladies cardiovasculaires

La consommation régulière de l'huile d'argan peut prévenir les maladies cardiovasculaires (**Cherki et al., 2006**). Sur le plan structural, la composition chimique de l'huile d'argan riche en acides oléiques / linoléiques et en vitamine E est différente des autres huiles alimentaires habituellement consommées. Cette composition lui confère des effets bénéfiques contre les maladies cardiovasculaires.

Une étude de cohorte sur 60 personnes consommateurs de l'huile d'argan, ont montré une diminution de 50 % du risque de développer une hypertension artérielle (**Berrougui et**

*al.*, 2004), un taux plasmatique élevé pour la vitamine E et des taux en triglycéride et en LDL inférieurs à ceux des sujets qui ne consomment pas cette huile (**Drissi et al.**, 2004). Ces résultats indiquent que l'huile d'argan possède des propriétés hypotensives, hypolipémiantes et antioxydantes bénéfiques pour la santé humaine, même si les mécanismes physiologiques précis conduisant à ces activités restent à élucider (**Adlouni**, 2010).

Une consommation quotidienne de 25 mL de l'huile d'argan conduit à une augmentation du taux de cholestérol HDL plasmatique et diminue le taux de triglycérides plasmatiques (17,5 %) chez les hommes sains (**Derouiche et al.**, 2005). L'activité hypocholestérolémiant de l'huile d'argan a été prouvée par des tests cliniques. L'ingestion de deux cuillérées à soupe d'huile d'argan, par jour et pendant un mois induit une baisse de cholestérol de 7,9 % pour les femmes et de 13,1 % pour les hommes au bout d'un mois de traitement. Parallèlement à la baisse du cholestérol total, une diminution du taux des triglycérides a été observée (**Charrouf**, 1997). L'huile d'argan administrée à 5 mL / kg par jour pendant 10 j et à 10 mL / kg par jour pendant 7 semaines (**Berrougui et al.**, 2003) chez les rats hyperlipidémiques a montré une diminution de 37 % du taux de cholestérol sanguin, de 67 % des LDL, de 31 % des triglycérides et de 13 % du poids corporel.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'huile d'argan pourrait être utilisé comme aliment fonctionnel pour réduire le risque cardiovasculaire.

#### **4.2 Prévention du diabète**

Chez l'homme, aucune étude n'a été réalisée pour évaluer l'effet de l'huile d'argan sur le diabète. Des études sur les animaux indiquent que cette huile pourrait avoir des effets anti-diabétiques (**Bnouham et al.**, 2008 ; **Bellahcen et al.**, 2012). L'administration de l'huile d'argan vierge à des rats n'a aucun effet sur le niveau de la glycémie à jeun (**Bellahcen et al.**, 2012). Un régime à base d'huile d'argan réduit significativement le taux de la glycémie chez des rats sains rendus diabétiques (**Emonard et al.**, 1999).

Dans un modèle de diabète induit par l'administration d'Alloxane, les résultats montrent une diminution du taux de glucose dans le sang, une augmentation du glycogène hépatique et la prévention de la perte de poids chez les rats diabétiques prétraités avec huile d'argan (2 mL / kg) pendant 7 jours avant l'induction d'un diabète de type 1 (**Bellahcen et al.**, 2012). Le mécanisme de la régulation du niveau de glucose dans le sang reste encore inconnu. Les effets antidiabétiques de l'huile d'argan sont attribués à son profil d'acide gras et de sa

teneur élevée en tocophérols et polyphénols (acide férulique) qui améliorent le statut antioxydant au niveau des tissus (**Ohnishi et al., 2004**).

#### 4.3 Prévention du cancer de la prostate

La richesse de l'huile d'argan en polyphénols, stérols et en tocophérols a contribué de prévenir le cancer de prostate grâce à plusieurs études.

L'étude de l'effet antiprolifératif des tocophérols, polyphénols et stérols de l'huile d'argan présentent une activité cytotoxique et exercent un effet inhibiteur dose-dépendant sur la prolifération des trois lignées tumorales prostatiques testées DU145, PC3, LNCaP (**Bennani et al., 2007**).

En présence de vitamine E aux concentrations physiologiques, on note un arrêt total du cycle mitotique par une up-régulation de la protéine P27 du cycle cellulaire (**Zhang et al., 2004 ; Venkateswaran et al., 2002**).

Les polyphénols exercent une activité anti-tumorale préventive évaluée sur DU145, PC3, LNCaP par une série de mécanismes d'action tels que: l'inhibition d'une enzyme fortement exprimée dans le cancer de la prostate, l'ornithine décarboxylase, l'inhibition de la NO synthase ou aussi l'inhibition de l'autophosphorylation du récepteur de l'EGF (facteur épithélial de croissance) (**Wang et al., 2003**).

Dans une étude indépendante, l'effet antiprolifératif du squalène et de l'extrait riche en polyphénols de l'huile d'argan a été clairement mis en évidence sur deux lignées de cellules (fibrosarcome humaine HT-1080 et les cellules transformées et invasives MSV-MDCK-inv). Sur des cellules en culture de tissu d'hépatome, il a été montré que le squalène est l'extrait riche en polyphénols de l'huile d'argan réduit la capacité des kinases régulées par des signaux extracellulaires 1 et 2 (ERK1/2) pour répondre à l'augmentation des doses d'insuline (**Samane et al., 2006**).

L'huile d'argan est riche en phytostérols, appartenant tous à la famille des D7-stigmastanes. Les stérols majoritaires sont le schotténol et le spinastérol. Il est démontré que le spinastérol provoque une réduction du taux de cholestérol dans le plasma et le foie des souris, modulés aussi par une augmentation de l'excrétion fécale (**Uchida et al., 1983**). Le schotténol est démontré être un anti-cancérigène avec un potentiel cytotoxique prononcé (**Samane et al., 2006**).

Le traitement des cellules tumorales de prostate humaine LNCaP, avec  $\beta$ -sitostérol, provoque une diminution de 24 % de la croissance et une multiplication par 4 du taux d'apoptose par rapport aux mêmes cellules traitées par le cholestérol (**Von Holtz et al., 1998**).

Ces résultats sont prometteurs dans la mesure où les phytostérols de l'huile d'argan pourraient exercer d'incontestables effets anti-cancérigène contre le cancer de la prostate (**Bennani et al., 2007**).

De même, les saponines du tourteau de l'huile d'argan, sont capables d'inhiber de façon dose-réponse la prolifération cellulaire des DU145, LNCaP et PC3 (**Drissi et al., 2006**).

Les antioxydants présents dans l'huile d'argan (**Russo, 2009**) sont censés prévenir ou retarder l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (**Pauly et al., 2006**).

#### ***4.4 Huile d'argan en dermocosmétique***

La richesse de l'huile d'argan en acide linoléique lui confère des propriétés revitalisantes sur la peau. L'huile d'argan est démontrée avoir un effet hydratant et restructurant de la peau par des tests sur des animaux carencés en acides gras essentiels (**Fabre, 1999**). Cet effet hydratant a été confirmé en clinique (**Galli and Calder, 2009**). La carence en AGE, inévitable avec l'âge, cause un vieillissement cutané qui se traduit par un dessèchement et une perte d'élasticité de la peau, favorisant ainsi l'apparition des rides. La correction d'une carence en AGE permet de retarder le vieillissement cutané (**Adlouni, 2010**).

#### ***4.5 Prévention des maladies neurodégénératives***

Actuellement, l'intérêt pour l'huile d'argan et pour ses effets physiologiques s'est considérablement développé, ce qui a eu pour résultat, de faire passer le statut de cette huile d'un produit alimentaire diététique à celui d'un produit très prisé pour ces qualités antioxydantes et nutritionnelles. Elle est caractérisée par une composition riche en stérols et en antioxydants tels que les polyphénols, et plus particulièrement les tocophérols.

La neuroprotection par les antioxydants a donc suscité beaucoup d'intérêt. La majorité des recherches sur le rôle des antioxydants alimentaires dans la fonction neurologique et dans certaines maladies est centrée sur la vitamine E. Il a été démontré que la vitamine E a un rôle essentiel dans le maintien de la fonction neurologique. La supplémentation par voie orale de la vitamine E atteint le liquide céphalo-rachidien et le cerveau (**Sen et al., 2004**).

La teneur élevée des tocophérols dans l'huile d'argan lui confère certains effets protecteurs contre les maladies neurodégénératives.

Le glutamate est le principal médiateur de signaux excitateurs dans le système nerveux central des mammifères. Des quantités extrêmes de glutamate dans les espaces extracellulaires peuvent conduire à de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Il a été démontré que l' $\alpha$ -tocophérols ( $\alpha$ -TCP) et son isomère tocotriénol (TRF) sont des agents neuroprotecteurs puissants contre la toxicité induite par le glutamate sur les cellules SK-N-SH neuronales et les astrocytes. Ceci indiquent également que le TRF et l' $\alpha$ -TCP pourraient jouer un rôle clé en tant qu'agents anti-apoptotiques avec des propriétés neuroprotectrices (**Rati Selvaraju et al., 2014**).

Dans les conditions oxydantes, le 7-cétocholestérol (7KC) résultant de l'auto-oxydation du cholestérol, identifié en quantité augmentée dans certains tissus, dans le plasma et dans le liquide céphalorachidien de malades atteints de maladies liées à l'âge (en particulier maladies neurodégénératives) exerce plusieurs activités délétères (activités pro-oxydantes, pro-inflammatoires et induction de mort cellulaire) qui peuvent contribuer à ces pathologies (**Vejux and Lizard 2009 ; Zarrouk et al., 2014**). Il a été admis que l' $\alpha$ -tocophérol est capable d'inhiber les effets délétères du 7KC et le  $\beta$ 7-OHC sur des oligodendrocytes murins 158N (**Ragot et al., 2011 ; Ragot et al., 2013**).

L' $\alpha$ -tocophérol a montré qu'il pouvait contrecarrer les effets toxiques induits par le 7KC au niveau de la dépolarisation des mitochondries mais aussi au niveau de la surproduction des ERO (espèces réactives d'oxygène). L' $\alpha$ -tocophérol empêche la mort par apoptose des oligodendrocytes murins 158N et bloque le processus d'autophagie et d'apoptose induit par 7KC (oxyapoptophagie) (**Nury et al., 2014**). Il a été montré que la protection induite par l' $\alpha$ -tocophérol passe en partie par le fait qu'elle empêche le 7KC de s'accumuler dans les radeaux lipidiques des cellules 158N (**Nury et al., 2013; Ragot et al., 2011**). L' $\alpha$ -tocophérol empêche la déphosphorylation d'Akt et de GSK3 et la dégradation de Mcl-1 qui mène à une mort par apoptose dans les cellules 158N (**Ragot et al., 2011**).

Les phytostérols se trouvent en quantité majoritaires de l'huile d'argan, essentiellement spinastérol et schottérol. Ils sont des composés naturels, structurellement proches au cholestérol. Il a été montré qu'ils sont capables de traverser la barrière encéphalique et de moduler le processus moléculaire impliqué dans les maladies d'Alzheimer, tels que le clivage d'APP et la formation de plaques bêta amyloïdes (**Burg et al., 2013 ; Shi et al., 2011**).



Il a été démontré que les stérols végétaux réduisent la production d'A $\beta$  *in vitro* en affectant l'expression, l'activité et la disponibilité des sécrétases impliquées dans la voie amyloïde. En particulier, le stigmastérol diminue l'activité de  $\beta$ -sécrétase, réduit l'expression de tous les composants de  $\gamma$ -sécrétase, et diminue l'intériorisation du BACE1 dans les compartiments d'endosomes impliqués dans le clivage de l'APP.

En parallèle l'activité de  $\gamma$ -sécrétase a diminué significativement dans le système nerveux central de souris C57BL/6J nourries avec 0,39 % de stigmastérol. Ceci suggère qu'un apport alimentaire riche en phytostérols, essentiellement en stigmastérol, pourrait être bénéfique dans la prévention contre la maladie d'Alzheimer (**Burg et al., 2013**).

Plusieurs études ont défini que les phytostérols végétaux, tels que le sitostérol, fucostérol, stigmastérol, schotténol, 24 (S)-ergostérol et spinastérol, sont capables de se lier et d'activer LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  (**Chen et al., 2014 ; Plat et al., 2005 ; El Kharrassi et al., 2014**). Ils se sont révélés comme des ligands de LXR (**Law 2000 ; Plat et al., 2005**). LXR existe sous deux formes qui sont LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ . Ces récepteurs nucléaires sont considérés comme des intégrateurs de signalisation métabolique et inflammatoire, en particulier dans le cerveau (**Zelcer et al., 2006**). Le rôle joué par LXR dans les maladies neurodégénératives, en particulier la MA, dans la sclérose latérale amyotrophique et dans la maladie de Parkinson, est encore peu connu (**Kim et al., 2008 ; Zelcer et al., 2007**). LXR (Liver X Receptor) est un facteur de transcription qui est principalement impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides et du cholestérol. Il régule la sensibilité des neurones moteurs et des cellules gliales aux phytostérols (**Kim et al., 2008 ; Zelcer et al., 2007**).

Les effets de spinastérol et du schotténol ont été évalués sur des oligodendrocytes murins 158N, des cellules de gliome de rat C6 et des cellules neuronales humaines SK-N-BE. Spinastérol et schotténol n'ont aucun effet ou de faibles effets sur la croissance cellulaire; ils peuvent moduler l'activité mitochondriale et pourraient donc influencer sur le métabolisme cellulaire. L'acide férulique n'a aucun effet ou de légers effets sur ces cellules (**Baderddine et al., 2015**).

Cet impact du spinastérol et schotténol sur l'activité mitochondriale est en accord avec les données obtenues sur les cellules microgliales murines BV-2 ayant montré une perte de potentiel transmembranaire mitochondrial mesurée au niveau cellulaire par cytométrie de flux avec la sonde fluorescente DiOC<sub>6</sub>(3) (**El Kharrassi et al., 2014**). Ces données confirment

également un certain nombre d'études montrant que les mitochondries constituent la cible directe ou indirecte des phytostérols (**Lizard, 2011**).

Un grand nombre d'études indiquent que le stress oxydatif et les dysfonctions mitochondriales jouent un rôle important dans la MA. La suppression ou la réduction du stress oxydant et des dysfonctions mitochondriales par utilisation d'antioxydants pourrait être une intervention préventive ou thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de MA.

De nombreux composés antioxydants se sont révélés capables de protéger le cerveau contre la neurotoxicité d'Aβ dans la MA. L'acide férulique est un antioxydant naturellement présent dans les parois cellulaires des plantes. Il a des activités anti-inflammatoires et il est capable d'agir comme piègeur de radicaux libres. Il a été démontré que l'acide férulique agit comme inhibiteur de la formation des structures amyloïdes (**Sgarbossa et al., 2015**).

La douleur neuropathique peut être considérée comme une forme de stress chronique qui peut partager un mécanisme neuropathologique commun entre la douleur et la dépression liée au stress. Il a été prouvé sur des souris transgéniques que l'effet analgésique de l'acide férulique est éventuellement médié par son effet modulateur sur le système de monoamine spinale (récepteur bêta2 adrénergiques et 5-HT1A) et par sa capacité à diminuer l'expression du récepteur delta-opioïde (**Ying et al., 2016**).

#### ***4.6 Influence sur le profil hormonal de la thyroïde***

La thyroïde est une glande endocrine dont le fonctionnement est intimement associé au rôle biologique de l'iode. Les hormones thyroïdiennes (HT) et le métabolisme des acides gras sont étroitement liés. L'influence de la consommation d'huile d'argan sur le profil thyroïdien a été évaluée dans une étude de cohorte réalisée sur 149 volontaires avec euthyroïdie consommant du sel non iodé en mesurant les concentrations plasmatiques de tri-iodothyronine (FT3), tétra-iodothyronine (FT4) libres, cette dernière hormone stimulant la thyroïde.

Cette étude témoigne qu'il n'y a pas de différence significative des concentrations de ces hormones entre les consommateurs et les non-consommateurs des deux populations. Ceci laisse supposer que la consommation de l'huile d'argan n'a pas d'influence sur les HT des sujets sains (**Derouiche et al., 2005**).

#### ***4.7 Influence sur le système immunitaire***

L'effet de l'huile d'argan alimentaire sur le système immunitaire a été évalué sur des rats. Ces études ont conclu que les effets de l'huile d'argan et de l'huile d'olive sur les cellules immunitaires sont semblables, et que l'huile d'argan n'aurait pas d'effets marqués sur la fonction des cellules immunitaires (**Benzaria *et al.*, 2006**).

#### ***4.8 Propriétés d'anaphylaxie***

Le premier, et jusqu'à présent l'unique cas enregistré d'une allergie à l'huile d'argan a été présenté récemment. L'Allergène a été caractérisée comme une protéine de 10 kDa, appartenant probablement à la famille des oléosines qui est également rencontrées dans l'arachide et le sésame (**Astier *et al.*, 2010**).

## II. SYSTEME NERVEUX CENTRAL

### 1. Généralité

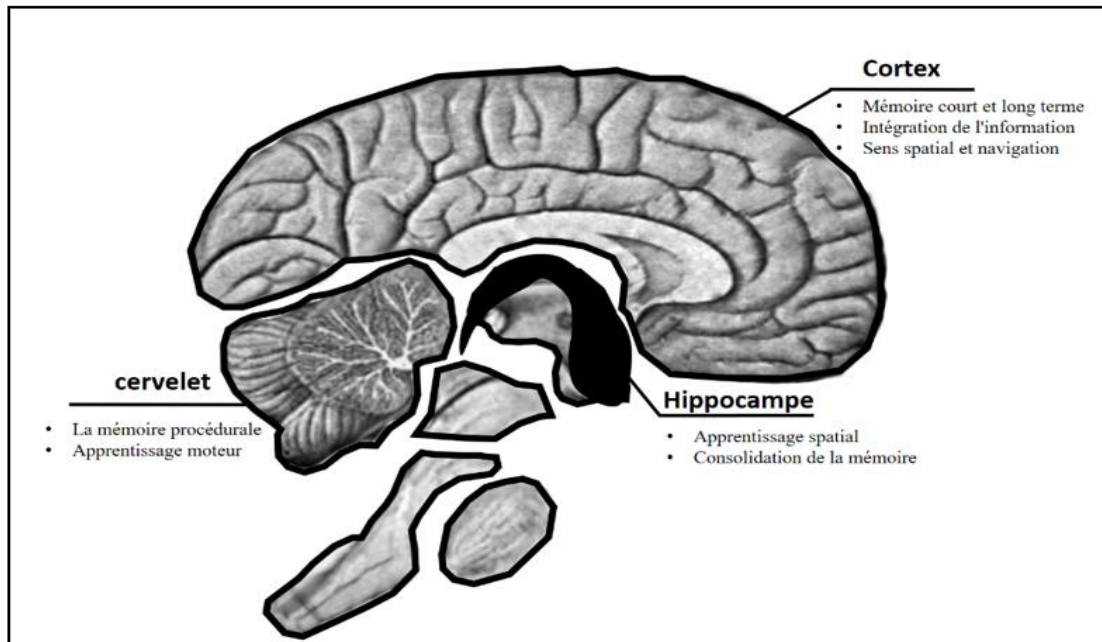
Le système nerveux se caractérise par deux propriétés essentielles qui sont l'excitabilité (la capacité de réagir à des stimuli physiques et ou chimiques) et la conductivité (capacité de propager l'excitation d'une cellule à l'autre, sur de longues distances). Lors de la réception d'un signal provenant de l'environnement interne ou externe, diverses formes d'énergie sont traduites et encodées en impulsions électriques par des structures spécialisées appelées récepteurs. Les signaux codés dans l'activité électrique des cellules (les impulsions ou l'influx nerveux) sont transmis depuis le récepteur vers les centres nerveux où ils évoquent dans d'autres cellules certaines excitations qui sont intégrées puis distribuées aux systèmes effecteurs (muscles, glandes). Cette activité harmonieusement intégrée résulte en sensations et en réponses appropriées. Cela permet à l'organisme d'agir aux différents événements externes de façon à maintenir son intégrité et assurer la survie de l'espèce. En essence, nous sommes ce qui est notre cerveau (**Goffinet, 1994**).

Le système nerveux central joue un rôle essentiel dans l'organisme dans le comportement conscient et inconscient de l'individu. Le SNC comprend le cerveau et la moelle épinière et il est protégé par la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Il est principalement formé de substance blanche et de substance grise (**Kiernan and Rajakumar, 1957**). Le cerveau est composé du télencéphale et du diencephale. Le télencéphale est constitué de deux hémisphères séparés par la scissure interhémisphérique où pénètrent les méninges et il est formé de :

- Substance grise externe appelée **cortex** qui contient 70% des neurones de cerveau, et considéré comme étant le centre de conscience et d'intelligence.
- Substance blanche sous-jacente, correspond aux axones des neurones. Elle est constituée de fibre de myéline. La couleur blanche est due au contenu lipidique de la gaine de myéline. La substance blanche est connue sous le nom d'**hippocampe**, qui est le siège de la mémoire, d'attention, d'émotion, et de comportement (**Figure 12**).
- et de structures profondes appelées noyaux gris centraux.

Le diencephale réunit les deux hémisphères cérébraux par le corps calleux et par le trigone cérébral. Il fait la jonction entre le télencéphale et le tronc cérébral. Ses principaux constituants sont le **thalamus**, c'est là où aboutissent toutes les sensations avant qu'elles soient projetées vers la conscience, et l'**hypothalamus** qui s'occupe du maintien de l'équilibre

physiologique du corps. L'encéphale est constitué du tronc cérébral et du cerveau. Il contrôle la plupart des fonctions du corps, dont la perception, les mouvements, les sensations, les pensées, la parole et la mémoire.



**Figure 12:** Les zones de cerveau et la mémoire

Plusieurs zones de cerveau sont impliquées dans la mémoire. L'hippocampe est impliqué dans l'apprentissage spatial et la consolidation de la mémoire. Le cervelet joue un rôle dans la mémoire procédurale et l'apprentissage moteur. Le cortex cérébral joue un rôle clé dans différents types de mémoire.

## 2. Bases biologiques de la mémoire

Le système nerveux est constitué de milliards de neurones ayant des fonctions différentes. Le cerveau est l'un des organes les plus compliqués dans le corps humain, lui-même est un réseau complexe de neurones servant à intégrer les informations sensorielles et à décider d'une réponse motrice ou d'un comportement. Chaque neurone reçoit des informations de milliers d'autres neurones par l'intermédiaire de plusieurs milliers de connexions synaptiques, réparties le long de ses dendrites. La mémoire est définie comme la capacité à interpréter, stocker et réutiliser les informations. Le comportement des animaux est très influencé par leur mémoire. L'apprentissage est considéré comme la phase d'acquisition ou d'interprétation de l'information de la mémoire. L'absence ou présence de mémoire est souvent définie comme un changement d'un comportement particulier (exemple : un rat avec

des lésions à l'hippocampe peut se perdre dans un labyrinthe spatial), ou alors, comme un changement de capacité apprendre / souvenir (Stuchlik, 2014).

On distingue aujourd'hui deux types de mémoire : mémoire à court terme appelée aussi mémoire de travail, et mémoire à long terme. La mémoire à court terme (MCT) est une sorte de bloc-notes où sont stockées les informations utiles pour une durée limitée. Cette capacité de retenir temporairement une information en vue de mener à bien une tâche est spécifiquement humaine. Son contenu est régulièrement actualisé et effacé une fois les informations traitées pour la tâche en cours. La mémoire de travail est nécessaire pour réaliser des activités cognitives complexes, telles que la compréhension, l'apprentissage ou encore le raisonnement. Elle rend très active certaines régions de notre cerveau, en particulier le **cortex préfrontal**, qui joue le rôle d'un centre exécutif qui planifie les actions et adapte le comportement aux informations, à mesure qu'elles se présentent. La mémoire à long terme (MLT) est définie comme un système à capacité indéfinie, théoriquement illimitée, dans lequel l'information est détenue de façon durable et même pendant toute la vie. La MLT est dépositaire de nos souvenirs, de nos apprentissages, en résumé, de notre histoire. Le passage de la mémoire à court terme à la mémoire à long terme s'effectue grâce à l'**hippocampe**, situé dans le repli du lobe temporal (**Figure 12**). Toutes les informations décodées dans les aires sensorielles du cortex convergent vers l'hippocampe, qui les retourne ensuite d'où elles viennent. C'est un peu comme un centre de tri qui compare les sensations nouvelles avec celles déjà enregistrées. Ce sont les multiples passages dans l'hippocampe qui nous permettent de retenir des faits nouveaux. Au bout d'un certain temps, le travail de l'hippocampe ne sera plus nécessaire, le cortex aura appris à lier lui-même les différentes caractéristiques pour en faire un souvenir. L'hippocampe tient donc un rôle essentiel, et indispensable à la formation des souvenirs et à leur conservation (de quelques mois à quelques années). Ces souvenirs restent stockés de façon permanente dans les régions corticales, et comme les neurones de l'hippocampe disposent des prolongements, cela leur permettent de communiquer avec d'autres neurones de cortex. Des lésions de l'hippocampe et ou des régions avoisinantes provoqueront une perte immédiate et dévastatrice de la mémoire (Stuchlik, 2014). Les informations que nous percevons sont organisées et régies par des systèmes qui fonctionnent en relation permanente. On fait une distinction entre la mémoire sémantique (mémoire des faits et des connaissances générales) et la mémoire épisodique (ou mémoire des événements, contenant les éléments du passé individuel) d'une part, et entre la mémoire procédurale (correspond à nos capacités d'apprentissage d'une habileté motrice: lire,

conduire, skier...) et la mémoire déclarative (correspond aux informations stockées qui sont facilement verbalisables et accessibles à la conscience : langage et image), d'autre part. Le stockage de la MLT commence au niveau de la synapse. La transmission synaptique est considérée comme étant une communication cellule – cellule bidirectionnelle (**Jessell and Kandel, 1993**). La plasticité synaptique est placée au cœur de nombreux troubles de cerveau, elle est caractérisée par deux manifestations électrophysiologiques importantes : la potentialisation à long terme (PLT) et la dépression à long terme (DLT). Les PLT et DLT sont des mécanismes cellulaires responsables de l'apprentissage hippocampique et de la mémoire (**Bliss et al., 2013**). La PLT est induite après une brève stimulation électrique à haute fréquence (tétanisation 100 Hz pendant une seconde) d'une voie nerveuse de l'hippocampe qui a provoqué une augmentation durable (de plusieurs heures *in vitro* et plusieurs jours *in vivo*) de l'efficacité de la transmission synaptique, alors que DLT est induite après une longue stimulation à basse fréquence aboutissant à une diminution persistante de l'intensité de transmission synaptique.

### **3. Cellules gliales du système nerveux central**

Le système nerveux comprend deux grandes catégories fonctionnelles : le système nerveux central (cerveau et moelle épinière). Son rôle est de recevoir, enregistrer, interpréter les signaux qui parviennent de la périphérie, et organiser la réponse à envoyer. Et le système nerveux périphérique qui comprend les nerfs crâniens et les nerfs spinaux qui sont rattachés au système nerveux central. Son rôle est de conduire jusqu'au système nerveux central les informations issues des récepteurs périphériques de la sensibilité ou de la douleur, et de transmettre les ordres moteurs émis par les centres nerveux. Au niveau cellulaire, les cellules du système nerveux peuvent être subdivisées en deux grands types : les cellules nerveuses ou neurones, se sont des cellules spécialisées dans la réception, l'intégration et la transmission d'informations, et les cellules gliales, qui sont 10 fois plus nombreuses que les neurones. Ces cellules assurent un support physique et un soutien nutritionnel des neurones (cellules nourricières). Le système nerveux central comprend les cellules microgliales et macrogliales (astrocytes, épendymaires et oligodendrocytes), alors que le système nerveux périphérique comprend les cellules de Schwann.

### 3.1 Les cellules microgliales

Les cellules microgliales se caractérisent par leur très petite taille « microglie ». Elles sont visibles qu'en cas de lésion du système nerveux afin d'en assurer sa défense immunitaire. Se sont les macrophages qui résident le SNC ; ils représentent environ 10% de la population du SNC et jouent un rôle crucial non seulement dans la neurogenèse, la plasticité neuronale, et la régénération, mais aussi en tant que première ligne de défense immunitaire dans en cas de tout type de lésion cérébrale. Elles ont la capacité à phagocyter le produit toxique, de libérer des facteurs cytotoxiques et peuvent être des cellules présentatrices d'antigène (**Morales et al., 2014**). En l'absence de stimuli, les cellules microgliales sont dans un état "repos", ou inactivées. Avec sa morphologie ramifiée (**Figure 13**), la microglie peut balayer à proximité des régions et leur environnements sans interférer avec les neurones et les activités neuronales et peut surveiller tous le parenchyme cérébral toutes les quelques heures. Quand elle est activée, elles changent leur morphologie sous forme d'un amoeboïde activé et mobiles capable d'atteindre le site de la blessure (**Hanisch and Kettenmann, 2007**). Les microglies peuvent rester pendant une longue période dans le phénotype activé, libérant des cytokines et des agents neurotoxiques qui peuvent aggraver la lésion du SNC (**Liu and Hong, 2003**).

Dans des conditions normales, les cellules microgliales expriment des taux faibles en CD45, récepteurs Fc et le complexe majeur histocompatibilité type II (CMHII). Il a également été démontré que des facteurs neurotrophiques sécrétés par les neurones actifs inhibent l'expression du complexe CMH type II dans les cellules microgliales (**Perry and Teeling, 2013**). D'autres preuves proviennent de la présence des cellules microgliales entourant les plaques amyloïdes. L'exposition des cellules microgliales à l'A $\beta$  cause leur activation menant à une augmentation de l'expression cellulaire du CMH II et à la sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 (IL-1), interleukine-6 (IL-6) et TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$ )) ainsi que de chemokines interleukine-8 (IL-8), MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ ) et MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) (**Rogers and Lue, 2002**). Il a été démontré que, chez les animaux avec les maladies à prions, les cellules microgliales passent d'un phénotype anti-inflammatoire au phénotype pro-inflammatoire agressif, lorsqu'elles sont stimulées par le lipopolysaccharide, en démarrant une réaction inflammation caractérisée par l'augmentation de l'IL-1b, TNF et l'IL-6 et qui entraîne des changements de comportement, la mort neuronale, et une progression plus rapide de la maladie (**Cunningham et al., 2005**). Plusieurs peptides amyloïdes et le peptide d'APP sont des activateurs gliaux puissants, déclenchant une réponse inflammatoire et libération de



cytokines microgliales neurotoxiques (**Barger and Harmon, 1997**). En effet, l'A $\beta$  peut stimuler la voie NF-kB-dépendante, la surface des liaisons des cellules microgliales, la voie d'activation du signal extracellulaire de kinase et la voie de la protéine mitogen activated kinase (MAPK) déclenchant l'expression des gènes pro-inflammatoires (**Akiyama et al., 2000a ; Akiyama et al., 2000b ; Ho et al., 2005**). Les formes fibrillaires solubles d'A $\beta$  semblent induire NADPH oxydase dans les cellules microgliales, entraînant une libération des ERO qui peut contribuer à la neurotoxicité (**Schilling and Eder, 2011**).

### 3.2 Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC et représentent 25% du volume cérébral (**Tower and Young, 1973**). Elles sont caractérisées par la présence de glycogène et d'une protéine, le GFAP (glial fibrillary acid protein). On distingue actuellement deux catégories d'astrocytes qui se montrent par leur morphologie caractéristique : il s'agit des astrocytes de type I, qui sont les astrocytes proprement dites, ayant une morphologie de type neuronal par leurs prolongements fins et irréguliers (**Figure 13**). Les astrocytes de type II sont plus compacts, larges et plats, ayant un cytoplasme plus clair en microscopie électronique. Grâce à leur filopodes, les astrocytes sont en contact avec les vaisseaux sanguins. Les oligodendrocytes et les astrocytes de type II dérivent du même précurseur cellulaire (appelé cellule O-2A) et l'astrocytes de type II peut, au besoin, se différencier en cellule oligodendrocytaire et former de la myéline. Les astrocytes ont de multiples fonctions : l'induction de la formation des synapses neuronales et influencer leur développements (Synaptogenèse), la formation et le maintien de la barrière hémato encéphalique, la neurotransmission, la régulation métabolique; le maintien de l'équilibre ionique, la nutrition des neurones. La fonction de ces derniers est conditionnée par les astrocytes qui sont qualifiées comme des « accompagnons des neurones » depuis la période embryonnaires jusqu'à l'âge adulte. Les astrocytes jouent aussi un rôle autant que composant du modèle "synapse tripartite" de neurotransmission. Dans ce modèle de neurotransmission, la synapse fonctionnelle se compose de trois éléments : les neurones pré- et post synaptiques et les astrocytes environnants. En plus de la communication entre les neurones, il existe une communication bidirectionnelle entre les neurones et les astrocytes, ce qui implique un rôle prédominant des cellules gliales dans la physiologie du système nerveux (**Matyash and Kettenmann, 2009; Chaboub and Deneen, 2013**). Pendant la transmission synaptique, les astrocytes maintiennent l'homéostasie et le renouvellement du glutamate : 20% du glutamate

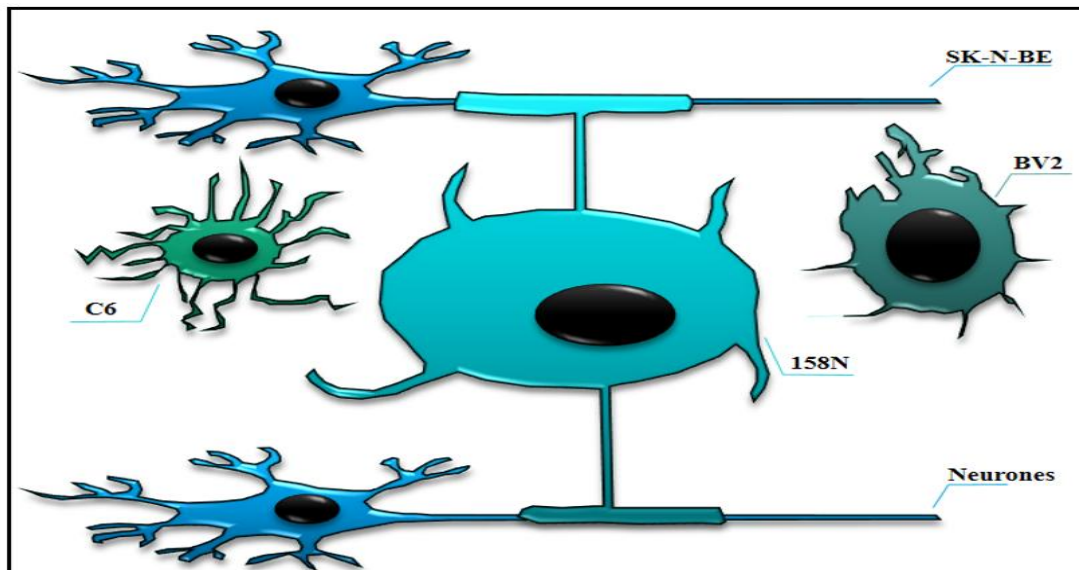
passé dans le neurone, et le reste se dirige vers les astrocytes périssynaptiques. Ainsi le glutamate est éliminé par les astrocytes afin de prévenir l'excitotoxicité (**Verkhratsky and Kirchhoff, 2007**).

Des données morphologiques montrent que les astrocytes sont associées avec quelques plaques A $\beta$ , tandis que l'astrogliose peut également être trouvée dans les zones sans dépôts A $\beta$ . Cela peut résulter du fait que les astrocytes peuvent également répondre à d'autres facteurs pathologiques dans le vieillissement cérébral (**Simpson et al., 2010**). Il a été montré que des fragments A $\beta$  favorisent une réponse inflammatoire marquée dans le cerveau, provoquant la synthèse de différentes cytokines pro-inflammatoires et médiateurs (**Lim et al., 2013**). Les astrocytes forment une barrière entre les neurones et les dépôts amyloïdes. Elles ont la capacité de dégrader l'A $\beta$ . Mais lorsqu'elles sont exposées à des taux élevés d'A $\beta$  pendant une longue période, elles perdent leur capacité à les éliminer. Ils expriment la BACE1 et secrètent des facteurs pro-inflammatoires qui contribuent à l'expression des sécrétases et augmentent la conversion de la protéine APP astrocytaire en peptide A $\beta$  (**Apelt et al., 2003; Rossner et al., 2005 ; Tang, 2009 ; Miners et al., 2010 ; Thal, 2012**). Il a été démontré qu'en présence de la pathologie d'amyloïde l'acide aminé 100 de C-terminal de  $\beta$ APP, qui se trouve dans les plaques séniles, peut induire l'astrogliose et la mort neuronale (**Sastre et al., 2006**). Comme les microglies phagocytent et dégradent l'A $\beta$ , les astrocytes jouent un rôle important dans la dégradation d'A $\beta$  (**Phillips et al., 2014**). Il a été démontré que les astrocytes du cortex entorhinal des patients Alzheimer accumulent l'A $\beta$ 42, et que cette accumulation est en corrélation avec l'extension de la MA (**Nagele et al., 2003**). Le recrutement des astrocytes participe à la neuroinflammation prolongée et l'expression des NiOS (nitrous oxide synthases), contribuant à la toxicité médiée par les ON (Oxide nitrite). Dans la MA, il semble que les cellules microgliales regroupées autour des dépôts amyloïdes sont devenues incapables d'éliminer l'amyloïde (**Rogers et al., 2002**). La quasi-totalité des cytokines, par exemple IL-1b, IL-6, TNF-a, et l'IL-8 sont augmentés chez les patients Alzheimer par rapport aux témoins (**Akiyama et al., 2000 ; Sastre et al., 2006**).

Il a été signalé que l'activation de la microglie et les astrocytes peuvent favoriser le dépôt A $\beta$  : plusieurs études sur des modèles de souris ont montré que le dépôt amyloïde est augmenté dans des conditions inflammatoires (**Guo et al., 2002**). De plus, les cytokines sont capables de réguler l'expression du taux de  $\beta$ -sécrétase, l'ARNm et l'activité de BACE1 (**Sastre et al., 2003**). Cette enzyme joue un rôle clé dans la formation des neurones A $\beta$  (**Sastre et al., 2006**) et dont sa transcription semble également être augmentée par TNF

activated Facteur kappa B (NF- $\kappa$ B), résultant de l'augmentation de la production A $\beta$  (**Chen et al., 2012**).

Les dernières preuves indiquent que la neurodégénérescence est associée à la présence d'une inflammation dans plusieurs maladies neurodégénératives neurologiques. Ceci a été montré par des niveaux accrus de pro-inflammatoire des cytokines, telles que TNF- $\alpha$  ou d'IL-6 trouvés dans le sérum et le tissu cérébral des patients atteints de la MA par rapport aux témoins (**Fillit et al., 1991 ; Strauss et al., 1992**).



**Figure 13:** Différents types cellulaires utilisables pour l'étude de la neurodégénérescence

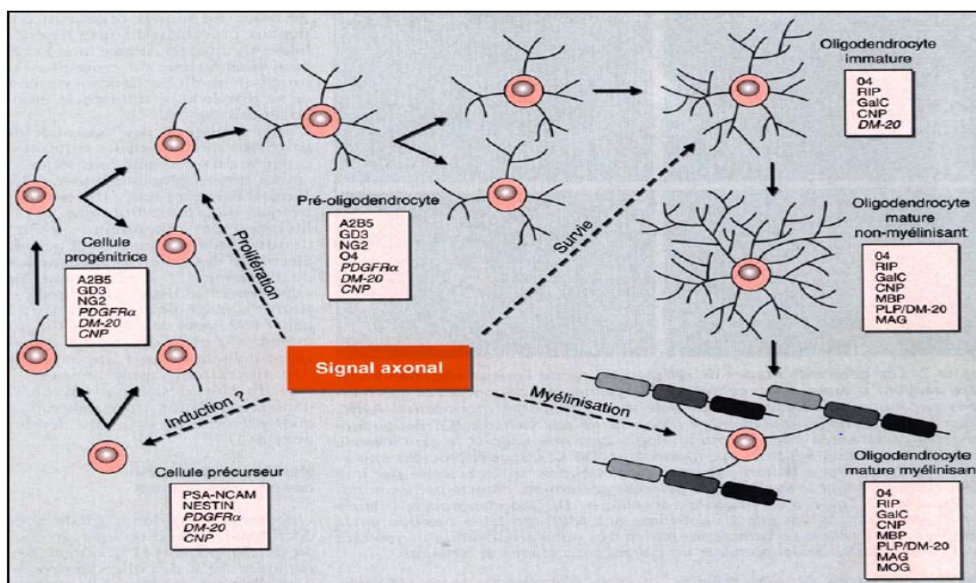
*SK-N-BE* : Cellule neuronale ; *BV2* : Cellule microgliale ; *C6* : Astrocyte ;

*158N* : Oligodendrocyte.

### 3.3 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes (OL), sont des cellules très arborisées (**Figure 13**), localisées le long des trajets axonaux dans le SNC et dérivent des cellules neuroépithéliales du tube neural. Se sont des cellules qui assurent la myélinisation au niveau du SNC et jouent un rôle vital en permettant la transmission rapide de l'influx nerveux et le maintien de l'intégrité axonale (**Chamberlain et al., 2015**). Les OL commencent à se différencier suite à une activation de la voie oligodendrocytaire par des signaux adéquats (**Chamberlain et al., 2015**). Ces cellules dites spécifiées puis déterminées sont appelées précurseurs des oligodendrocytes (OPCs). Ces derniers sont des cellules multipotentes provenant des zones germinales du SNC. Les OL sont les cellules les plus vulnérables du SNC du fait de leur programme complexe de différenciation et de leur métabolisme spécifique très actif (**Baarine et al., 2009**). Les

précurseurs des oligodendrocytes donnent progressivement naissance aux progéniteurs, préoligodendrocytes, oligodendrocytes immatures, oligodendrocytes matures non myélinisants et enfin, aux oligodendrocytes matures myélinisants, capables de produire la myéline (gaine isolante des axones). Ils sont caractérisés par de nombreux changements phénotypiques (évolution de la morphologie cellulaire) et antigéniques (expression séquentielle des marqueurs spécifiques). L'expression différentielle de protéines oligodendrocytaires au cours de la maturation des OL permet de les utiliser comme des marqueurs de différenciation (Baarine *et al.*, 2009) (Figure 14).



**Figure 14:** Représentation schématique des étapes du développement oligodendrocytaire (Baumann and Pham-Dinh, 2001)

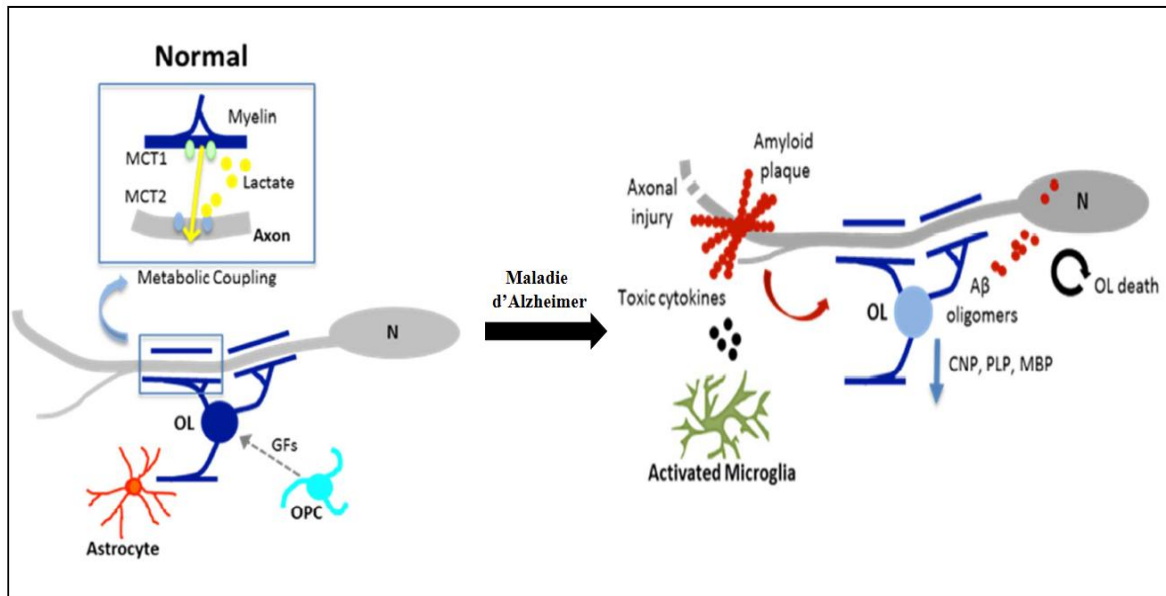
Au cours de la différenciation du lignage oligodendrocytaire, la cellule précurseur devient successivement progénitrice, préoligodendrocyte puis oligodendrocyte immature, cellule postmitotique. Suit la période de maturation avec apparition de l'oligodendrocyte mature non myélinisant puis enfin myélinisant. Chacune de ces étapes se caractérise par des modifications morphologiques et la synthèse de marqueurs indiqués dans les cartouches. Pour certains de ces marqueurs (notés en italique) seul l'ARNm et non la protéine correspondante, a été détecté. Les sites d'action des signaux neuronaux ou axonaux sont indiqués. *PDGFR* : platelet-derived growth factor receptor ; *CNP* : (2'-3')-cyclique-nucléotide phosphodiesterase ; *GalC* ; galactosylcéramide ; *MBP* : protéine basique de la myéline ; *MAG* : glycoprotéine associée à la myéline ; *PLP* : protéolipide protéine ; *MOG* : myelin/oligodendrocyte. protein ; *NCAM* : neural-cell adhesion molecule. *A2B5*, *GD3*, *NG2*, *O4*, *RIP* : anticorps monoclonaux.

La MA a été classée comme étant principalement un trouble neuronal, mais elle affecte non seulement les neurones. Il a été démontré que 50% de tous les cas de la MA montrent une perte des oligodendrocytes et d'autres substances blanches, potentiellement due à l'excitotoxicité du glutamate et le stress oxydatif (**Brun and Englund, 1986 ; Mattson, 2008 ; Higgins et al., 2010**). Cette perte de substance blanche s'accompagne avec l'augmentation des plaques  $\beta$ -amyloïd, ce qui se traduit avec une diminution significative des protéines de la myéline MBP, PLP et CNP, indiquant la dégénérescence de cette substance blanche (**Roher et al., 2002**). Il a été montré que l'A $\beta$  1-42 est toxique pour les cellules d'oligodendrocytes suite à une injection stéréotaxique d'A $\beta$  1-42 en corps calleux, ce qui a entraîné des dommages de la substance blanche et la mort des oligodendrocytes (**Jantaratnotai et al., 2003**). La preuve d'un effet direct de l'A $\beta$  1-42 sur les précurseurs des oligodendrocytes provient des études *in vitro* démontrant l'apoptose des précurseurs d'oligodendrocytes de la souris différenciée et indifférenciée, ainsi que réduit l'expression du NG2 (**Desai et al., 2010 ; Nielsen et al., 2013**). Par ailleurs, ces effets toxiques ne sont pas limités à des fragments d'A $\beta$  -42, il a été rapporté que l'A $\beta$  1-40 (**Xu et al., 2001**) et l'A $\beta$ 25-35 (**Takao et al., 2004**) pourraient être toxiques. Ces études *in vitro* peuvent refléter la perte des cellules d'oligodendrocytes dans le cerveau des patients alzheimer.

L'analyse des cellules d'oligodendrocytes sur modèle de souris avec dépôt de plaque chronique (souris APPPS1) et des échantillons post mortem du cortex humain des patients alzheimer révèle que OPCs réagissent spécifiquement dans ces deux conditions quoique avec des résultats étonnamment distincts : un plus grand nombre de Olig2<sup>+</sup> ont été observés chez les souris APPPS1, alors que Olig2<sup>+</sup> ont diminué en nombre en pathologie humaine de MA (**Behrendt et al., 2013**). Il a été montré que la diminution des niveaux de NG2 solubles, trouvés dans le LCR de patients atteints de MA est corrélée avec des biomarqueurs la MA tels que A $\beta$  1-42, T-tau et P-tau (**Nielsen et al., 2013**) suggère qu'il y a une perte de cellules d'oligodendrocytes dans la MA. Le dysfonctionnement des oligodendrocytes est également une caractéristique du vieillissement du cerveau. Une hypothèse suggère que la MA pourrait potentiellement être liée au développement des oligodendrocytes prolongées en lobe frontal et en régions lobe-temporal médian qui sont les plus vulnérables dans la MA. En effet, la myélinisation tard dans ces régions est en corrélation avec le début de la MA (**Bartzokis, 2004**). La contribution des cellules oligodendrocytes dans la pathologie de MA est moins bien définie.

Il semble probable que la perturbation de la viabilité cellulaire des oligodendrocytes aura un impact sur la santé et la survie des neurones de multiples façons. Il est clair que les gaines de myéline fournissent une protection physique aux axones de projections longues. Plusieurs sources de données indépendantes soutiennent l'idée que les cellules d'oligodendrocytes fournissent un soutien métabolique pour les axons adjacents (**Nave, 2010**).

Les études moléculaires récentes impliquent des changements dans l'expression des oligodendrocytes du MCT1, lactate transporteur en tant que contributeur à la perte neuronale (**Lee et al., 2012**) (**Figure 15**). Les oligodendrocytes sont la principale source cellulaire du fer dans le système nerveux central et expriment des niveaux élevés de ferritine (**Connor et al., 1990 ; Connor et al., 1995**). Les dommages aux oligodendrocytes peuvent alors libérer le fer dans le milieu environnant qui peut être absorbé par macrophages et stimulent leur cytotoxicité. En variante, des taux élevés du fer ont été impliqués dans l'élévation des espèces réactives de l'oxygène et fer intracellulaire est capable de déclencher un nouveau type de mort cellulaire appelée ferroptosis (**Dixon et al., 2012 ; Dixon and Stockwell, 2014**) qui est distinct de l'apoptose ou la nécrose. La stimulation de la mort neuronale par une telle voie pourrait contribuer directement à la neurodégénérescence secondaire de la perte d'oligodendrocytes. Plus précisément dans la MA, le fer libéré par les oligodendrocytes mourrantes peut favoriser la formation d'oligomères et améliore A $\beta$  (**Schubert and Chevion, 1995 ; Huang et al., 2004 ; Liu et al., 2011**).



**Figure 15:** Mécanismes potentiels des interactions oligodendrocytes - neurones

Dans la maladie d'Alzheimer, l'amyloïdes  $A\beta$  dérivés de la protéine précurseur de l'amyloïde par clivage séquentiel de la protéine, sont déposées autour des neurones et forment des plaques amyloïdes, qui contribuent à la pathogenèse de la maladie. Les oligomères  $A\beta$  causent des dommages de la substance blanche, y compris une réduction des protéines de la myéline et la mort des oligodendrocytes. Perte d'oligodendrocytes et de leur myéline laisse les axones et les neurones vulnérables à d'autres stimuli. **OL** : oligodendrocytes ; **OPC** : Cellule précurseur d'oligodendrocytes ; **N** : Neuron ; **MCT1** : Transporteur monocarboxylate 1 ; **MCT2**, Transporteur monocarboxylate 2 ; **ERO** : Espèces réactives de l'oxygène ; **NO** : oxyde nitrique ; **GFS**, Facteurs de croissance.

### 3.1 Les cellules épendymaires

Les cellules épendymaires forment un épithélium spécialisé qui tapisse les cavités ventriculaires et le canal central de la moelle. Contrairement aux autres épithéliums, celui-ci ne repose pas sur une membrane basale mais sur une couche constituée de prolongements astrocytaires. Il s'agit d'un épithélium cilié comportant également des microvillosités.

### III. CONTEXTE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

#### 1. Maladie d'Alzheimer : une démence amnésique

##### *1.1 Définition de la démence*

La démence est définie comme un syndrome généralement chronique ou évolutif. Le syndrome de démence est caractérisé par une détérioration progressive du fonctionnement mental comme la mémoire, l'apprentissage, l'orientation, le langage, la compréhension et le jugement ce qui entrave l'autonomie dans la vie quotidienne du malade. L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a défini la démence comme une « altération progressive de la mémoire et de l'idéation », suffisamment marquée pour handicaper les activités de la vie de tous les jours. Cette altération doit être apparue depuis au moins six mois et être associée à un trouble d'au moins une des fonctions suivantes:

- Les aphasies ou troubles du langage: troubles de l'expression ou de la compréhension du langage acquis, parlé ou écrit.
- La mémoire: altérée, irritable voire dépressive.
- Les praxies: troubles de la réalisation du geste en l'absence de déficit sensitivomoteur, trouble de la coordination, troubles de la compréhension ou de la reconnaissance, et déficit intellectuel important.
- Lesgnosies: troubles de la reconnaissance des objets connus et familiers, troubles d'identification des sons, des stimuli visuels et des objets par la vision ou le toucher.
- Des troubles des fonctions exécutives: par exemple ne plus savoir comment se servir de son téléphone ou comment préparer une recette jusque-là bien connue. Les problèmes d'orientation dans le temps et dans l'espace sont également révélateurs: les personnes qui développent la maladie se perdent sur un trajet habituel ou ne savent plus se situer dans le temps.

Les personnes atteintes de la MA présentent une perte progressive de l'autonomie. La MA est une démence amnésique progressive qui s'associe à des troubles du langage et des troubles praxiques et qui évolue vers un syndrome *aphaso-apraxo-agnosique*.



En France, la Haute Autorité de Santé (HAS – ex Agence Nationale d’Accréditation et d’Evaluation en Santé « ANAES ») définit la MA comme « une affection neurodégénérative du système nerveux central caractérisée par une détérioration durable et progressive des fonctions cognitives et des lésions neuropathologiques spécifiques ». En effet, les démences dégénératives sont classées comme suit en deux types, qui sont la conséquence d’une dégénérescence des cellules nerveuses, et non dégénératives dues à d’autres pathologies (Tableau 7).

**Tableau 7 : Classification des démences (d’après Backchine et Habert 2007)**

Type de Démences	Démences
<i>Démences Dégénératives</i>	Maladie d’Alzheimer
	Démence à corps de Lewy
	Démence frontotemporale
	Maladie de Parkinson
	Maladie de Huntington
	Aphasie primaire progressive
<i>Démences non Dégénératives</i>	Démence vasculaire
	Démence traumatique ou apparentée (traumatisme crânien)
	Démence infectieuse (maladie de Creutzfeldt-Jakob)
	Démence toxique et métabolique (alcoolisme)

### 1.2 Epidémiologie

Le vieillissement est défini par l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1994), comme « un processus graduel et irréversible de modifications des structures et des fonctions de l’organisme, résultant du passage du temps ». Le vieillissement est un phénomène planétaire. Selon l’OMS, la population des 60 ans ou plus est celle qui augmente le plus vite. Cela reflète des conséquences économiques, politiques et sociales importantes et s’accompagne de difficultés particulières auxquelles tous les pays devront faire face. Le vieillissement étant le facteur de risque de la plupart des affections neurodégénératives comme la MA qui est la forme de démence la plus fréquente de la personne âgée. Elle est responsable d’environ 70% des troubles démentiels actuellement diagnostiqués en France.

The World Alzheimer Report de 2015 révèle que pour une population mondiale d’environ 7,35 milliards d’individu en 2015, on estime que 46,8 millions de personnes dans le

monde vivent avec une démence, la grande majorité correspond à la MA. Ce nombre va presque doubler tous les 20 ans, atteignant 74,7 millions en 2030 et 131,5 millions en 2050.

Ces nouvelles estimations sont 12-13% plus élevées que celles publiées dans le World Alzheimer Report 2009. Selon l'Association Marocaine d'Alzheimer, la MA concerne 50.000 personnes; cette prévalence de la maladie au Maroc reste relativement faible en comparaison avec d'autres pays du monde. Par exemple, en France, le nombre de sujets atteints est estimé à environ 800.000 personnes. D'après les projections démographiques qui reflètent bien le vieillissement de la population marocaine dans les années à venir, le nombre des malades va augmenter : près de 75.000 personnes seraient atteintes de la MA d'ici 2020. La prévalence de la pathologie évolue avec l'âge : de 0,5% avant 65 ans, elle est de 2 à 4% après 65 ans et atteint 15% dès 80 ans. Elle est prédominante chez les femmes, avec un ratio [femme/homme] supérieur à 2 (Mielke *et al.*, 2014).

### 1.3 Manifestation Clinique

La MA est une affection dégénérative du système nerveux central entraînant une perte progressive des fonctions cognitives, notamment de la mémoire et des troubles comportementaux. Le malade perd progressivement ses facultés cognitives et son autonomie au fil des années. Il finit par être totalement dépendant. La MA s'aggrave au fil du temps. Les experts ont défini des « stades » afin de décrire l'évolution des capacités d'une personne atteinte de la MA jusqu'à un stade avancé.

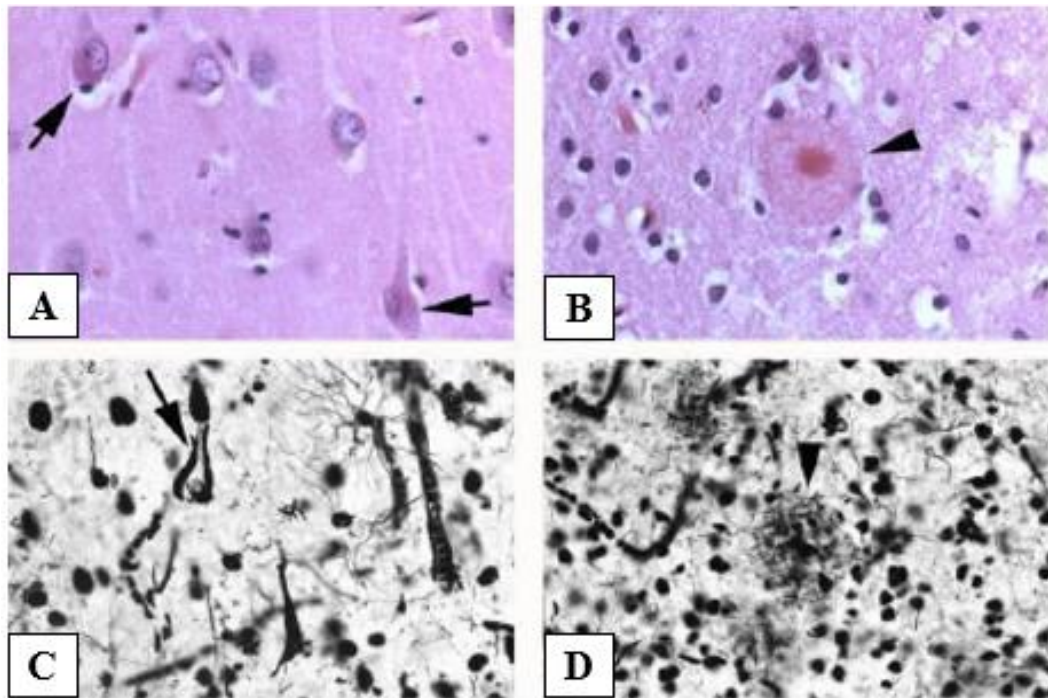
- Phase pré-déméntielle (stade prodromal) : Aucune déficience (fonctions normales). La personne présente des troubles de la mémoire relativement isolée, avec pas ou peu d'atteinte des autres fonctions cognitives et une totale préservation de l'autonomie quotidienne. Cette phase peut s'étendre sur plusieurs années.
- La phase déméntielle, où d'autres sphères cognitives sont touchées. Elle peut se subdiviser en « légère », « modérée » et « sévère », et s'étalant sur 3 à 4 ans, caractérisée par des troubles de la mémoire épisodique liés à une incapacité à retenir des informations récentes. Les faits anciens restent en mémoire jusqu'à un stade avancé de la maladie.
- La phase tardive ou avancée: la démence est alors majeure, le patient va perdre toute capacité à communiquer et devenir mutique, il perd son autonomie, et devient totalement

dépendant vis-à-vis de l'entourage familial, et donc il finit par ne plus reconnaître ses proches, ni ses soignants.

#### *1.4 Physiopathologie*

Deux types de lésions cérébrales sont décrites en histologie pour la première fois par Aloïs Alzheimer : les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques amyloïdes (plaques séniles). Ces deux types de lésions sont observées en microscopie après coloration histologique (**Perl et al., 2000**). Actuellement, il est admis que ces lésions sont les déclencheurs de la MA. La MA a été décrite pour la première fois par Aloïs Alzheimer lors d'un congrès à Munich en 1906. Il décrit un type de démence observé chez une patiente de 51 ans, Augusta Deter, qui présente des troubles neuropsychologiques encore observés à ce jour chez les patients atteints par la MA : une perte progressive de la mémoire et un déclin des capacités cognitives accompagnées de troubles du comportement, d'une perte progressive du langage et d'une désorientation. Aloïs Alzheimer n'avait jamais eu de cas semblable. Il a pratiqué une autopsie sur sa patiente. Il a constaté une grande atrophie de son cerveau, particulièrement au niveau du cortex, une fine couche extérieure de matière grise impliquée dans la mémoire, le langage, le jugement et la pensée en général.

L'étude histopathologique du cerveau lui a permis de décrire deux types de lésions : des enchevêtrements neurofibrillaires à l'intérieur des neurones et des plaques séniles autour des neurones (**Figure 16**). C'est en 1910 que la communauté scientifique décide de nommer cette démence « maladie d'Alzheimer », en référence au neuropsychologue 'Aloïs Alzheimer' l'ayant décrite pour la première fois (**Haustgen and Sinzelle, 2010**).

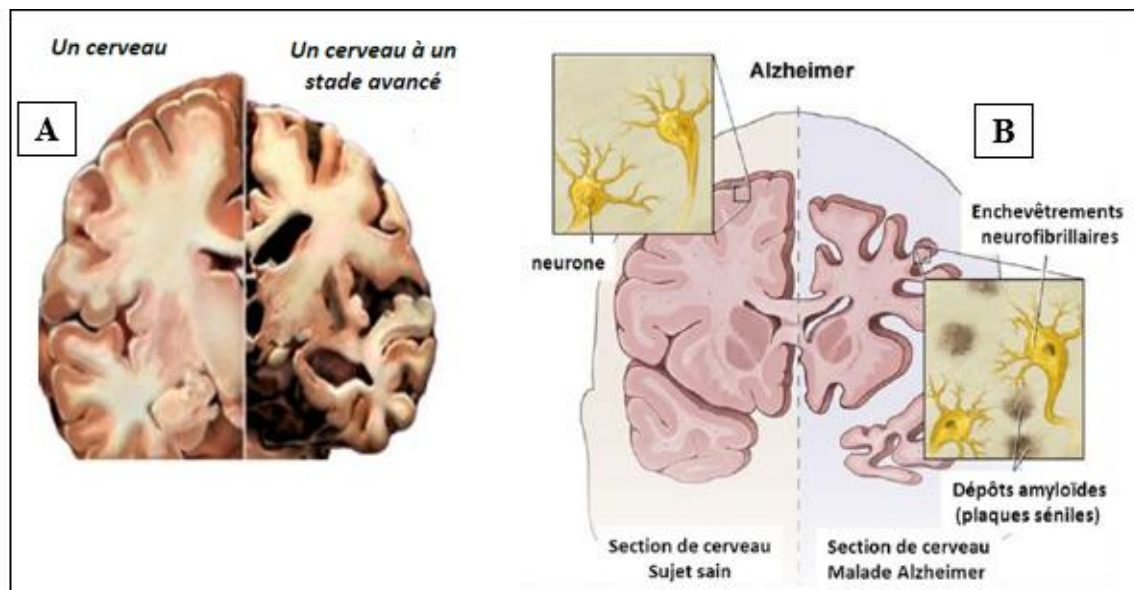


**Figure 16:** *Lésions histologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer mises en évidence par des techniques de colorations d'après Kövari et al. (2011)*

**A, B:** Enchevêtrements neurofibrillaires avec hématoxyline-éosine

**C, D:** Plaques séniles avec imprégnation au nitrate d'argent.

Les phénomènes à l'origine de l'apparition de ces lésions ne sont pas encore connus, et l'influence des DNF et des plaques sur la cascade neurodégénérative est encore à l'étude. Ces lésions sont principalement accumulées dans le cortex (partie superficielle du cerveau) et dans l'hippocampe (**Thompson and Vinters, 2012**). A ces lésions s'ajoute l'atrophie corticale (**Figure 17**).



**Figure 17:** Comparaison de sections de cerveau de sujet sain et de sujet atteint par la maladie d'Alzheimer

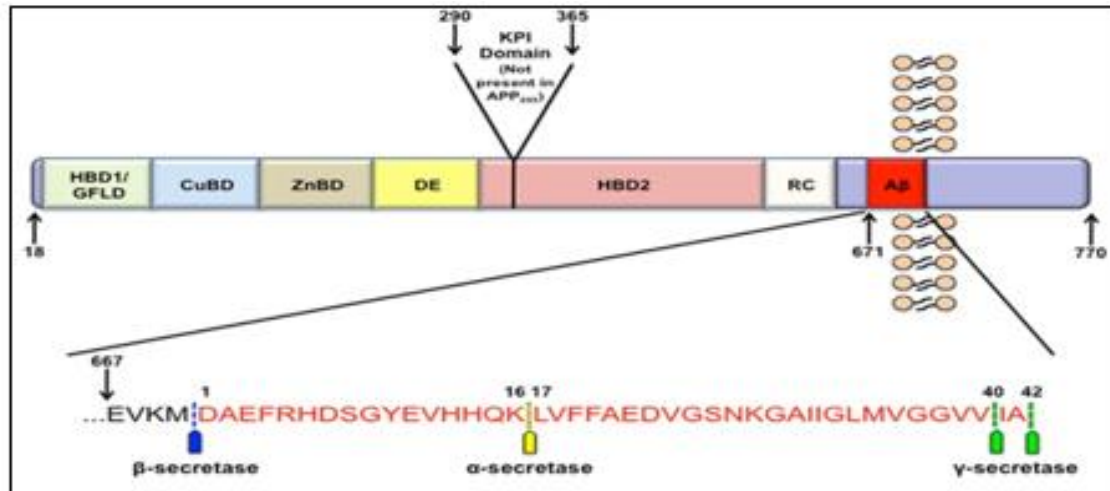
**A:** Coupe transversale de cerveau de sujet sain et de sujet présentant une atrophie corticale, **B:** Modifications histologiques associées à l'atrophie corticale.

### 1.5 Plaques amyloïdes

Ce sont des lésions extraneuronales avec masse sphérique de 50-200  $\mu\text{m}$  de diamètre, plus au moins compactes et de densité variable (Selkoe, 2001). Elles couvrent presque tout le cortex cérébral, se propageant ensuite dans la substance grise corticale, la région hippocampique et le cervelet. Aloïs Alzheimer décrit dans son rapport original d'autopsie en 1907, que les plaques amyloïdes résultent de l'accumulation extracellulaire anormale de peptides amyloïde- $\beta$  ( $A\beta$ ). C'est un fragment peptidique insoluble et toxique, de 4 KDa, sous une forme à 40 ou 42 acides aminés,  $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{42}$ , respectivement. Ces deux peptides sont formés après le clivage protéolytique séquentiel d'une glycoprotéine transmembranaire APP (Amyloid Precursor Protein) (Krishnaswamy *et al.*, 2009) par la  $\beta$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase dans les neurones. L' $A\beta_{42}$  représente la forme la plus hydrophobe qui a tendance à l'agrégation (70 fois plus rapide que  $A\beta_{40}$ ) en raison de son fort taux de fibrillation et d'insolubilité (Serrano-Pozo *et al.*, 2011), alors que l' $A\beta_{40}$  présente une moindre proportion à l'agrégation dans les plaques. A noter que, la couronne de plaques amyloïdes est entourée de prolongements neuronaux dégénérés alors que son centre dispose d'un enchevêtrement de fibrilles.

### a. APP ( Amyloïd Precursor Protein)

Les peptides amyloïdes sont issus du clivage protéolytique de l'APP. L'APP est une glycoprotéine ancrée à la membrane cytoplasmique des neurones et exprimée dans de nombreuses cellules dont le gène est situé sur le chromosome 2 (**Figure 18**).



**Figure 18:** *Structure de l'APP*. L'APP contient de nombreux domaines fonctionnels. Les trois isoformes les plus abondantes de l'APP sont APP<sub>770</sub>, APP<sub>751</sub>, et l'APP<sub>695</sub> essentiellement neuronales. La région N-terminale de ces domaines comprend une liaison à l'héparine et le facteur de croissance (HBD1 / GFLD), un domaine de liaison de cuivre (CuBD), domaine de zinc de liaison (ZnBD), une région acide (DE), inhibiteur de la protéase de type Kunitz domaine (KPI; pas présent dans APP<sub>695</sub>), une seconde héparine de domaine de liaison (HBD2), région aléatoire enroulée (RC), et le domaine bêta-amyloïde (Aβ). Le zoom sur la région Aβ montre les sites de clivage de l'APP par α-, β- et γ-sécrétase (**Lazarov and Demars, 2012**).

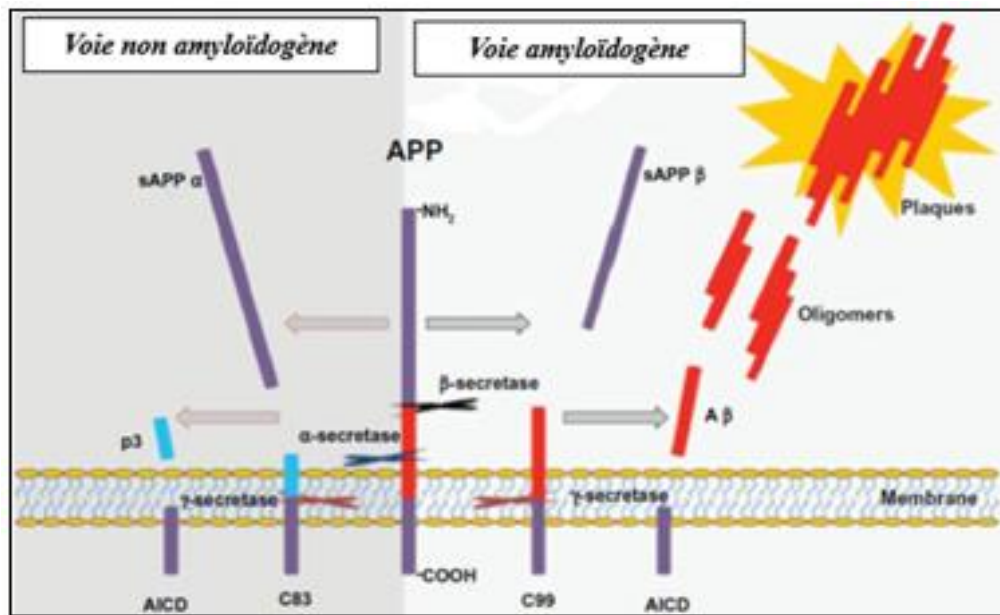
### b. Clivage de l'APP

Le métabolisme de l'APP se fait sous l'action simultanée de trois sécrétases (alpha, bêta, et gamma) selon deux voies (**Figure 19**) (**Françoise et al., 2010**):

- une voie non amyloïdogène, sous l'action de l'α-sécrétase, métalloprotéase qui coupe entre les résidus 687 et 688 (résidus 16 et 17 d'Aβ), libère un gros fragment N-terminal soluble, sAPPα. La partie C-terminale membranaire, C83, est ensuite clivée par la γ-sécrétase pour produire le peptide P3 (ou Aβ 17-40/42) et un fragment cytosolique appelé AICD (APP Intra Cellular Domain).

Le fragment N-terminal soluble, sAPP $\alpha$ , présente des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices (**Lichtenthaler, 2012**) et jouerait un rôle dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (**Ohsawa *et al.*, 1995**). Le clivage par la  $\gamma$ -sécrétase, s'effectue en différents sites et conduit ainsi à une hétérogénéité C-terminale des peptides P3 et A $\beta$ . La  $\gamma$ -sécrétase est un complexe multiprotéique constitué de quatre partenaires: un hétérodimère des présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), la nicastrine, une glycoprotéine de type I (NCT) et deux protéines membranaires, l'anterior pharynx defective 1 (Aph-1) et la presenilin enhancer 2 homolog (Pen-2) (**Krishnaswamy *et al.*, 2009**).

- *une voie amyloïdogène* se fait sous l'action de la  $\beta$ -sécrétase agissant à l'extrémité N-terminale du peptide APP, est une protéase acide aussi nommée  $\beta$ APP cleaving enzyme 1 (BACE1) ou memapsin 2. BACE1 a un homologue, BACE2, mais il n'est présent qu'à faible taux dans le cerveau et de ce fait, contribue peu ou pas à la formation de peptide APP. La  $\beta$ -sécrétase clive ce dernier entre les résidus 671 et 672, ce qui mène à la libération du fragment sAPP $\beta$  et formation du fragment C-terminal C99, cependant la  $\gamma$ -sécrétase s'occupe de l'extrémité C-terminale, produisant l'A $\beta$  qui pourra s'agréger sous forme d'oligomère A $\beta$  puis de fibrilles A $\beta$ . Ces fibrilles formeront alors les dépôts amyloïdes.



**Figure 19: Clivage enzymatique de l'APP.** La voie non-amyloïdogène implique un clivage protéolytique par l' $\alpha$  et la  $\gamma$ -sécrétase aboutissant à la génération de sAPP $\alpha$  et des fragments carboxy-terminaux incluant P3, CTF83 (Cytoplasmic Terminal Fragment 83) et AICD (Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain). La voie amyloïdogène implique le clivage protéolytique par la  $\beta$ -et la  $\gamma$ -sécrétase aboutissant à la libération de sAPP $\beta$  et des fragments carboxy-terminaux incluant l'A $\beta$ , CTF99 (Cytoplasmic Terminal Fragment 99) et l'AICD. Le peptide A $\beta$  pourrait s'oligomériser et former des fibrilles menant à la MA. sAPP $\alpha$  pourrait fonctionner pour promouvoir la neurogenèse et la survie cellulaire, tandis qu'AICD pourrait avoir des effets inhibiteurs de la neurogenèse probablement via la formation d'un complexe avec un facteur de stabilisation Fe65, Tip60 et Med12 jouant un rôle dans la régulation transcriptionnelle (Chen et al., 2013).

### 1.6 Dégénérescence neurofibrillaire

Aloïs Alzheimer a détecté, grâce à la technique argentique, une accumulation anormale du matériel fibrillaire dans les neurones qu'il nomme DNF. C'est la seconde lésion histopathologique caractéristique de la MA. Les DNF sont retrouvés à l'intérieur des neurones. Ils sont constitués de filaments appariés en hélice (PHFs ; Paired Helical



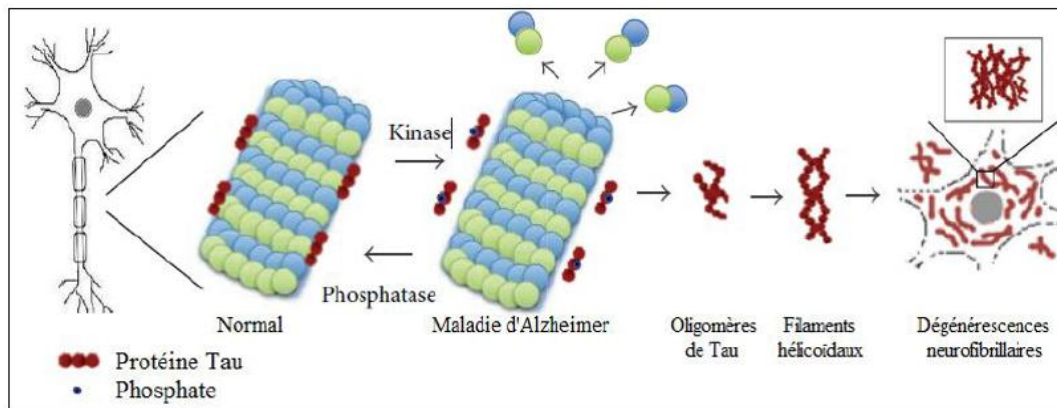
Filaments). Ces PHFs sont composés de filaments de 10 nm de diamètre, disposés en hélice (Kidd, 1963 ; Kidd, 1964), constitués des protéines tau (pour « tubulin associated unit »).

Cette dégénérescence est liée à l'âge et à la vulnérabilité neuronale de certaines régions cérébrales. Elle pourrait dépendre de l'âge du fait qu'elle a été observée chez l'Homme dès l'âge de 50 ans, et de façon systématique dans les régions hippocampiques à partir de 75 ans (Delacourte *et al.*, 1999).

### a. Protéine Tau

La protéine Tau est décrite pour la première fois en 1975 (Cleveland *et al.*, 1977; Cleveland *et al.*, 1977; Weingarten *et al.*, 1975) comme un facteur essentiel à la stabilisation microtubulaire, notamment des neurones du cerveau. Dans le cas de nombreuses maladies appelées Tauopathies, dont la plus connue est la MA, les protéines Tau s'agrègent anormalement et seraient à l'origine de la dégénérescence neuronale. Tau est une protéine cytosolique thermostable qui appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs « microtubule associated protein »). Ces MAPs ont, en microscopie électronique, un aspect de baguette. Elles sont codées par un gène unique localisé sur le bras long du chromosome 17 (Neve *et al.*, 1986) dont il existe 6 isoformes dans le cerveau humain. Chacune de ces isoformes contient 3 ou 4 domaines de fixation aux microtubules. À l'état physiologique, la protéine Tau peut exister sous forme phosphorylée dans les cellules non différenciées où elle est nommée « protéine Tau foetale » et ne s'associe pas aux microtubules. La protéine Tau est sous forme non phosphorylée dans les neurones matures où elle se trouve majoritairement au niveau des axones et en faible quantité dans les dendrites et le corps cellulaire (Swerdlow, 2007 ; Liu and Götz, 2013).

La protéine Tau est physiologiquement phosphorylée au niveau de certains sites : résidus S262, S293, S324 et S356. L'hyperphosphorylation au niveau des résidus S212, S214, S231, S235 et S422 de Tau conduit à une dissociation des microtubules empêchant leur stabilisation et leur fonctionnement (Martin *et al.*, 2011). Ceci induit une accumulation anormale de Tau dans le corps cellulaire et les dendrites, augmente sa capacité à s'assembler en filaments hélicoïdaux appariés et diminue l'affinité de Tau pour les microtubules ce qui a pour conséquence de rompre la structure axonale. Ainsi, l'hyperphosphorylation de Tau et la formation des DNF empêchent l'assemblage et la stabilité des microtubules, ce qui compromet le transport axonal (Figure 20) (Velasco *et al.*, 1998 ; Nisbet *et al.*, 2015).



**Figure 20:** *Stabilité des microtubules, hyperphosphorylation de Tau et dégénérescence neurofibrillaires d'après Mokhtar et al. (Mokhtar et al., 2013)*

Dans les conditions physiologiques, la protéine Tau, non phosphorylée, stabilise les microtubules. Dans la MA, l'hyperphosphorylation de Tau induit une dépolymérisation des microtubules. Les protéines Tau s'assemblent ensuite pour former des oligomères puis des filaments hélicoïdaux à l'origine des dégénérescences neurofibrillaires. Ces dégénérescences neurofibrillaires provoquent la mort neuronale et la libération d'oligomères de la protéine Tau dans l'environnement extracellulaire. Cela active la microglie et propage les dommages neuronaux.

La protéine Tau peut se phosphoryler de façon excessive dans certaines pathologies dont la MA, ce qui serait dû à une augmentation d'activité kinase, une diminution d'activité phosphatase, ou une combinaison des deux (Neve *et al.*, 1986 ; Gong *et al.*, 2000). Parmi les kinases figurent: les MAP (Mitogen Activated Protein) kinases, les Tau tubuline kinases, les kinases dépendantes des cyclines telles que Cdc2 et Cdk5, les MARK (Microtubule Affinity Regulating Kinase), la CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin Dependent Protein Kinase II), la PKA (cyclic-AMP-dependent kinase), la GSK-3β, les caséines kinases I et II ainsi que les SAPK/JNK (Stress Activated Protein Kinases) (Johnson and Stoothoff, 2004 ; Balaraman *et al.*, 2006).

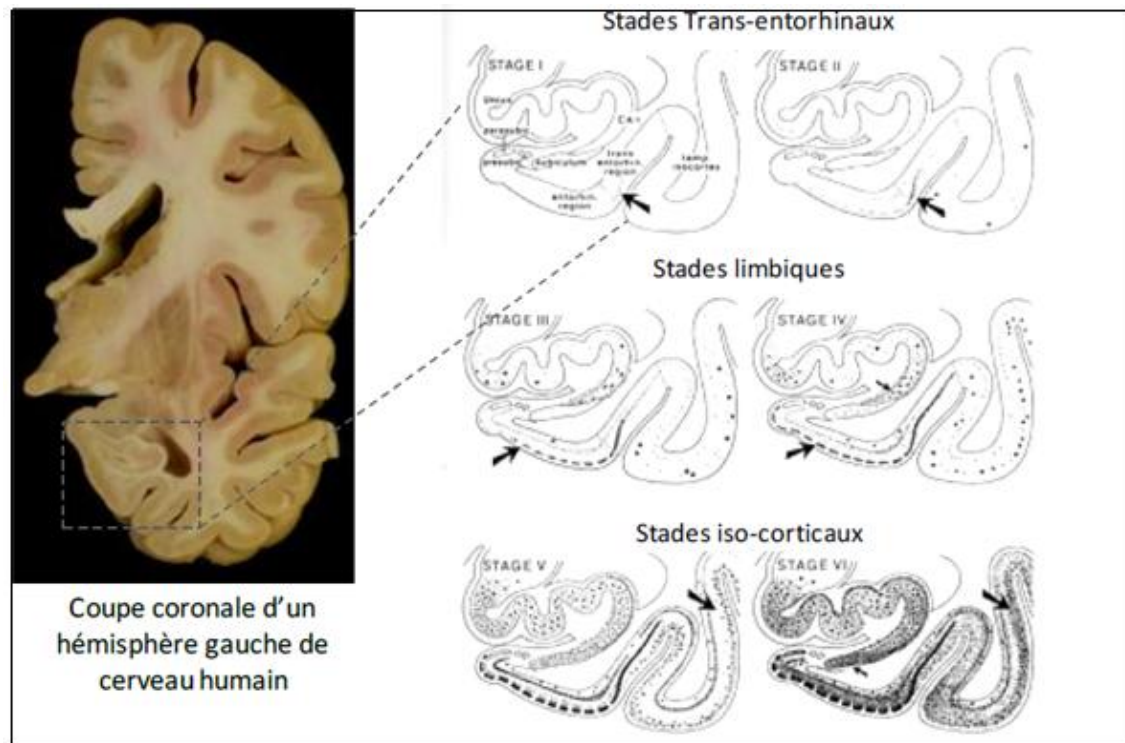
L'état de phosphorylation de Tau est également régulé par différentes phosphatases. Plusieurs protéines sont responsables de l'activité de la phosphatase telles; la protéine phosphatase PP2A est responsable de plus de 70 % de l'activité phosphatase liée à Tau dans le cerveau humain. Cette protéine intervient dans la régulation de la phosphorylation de Tau.

Un taux de méthylation de PP2A faible, conduit à une hyperphosphorylation de Tau (Sontag *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008). Liu *et al.* a montré que d'autres phosphatases comme PP1, PP5 et PP2B sont impliquées mais à un niveau moins important (Liu *et al.*, 2005).

#### **b. Localisation des lésions cérébrales**

Les DNF apparaissent dans les phases précoces de la MA au niveau du cortex entorhinal puis s'étendent au système limbique et à l'hippocampe pour atteindre finalement le néocortex dans les phases tardives de la pathologie. Les travaux histologiques de Braak et Braak ont pu, dans un premier temps, subdiviser la progression de cette DNF en 6 stades (Braak and Braak, 1991) (Figure 21).

- *Stade I et II « trans-entorhinaux »* : Ces stades de la pathologie sont retrouvés dans les formes de la maladie les plus modérées et correspondent respectivement à l'envahissement progressif et à l'atteinte du cortex transentorhinal par la DNF.
- *Stade III et IV* : Ces stades représentent les stades dits « limbiques » de la pathologie et voient la DNF envahir le territoire hippocampique. L'isocortex est encore intact à ce stade.
- *Stade V et VI « isocorticaux »* : Ces stades correspondent à l'atteinte progressive des territoires de l'isocortex allant des aires associatives isocorticales, passant par les aires sensorielles primaires pour finir dans les aires corticales primaires.



**Figure 21:** *Progression de la dégénérescence neurofibrillaire au cours de la Maladie d'Alzheimer*

*Progression en 6 stades histologiques de la DNF indiquée par les flèches en noir selon la localization de Braak, (Braak and Braak, 1991).*

### 1.7 Les facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

Les facteurs responsables de la MA restent encore largement énigmatiques malgré la progression de la connaissance sur la physiopathologie de la maladie. Tous les auteurs s'accordent à dire que la MA a des causes multifactorielles (Goate, 1997; Ling *et al.*, 2003). L'âge et par conséquent, le vieillissement est le facteur de risque principal de la MA (Ling *et al.*, 2003). Comme dans toute maladie chronique, il existe également une susceptibilité individuelle, qui crée un terrain plus ou moins favorable à l'apparition de la maladie en fonction du vieillissement et des autres facteurs de risque environnementaux. Le sexe est présenté comme un facteur de risque de la MA avec une prévalence plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Mielke *et al.*, 2014). Cette différence en fonction du sexe pourrait s'expliquer par les différences génétiques et hormonales (notamment liée à la baisse du niveau d'oestrogènes avec l'âge chez la femme).

### a. Facteurs génétiques

Dans la forme familiale de la MA sont en cause des mutations ponctuelles de gènes, mutations qui sont toujours pathogènes et dont le mode de transmission est autosomique dominant. Il s'agit des chromosomes 21 (porteur du gène de l'APP), 14 (PS1) et (PS2) (**Selkoe et al., 2001**). Dans les formes dites sporadiques de la maladie le facteur de risque génétique le plus connu, et établi depuis plus de 10 ans, est associé au gène de l'apolipoprotéine E (apoE) qui est une protéine associée au transport des lipides. Dans le système nerveux périphérique, elle intervient dans la mobilisation et la redistribution des lipides lors des phénomènes de croissance et de réparation des cellules nerveuses. Le gène de l'apoE se situe sur le chromosome 19 et il existe trois isoformes fréquentes (apoE2, apoE3 et apoE4), caractérisées par la présence d'une arginine ou d'une cystéine en position 112 et 158. Chacune de ces isoformes est codée par un allèle différent du gène apoE (E2, E3 et E4). La présence d'un ou deux allèles E4 de l'apoE est un facteur de risque de survenue de MA et ce risque est multiplié par 5 ou plus lorsque l'individu porte 2 copies de l'allèle apoE4. D'autres gènes sont impliqués dans la MA comme SORL1 (Sortilin-Related Receptor), CLU, PICALM, et ABCA7. Ces gènes mis en évidence concernent trois voies impliquées dans la MA : la réponse immunitaire, le métabolisme lipidique et l'endocytose (**Reitz and Mayeux, 2014**). Un gène du chromosome 12 codant pour l' $\alpha$ 2-macroglobuline est aussi impliqué dans la dégradation de l'A $\beta$  (**Selkoe et al., 2001**).

### b. Facteurs environnementaux

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

### 1.8 Modèle d'étude de la maladie d'Alzheimer

#### a. Modèles in vitro

Différentes lignées cellulaires sont sélectionnées pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la MA. Il s'agit de neuroblastomes humains : les cellules SH-SY-5Y, SK-N-BE, SKNSH-SY5Y qui dérivent de la lignée SKNSH, les cellules IMR-32 (Neil *et al.*, 1994) et les cellules Neuro 2A. Des cultures primaires de cellules neuronales du cortex et de l'hippocampe de souris et de rat peuvent aussi être utilisées (Priller *et al.*, 2006).

Au cours de ces dernières années à New-York, l'équipe "New York Stem Cell Foundation for Alzheimer's Disease Research" a développé une culture de cellules souches (*3-D stem cells*) en prélevant le sang et/ou en reprogrammant les cellules de la peau de patients Alzheimer pour donner des cellules souches pluripotentes capables de devenir des neurones ou d'autres cellules cérébrales (Nestor *et al.*, 2013).

#### b. Modèles in vivo

Les modèles animaux ont pour objectif d'étudier les maladies humaines pour comprendre leurs mécanismes et trouver des thérapies contre ces maladies. Dans le cas des maladies neurodégénératives, ces modèles peuvent être utilisés pour explorer des mécanismes physiopathogéniques associés aux maladies du cerveau liés à l'âge et pour tester des nouvelles thérapies.

### 1. Modèles animaux naturels

Dans le cas de la MA, différentes espèces sont capables de développer de manière spontanée des plaques amyloïdes, protéine Tau anormalement phosphorylée, perte neuronale. Parmi ces modèles spontanés figurent :

- Le modèle canin (chien)

Avec l'âge, certains chiens développent une forme de maladie neuro-dégénérative appelée syndrome de dysfonctionnement cognitif canin, ou syndrome du vieux chien comportant quelques similitudes avec la MA chez l'Homme. Ce modèle produit une forme d'A $\beta$ 1-42 identique à la forme humaine et présente les mêmes signes neuropathologiques tels que la perte neuronale, la perte de la neurogénèse, l'atrophie corticale et les dommages oxydatifs (Sarasa and Pesini, 2009 ; Dowling and Head, 2012).

- Le modèle singe

Ce modèle présente une similitude avec l'homme au niveau de la séquence d'acides aminés constituant le peptide amyloïde. Il diffère de l'homme en position 18 et 25. L'injection intracérébrale d'A $\beta$  sous forme fibrillaire chez le singe se traduit par une importante perte neuronale, une hyperphosphorylation de la protéine Tau et une prolifération microgliale (**Geula, 1998**). Le singe âgé a pu être utilisé pour démontrer la réduction de dépôts diffus de peptide A $\beta$  cérébraux par immunothérapie anti- A $\beta$ .

- Le modèle microcèbe (lémurien *Microcebus murinus*)

C'est un primate originaire de Madagascar, d'une durée de vie d'une dizaine d'années. Il constitue un modèle intéressant de MA et de vieillissement. Il développe des dépôts du peptide A $\beta$  et des accumulations de la protéine Tau hyperphosphorylée et la perte des neurones cholinergiques.

- Le modèle chat

Le chat vieillissant présente des troubles du comportement à savoir troubles de mémoire, désorientation, perte de propreté, troubles de marche et chutes.... D'une manière générale, toutes les fonctions cognitives semblent affectées, peu ou prou. Ces signes correspondent à des modifications neuropathologiques que l'on trouve chez les personnes atteintes de la MA. Il s'agit plus particulièrement de dépôts de plaques bêta-amyloïdes et d'une atrophie cérébrale.

- Le modèle lapin

Chez le lapin, les phénotypes précités sont accélérés par une alimentation riche en cholestérol, qui en quelques mois, conduit à une immunoréactivité A $\beta$  intraneuronale dans l'hippocampe, une perte neuronale associée à une accumulation de protéine tau intraneuronale et à des déficits fonctionnels.

Les modèles spontanés présentent au moins 3 inconvénients (**Pradier and Duyckaerts, 2015**):

- ❖ Le développement de la pathologie est généralement tardif et intéresse seulement une proportion limitée de la population qui ne peut pas être pré-identifiée.

- ❖ Il s'agit, pour l'essentiel, de dépôts de peptide A $\beta$  souvent diffus ; la pathologie neurofibrillaire spontanée étant inexistante ou modérée, en tout cas différente de celle qui est constatée chez l'homme.
- ❖ La recherche du mécanisme de la pathologie se heurte en pratique aux mêmes difficultés que chez l'homme parce qu'il est encore mal compris et que ses étapes sont difficiles à contrôler.

## 2. Modèles artificiels

- Modèles murins transgéniques de la maladie d'Alzheimer

Le principe de souris transgéniques consiste à introduire un gène humain muté ou à l'inactiver chez un animal de laboratoire afin de moduler l'expression des protéines responsables de la maladie. Ces souris expriment la protéine APP humaine qui donnent des protéines amyloïdes aboutissant à des dépôts diffus et à la formation de plaques séniles.

Le modèle PDAPP exprime la protéine APP humaine avec la mutation indienne V717F induite par le promoteur Platelet-Derived Growth Factor  $\beta$ .

Les modèles Tg2576 et APP23 expriment la protéine humaine APP avec la mutation suédoise K670N/M671L sous le contrôle du promoteur du gène prion du hamster pour le modèle Tg2576 et celui du promoteur du gène murin Thy1 pour le modèle APP23 (**Games *et al.*, 1995 ; Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997**).

Ces souris se caractérisent par la présence de plaques bêta amyloïdes, une atrophie de l'hippocampe, une perte des fonctions cognitives, une perturbation de comportement, un dysfonctionnement des synapses, une modification de la forme et de la fonction des cellules gliales (astrocytose et microgliose). Toutefois, même si des formes hyperphosphorylées de Tau sont détectées, aucune dégénérescence neurofibrillaire n'est observée et la perte neuronale est faible.

Les souris transgéniques PSEN1 et PSEN2 présentent une augmentation du ratio A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub>, elles ne développent pas de plaques amyloïdes, ni de DNF. Ces souris ont été utilisées pour développer un modèle croisé APP/PSEN dont le ratio A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> élevé et développe des dépôts amyloïdes plus précocement que les souris Tg2576 5 (**Holcomb *et al.*, 1998 ; Mc Gowan *et al.*, 2006 ; Van Dam and De Deyn, 2011**).



Un croisement entre les souris avec mutation APP et les souris avec mutation Tau augmente les dépôts amyloïdes et induit une apparition de DNF et une perte neuronale que l'on ne retrouve pas chez les souris APP.

Le modèle 3xTg-AD combinant trois mutations : la mutation de la protéine APP, la mutation de la protéine Tau, et la mutation de PSEN1 développe les plaques amyloïdes avant les DNF. Ce modèle se caractérise par une perte neuronale accompagnée d'une réaction inflammatoire et atteinte des synapses (**Van Dam and De Deyn, 2011**).

Un rôle important de l'apolipoprotéine E dans la formation des dépôts amyloïdes *in vivo* a été démontré chez les souris déficientes en ApoE croisées avec une lignée transgénique APP qui présente une forte réduction des dépôts agrégés sans altérations des dépôts diffus (**Bales et al., 1997**)

### ***1.9 Traitements de la maladie d'Alzheimer***

Il faut bien l'admettre, nous sommes impuissants face au temps qui passe, c'est le vieillissement. Il faut donc être attentif à notre alimentation et à notre mode de vie. Se nourrir de façon équilibrée et diversifiée a un impact très net sur la santé et sur la capacité à résister à l'âge.

Une étude épidémiologique traitant l'importance de la nutrition dans le développement des maladies neurodégénératives montre qu'un régime méditerranéen riche en huile d'olive et en poissons gras (régime riche en AGMI et AGPI) conduit à un faible risque de développer des perturbations cognitives qui sont liées au vieillissement (**Scarmeas et al., 2006**). La neuroprotection par les antioxydants a donc suscité beaucoup d'intérêt. La majorité des recherches sur le rôle des antioxydants alimentaires dans la fonction neurologique et dans certaines maladies neurodégénératives. Les relations sociales, les activités sportives ou intellectuelles peuvent jouer un rôle pour limiter l'état dépressif qui constitue un facteur de risque important pour les pathologies neurodégénératives et préserver les fonctions cognitives.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif de la MA. Par ailleurs, l'effet des médicaments disponibles n'est que modeste. Associés à la prise en charge globale du malade (accompagnant, environnement, ...), l'effet des médicaments montre une influence sur le déclin cognitif, la perte d'autonomie et les troubles comportementaux. Les premières molécules utilisées dans le traitement de la MA sont les inhibiteurs de cholinestérase qui

permettent d'augmenter les capacités cognitives et modèrent les troubles comportementaux (**Guillemaud et al., 2013**).

La tacrine, le donepezil, la galantamine et la rivastigmine, inhibent les cholinérasés du système nerveux et augmentent la concentration d'acétylcholine au niveau des synapses. Le déficit en acétylcholine tient un rôle central dans les symptômes cognitifs, fonctionnels et comportementaux. Un autre traitement comme la mémantine qui est un agoniste du récepteur du glutamate, de type NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique). Ce médicament agit sur l'excitotoxicité du glutamate en réduisant l'influx calcique responsable de la mort neuronale et des atteintes de la plasticité synaptique et donc améliore la performance et la fonction cognitive des patients atteints de MA. La combinaison des deux traitements, la mémantine avec les inhibiteurs d'acétylcholinestérase, permet d'améliorer leurs effets bénéfiques.

## 2. Aluminium et maladie d'Alzheimer

### 2.1 Les métaux

Les métaux sont nécessaires pour le développement et la maintenance des activités enzymatiques, l'apprentissage et la mémoire, la fonction mitochondriale, la myélinisation, ainsi que la neurotransmission (**Parakach et al., 2016**). Les cellules jouent un rôle important pour le contrôle de l'homéostasie des ions métalliques. Cependant, les perturbations de ces mécanismes, ou l'absorption de métaux nocifs sans fonction biologique connue, modifient l'équilibre ionique et peut conduire à certaines maladies, y compris plusieurs troubles du SNC tels que la maladie de Parkinson, la MA et l'atrophie ... (**Roberts et al., 2012**).

La neurotoxicité des métaux est bien connue depuis le siècle dernier. Les métaux ont un rôle essentiel dans le métabolisme normal des neurones. Les éléments de traces comme le cuivre (Cu), aluminium (Al), le fer (Fe) le manganèse (Mn) et le zinc (Zn) peuvent à la fois perturber le processus métabolique dans le cerveau, et être impliqués dans la neurotoxicité (**Parakach et al., 2016**). D'autres éléments tels que le cadmium (Cd), l'arsenic (As) et le plomb (Pb) sont bien connus d'avoir un rôle métabolique et capables d'induire une toxicité. Il a bien été rapporté que les métaux ont un rôle important dans la pathogenèse de la MA (**Jomova et al., 2010**). Il y a eu une relation directe entre l'accumulation excessive de métal et les effets nuisibles sur les neurones. L'altération de l'homéostasie des métaux tels que Cu, Fe, Zn et Al, peut être impliquée dans l'agrégation d'A $\beta$ , de la protéine amyloïde précurseur et de la protéine tau, induisant ainsi la MA (**Breydo and Uversky, 2011**).

## 2.2 L'aluminium dans l'environnement

Les effets de l'aluminium sur l'environnement ont attiré beaucoup d'attention, principalement à cause des problèmes de la santé publique. Les apports d'aluminium proviennent principalement de l'environnement, les produits alimentaires, et les eaux. L'Al, est le troisième élément le plus abondant (après l'oxygène et le silicium) de la croûte terrestre, dont il représente 8% (**Exley *et al.*, 2006 ; Priest, 1993**). Il est donc omniprésent dans l'environnement, sa présence est toujours exogène. On ne le trouve jamais, dans la nature sous forme métallique, mais toujours combiné avec d'autres éléments, notamment avec l'oxygène (**Buclez, 1997**) sous forme d'oxyde d'aluminium anhydre ou hydraté, ou de microcristaux d'aluminosilicates. La concentration de l'Al dans l'océan est faible, elle est au-dessous de  $1\mu\text{g d'Al/L}$ , ce faible taux pourrait conduire à l'accumulation de l'Al et le silicate par les diatomées. L'Al est présent dans l'environnement sous une forme fortement concentrée dans les poussières que produisent les exploitations minières et agricoles, ainsi que dans les particules produites par la combustion du charbon et émises lors des éruptions volcaniques. Les concentrations de l'aluminium de l'air sont très variables, allant de  $0,5\text{ ng/m}^3$  en antarctique à  $1000\text{ ng/m}^3$  dans des secteurs industrialisés.

Dans les eaux de surface ou les eaux de source, et avant tout traitement de ces eaux, l'Al est présent sous forme de micropoussières d'argiles insolubles en suspension. Sa concentration varie significativement en fonction de plusieurs facteurs physico-chimiques, minéralogiques et environnementaux (**Who, 1997**). Ces particules donnent à l'eau un aspect turbide et peu agréable pour la consommation d'où l'utilisation des sels d'aluminium solubles comme agents clarifiants tels que l'alun (sulfate d'aluminium) et le chlorure de polyaluminium (**Scott, 2003**). Ces composés se caractérisent par leur capacité à éliminer les microorganismes nocifs de l'eau et ils la débarrassent aussi des matières organiques qui y sont naturellement présentes, ce qui donne une eau limpide potable avec aspect plus acceptable contenant ainsi de l'aluminium soluble. Ce dernier est toléré à 5 %, autant qu'Al ingéré par l'être humain selon les estimations de l'American Waste Water Association (AWWA). Cependant, si ces sels d'aluminium sont mal utilisés, ils peuvent conduire à des fortes concentrations d'aluminium résiduel dans l'eau potable ce qui augmente les dégâts chez l'Homme (**Jansson, 2001**).

Les plus fortes concentrations en aluminium se retrouvent dans les eaux de drainage des régions soumises aux pluies acides, où l'acidité des roches facilite la mobilisation de

l'aluminium à partir du sol. L'acidité entraîne une dissolution et un transport des sels d'aluminium en solution, qui sont alors absorbés par les végétaux et les animaux (**Gourier-Fréry and Fréry, 2004**). La concentration en aluminium est plus élevée dans les lacs acidifiés ( $\text{pH} < 6$ ) où des quantités micromolaires peuvent se rencontrer (**Jorgensen et al., 1984**), ce qui cause des dégâts chez les poissons qui ne tolèrent que des niveaux d'Al de l'ordre du nanomole. Des concentrations élevées en aluminium ont aussi des conséquences néfastes sur les oiseaux et les animaux qui mangent ces poissons. Les conséquences pour les oiseaux sont défauts dans la formation du squelette et la reproduction de certains oiseaux marins (**Nyholm, 1981**).

Les apports alimentaires en aluminium ont trois origines : l'aluminium contenu naturellement dans les aliments, les additifs alimentaires (utilisation de l'aluminium et de ses sels : sulfates, phosphates, silicates comme colorants, antiagglomérant, affermissant, épaississant, stabilisant ou correcteur d'acidité) et les matériaux au contact des denrées alimentaires. Du fait de la distribution environnementale ubiquitaire de l'aluminium, tous les aliments d'origine végétale ou animale contiennent de l'aluminium. Le plus souvent, les teneurs rencontrées se situent dans la gamme de 1 à 10 mg/kg de matière humide brute. Les feuilles de thé noir sont particulièrement riches en aluminium ( $892 \pm 292$  mg/kg de matière sèche), mais les concentrations mesurées dans l'infusion restent inférieures à 4,5 mg/L. Les différentes enquêtes de consommations internationales montrent que l'apport en aluminium lié aux denrées alimentaires se situe majoritairement entre 5 et 12 mg/jours, soit en moyenne 8,5 milligrammes par jour pour un adulte. La plupart des aliments contiennent naturellement moins de 0,5 mg/100 g d'aluminium.

L'usage de l'aluminium et de ses sels en tant qu'additifs alimentaires est réglementé au niveau européen par les directives 94/35/CE, 94/36/CE et 95/2/CE, transposées en droit français par l'arrêté du 2 octobre 1997 relatif aux additifs pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. Il s'agit des colorants :

- E173 sels d'aluminium donnant une coloration bleutée à l'eau.

Ou encore des Anti-Coagulants :

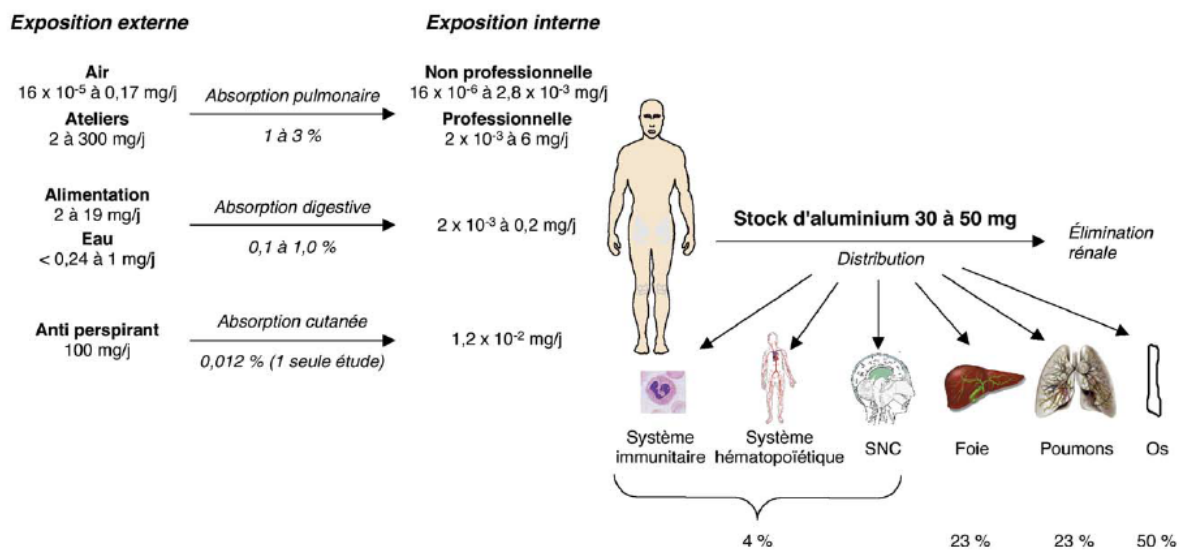
- E520, E521, E522, E523 : famille des sulfates d'aluminium utilisés dans les blancs d'oeufs des préparations culinaires, fruits et légumes confits.
- E541 (génoiseries),

- E554, E555, E556, E559 : Phosphates et Silicates d'Aluminium utilisés dans les denrées séchées en poudre : potage, purée, le sel raffiné, les fromages industriels et les laits.

Il n'est pas à exclure qu'une consommation accrue de ces produits industriels pourrait conduire fortement à une augmentation du taux d'aluminium dans le sang (Jansson, 2001). La principale voie d'exposition à l'aluminium pour la population générale est celle de l'alimentation. En plus de sa concentration à des taux variables dans les denrées alimentaires, vient s'ajouter la contamination des aliments par contacts. En effet, l'aluminium peut s'introduire dans la nourriture à partir de casseroles, des ustensiles de cuisine ou des emballages et le risque de contamination serait encore plus évident en présence d'acides ou de sel qui augmenteraient la concentration de l'aluminium dans les aliments.

### 2.3 Absorption de l'Aluminium

L'aluminium, quelle que soit sa forme et quelle que soit la voie de contact, est très faiblement absorbé. Plus de 95 % de l'aluminium reçu est immédiatement éliminé (Figure 22).



**Figure 22:** Absorption quotidienne et distribution de l'aluminium dans l'organisme humain (Gourier-Fréry andFréry, 2004)

L'aluminium peut pénétrer dans l'organisme par plusieurs voies : voie respiratoire, digestive, ou encore par voie cutanée.

### a. Voie respiratoire

La voie respiratoire est systématiquement décrite comme une voie mineure d'exposition à l'aluminium chez les sujets non exposés professionnellement. Néanmoins, en situation normale, les poumons reçoivent en continu de l'aluminium, majoritairement sous forme de particules, de silicates et autres composés faiblement solubles. C'est le tissu pulmonaire qui, parmi tous les organes, présente les concentrations en aluminium les plus élevées (**Gourier- Fréry et al., 2003**). Celles-ci augmentent avec l'âge (**Teraoka, 1981**). Une partie des particules contenant de l'aluminium qui se déposent au niveau du tractus respiratoire est repoussée par action mucociliaire. Ces particules sont alors mélangées à la salive, dégluties, et rejoignent alors le tractus digestif. Une partie de l'aluminium inhalé est donc absorbée par voie digestive. Il a été suggéré qu'une partie de l'aluminium inhalé pouvait également être absorbée à travers le système olfactif et atteindre par transport axonal le cerveau (**Roberts, 1986 ; Exley et al., 1996**).

La quantité d'aluminium qui se dépose dans les poumons est en fonction de la durée et du niveau d'exposition, du volume d'air inhalé, de la taille des particules. Selon **Van Oostdam et al.** (**Van Oostdam et al., 1990**), la fraction des particules d'aluminium effectivement retenue dans les poumons serait de 35 % de la quantité totale inhalée. L'étude de **Priest (Priest, 1998)** réalisée en utilisant l'oxyde d'aluminium marqué tend à montrer que 45 % environ de la fraction inhalée qui s'est déposée est éliminée rapidement par des mécanismes de clairance dans la première journée qui suit l'inhalation. La plus grande partie de l'oxyde d'aluminium restant est éliminée par des mécanismes similaires mais plus lents, avec une demi-vie de rétention totale de 72 jours. Une petite fraction, environ 4,5 % du dépôt dans le poumon, serait dissoute et pénétrerait le flux sanguin. La revue de **Nayak (Nayak, 2002)** cite une fraction d'aluminium absorbée à partir des poumons de 3 %. Cependant, on ne retrouve pas dans la littérature de valeur consensuelle sur la fraction déposée dans le poumon et celle qui est finalement absorbée par l'organisme.

### b. Voie cutanée

Peu d'études sur l'absorption cutanée ont été réalisées. L'aluminium semble traverser la couche cornée superficielle mais son absorption serait arrêtée au niveau de l'épiderme. Il a été récemment montré que l'application cutanée du chlorure d'aluminium aqueux (0,025 - 0,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) sur le dos des souris suisses rasées pendant environ deux mois augmentait de

façon très importante la quantité d'aluminium dans le cerveau, l'urine et le sérum (**Anane et al., 1995 ; Gardner et al., 2000**). De même, l'application du chlorure d'aluminium aux souris suisses enceintes a conduit à une augmentation de la concentration d'aluminium dans les organes des fœtus et dans le fluide amniotique. Cela nous laisse à dire qu'il y a eu un passage de l'aluminium à travers la barrière placentaire (**Anane et al., 1997 ; Gardner et al., 2000**). Il a été démontré qu'une absorption cutanée d'aluminium après une application unique de 84 mg de chlorhydrate d'aluminium (ACH : complexe d'aluminium hydrosoluble utilisé comme principe actif dans de nombreux antiperspirants) sous les aisselles a montré que l'aluminium a été absorbé et éliminé dès le premier jour suivant l'application et durant au moins 44 jours. La fraction absorbée, estimée à partir des concentrations urinaires, était de 0,012 % de la dose d'aluminium appliquée.

### c. Voie digestive

L'aluminium pénètre dans le tube digestif isolément (poussière) ou avec l'eau et les aliments. L'absorption digestive de l'aluminium est faible chez le sujet sain et elle est influencée par la présence d'aliments dans le tractus digestif : inférieure à 1 % chez le sujet à jeûn, elle est d'environ 0,5 % lorsque le sel d'aluminium est administré peu de temps après une prise alimentaire (**Gourier-Fréry et al., 2003**). Cela indique que l'aluminium est absorbé passivement par l'appareil gastro-intestinal. Si, par exemple, 2 à 3 mg d'aluminium sont ingérés par jour, seulement 5 à 10 µg traversent la barrière digestive par un phénomène d'absorption passive.

L'absorption digestive et la rétention tissulaire de l'aluminium dépend du pH, du taux d'aluminium ingéré, de la solubilité de la forme chimique sous laquelle l'aluminium est ingéré, l'intégrité de la barrière intestinale et de la fonction rénale. Diverses études ont été réalisées dans ce sens, il a été montré qu'après ingestion des quantités d'aluminium de l'ordre du gramme, l'absorption intestinale est augmentée de 20 à 50 fois par rapport à la normale, avec un taux d'Al de 500 µg qui traverse la barrière intestinale. Les auteurs ont avancé que la présence de phosphates dans l'alimentation était probablement le principal mécanisme naturel qui empêchait l'aluminium de passer dans la circulation sanguine (**Gourier-Fréry et al., 2003**).

Certains composants de l'alimentation, comme l'acide lactique, l'acide ascorbique, l'acide citrique augmentent l'absorption intestinale, il en est de même pour le citrate d'aluminium qui favorise en grande partie l'absorption intestinale de l'Al et son augmentation

sanguine. Il a été bien établi que l'administration d'hormone parathyroïde ou de vitamine D à des rats supplémentés en aluminium, sont capable de stimuler l'absorption intestinale de l'Al et de conduire à une augmentation de sa concentration dans le sang (**Mayor et al., 1980 ; Abreo et al., 1988 ; Dunstan et al., 1985 ; Mayor, 1977**). Un déficit cellulaire en fer, calcium et magnésium augmentent également l'absorption de l'aluminium. Inversement, l'administration concomitante de fer et d'aluminium diminue l'absorption intestinale du fer (**Fernandez-Menendez, 1991**). De même, l'administration d'aluminium à des rats carencés en calcium aggrave la carence calcique (**Boudey et al., 1997 ; Konishi, 1996**).

#### ***2.4 Transport et distribution de l'aluminium***

Après avoir pénétré dans l'organisme, l'aluminium est véhiculé par le système sanguin jusqu'aux organes. Dans le sang, l'aluminium se retrouve majoritairement dans la fraction plasmatique, il est de l'ordre de 2,4 µg/L chez les sujets normaux (**Alfrey, 1991**). L'Al se fixe préférentiellement à des molécules de haut poids moléculaire telles que les protéines et notamment, la transferrine (80 %) mais également à l'albumine (10 %) et à des protéines de faible poids moléculaire. La transferrine est une glycoprotéine qui joue un rôle important dans le transport de l'aluminium dans le sang. Notons que la transferrine a un rôle physiologique dans le transport du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans le sang, et possède deux sites de fixation qui sont occupés par le fer dans les conditions normales. Cependant lors de la présence d'une grande concentration de l'Al dans le sang, ce dernier pourrait déplacer l'équilibre de fixation de  $\text{Fe}^{3+}$  en faveur de  $\text{Al}^{3+}$  sur la transferrine, ce qui a pour conséquence un changement de la conformation de l'apotransferrine (**Martin et al., 1987 ; Van Landeghem et al., 1997 ; Tang et al., 1995**). L'albumine pourrait également être impliquée dans le transport de l'aluminium plasmatique mais d'une façon beaucoup plus secondaire et beaucoup moins spécifique que la transferrine. L'Al plasmatique peut former aussi des petits complexes solubles avec le citrate grâce à leur grande affinité. Ce complexe va assurer, d'une part, le transport de l'Al au niveau sanguin, d'autre part, une accumulation intracellulaire, ce qui provoque une toxicité de l'Al. Or, l'Al induit une désorganisation de la membrane plasmique à cause de sa liaison aux groupes phosphates des phospholipides, ce qui crée des discontinuités dans la superficie externe de la membrane et donc favorise le passage de certaines espèces chimiques, comme les ions  $\text{Fe}^{2+}$  qui peuvent produire la peroxydation des lipides par la formation de radicaux libres via la réaction de fenton. La charge naturelle en aluminium chez le sujet sain varie de



30 à 50 mg (**Atsdr, 1999**), et se répartit essentiellement dans l'os (de l'ordre de 50 %), le poumon (environ 23 %) et le foie (20 à 25 %).

Le pourcentage restant se répartit dans les autres organes, notamment le système nerveux central et la rate. Les concentrations de l'Al dans les tissus et notamment dans le poumon et le cerveau augmentent avec l'âge (**Gourier-Fréry and Fréry, 2004 ; Burnet, 1983**) (**Figure 22**). L'aluminium doit franchir la barrière hématoencéphalique qui protège le cerveau c'est pourquoi seulement de faibles quantités en aluminium sont mesurées dans cet organe. Pour traverser cette barrière, l'Al emprunte les transporteurs spécifiques des acides monocarboxyliques, ce qui mène à sa fixation au niveau de la matière grise et dans l'hippocampe.

En ce qui concerne l'Al intracellulaire, il est localisé en majorité dans les lysosomes des tissus, où il est insolubilisé sous forme de phosphate d'aluminium. Il a été démontré que :

- au niveau des hépatocytes, l'Al est trouvé dans le cytoplasme, la mitochondrie, le noyau et le réticulum endoplasmique (**Spencer et al., 1995**).
- aux niveaux tubulaires rénales, l'Al est détecté dans le cytoplasme et les mitochondries (**Julka et al., 1996**).
- au niveau cérébrale : l'Al s'accumule dans le noyau mais des dépôts sont localisés également dans le cytoplasme, les microsomes et les mitochondries (**Julka et al., 1996**).

### 2.5 *Élimination de l'aluminium*

Les reins constituent l'émonctoire principal de la fraction de l'aluminium effectivement absorbée. Chez l'homme, la majorité de l'aluminium ingéré n'est pas absorbée et est retrouvée dans les fèces (> 95 %) (**Gourier-Fréry et al., 2003**). La voie urinaire est la principale voie d'excrétion de l'aluminium absorbé (83 %). L'élimination urinaire chez les individus à fonction rénale normale est comprise entre 3 et 20 µg/L (**Lauwerys, 2001**). Lorsque des fortes doses d'Al sont administrées, la capacité rénale sera dépassée et l'Al sera alors retenu dans l'organisme. Des chélateurs, tels que l'EDTA et la déféroxamine, peuvent augmenter l'élimination urinaire de l'aluminium par effet complexant. La demi-vie d'élimination dépend de la durée d'exposition et de la redistribution de l'aluminium à partir des sites de stockage et peut aller jusqu'à quelques années. Elle est triphasique : la demi-vie d'élimination initiale est de quelques heures, celle de la phase suivante de quelques semaines, et la dernière généralement supérieure à 1 an (**Bismuth, 2000**).

### 2.6 Implication de l'aluminium dans la maladie d'Alzheimer

L'Al a été bien connu depuis les 100 dernières années pour sa neurotoxicité (**Oshima et al., 2013**). C'est le facteur de risque majeur pour la cause et le développement de MA, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Parkinson (**Singla and Dhawan, 2014**). Il n'a aucun rôle biologique pour l'homme et sa disparition dans le corps ne présente aucun risque. Il a été montré qu'au cours de ces maladies les concentrations cérébrales d'aluminium étaient anormalement élevées mais pour lesquelles aucune preuve formelle n'a encore été clairement établie (**L'Écuyer, 2002**). Des études fréquentes ont confirmé que les concentrations de l'Al sont augmentées dans les cerveaux des patients Alzheimer en raison de la consommation de nourriture et d'eau potable contenant l'Al (**Buraimoh et al., 2012**).

Il a été établi qu'un certain nombre d'ions métalliques comprenant  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  se trouvent co-localisés avec des feuillettes d' $A\beta_{42}$  dans les plaques séniles dans le cerveau des patients Alzheimer (**Exley and Esiri, 2006 ; Kawahara and Kato-Negishi, 2011**). Une forte association d'Al avec NFT dans la MA a été observée par **Perl and Brody, (1980)**, en utilisant une combinaison électronique à balayage microscopie et spectrométrie X-ray. Cela leur a permis d'évaluer la localisation de l'Al sur des biopsies du cerveau au niveau cellulaire et subcellulaire. Il a été montré que l'Al se lie sélectivement à PHF-tau, et induit leur agrégation ce qui conduit à un retard de la protéolyse *in vivo*. Le taux élevé d'Al favorise la production de la protéine tau et par conséquent la formation de NFT, la stimulation du processus oxydatifs des cellules gliales, et donc endommager l'intégrité des neurones (**Campbell et al., 2004**). Il a été révélé que l'Al renforce la neurotoxicité de la protéine  $A\beta$  et conduit donc à la formation des agrégats d' $A\beta$  due à la dégénérescence des neurones (**Moore et al., 2000**). L'Al médie la libération des neurotransmetteurs et des activités enzymatiques et il conduit à l'hyperphosphorylation de neurofilaments normaux, et par conséquent favorise la dégénérescence neurofibrillaire. L'administration d'Al stimule la formation de tau dans les inclusions au niveau de cerveau et de la moelle épinière (**Exley, 2005**). L'Al accélère l'oligomérisation d' $A\beta$ , est considéré comme un biomarqueur de neurotoxicité, cela montre un lien entre l'Al et l'hypothèse la cascade amyloïde de la MA.

Selon les rapports cliniques, en 1986, les premiers essais entrepris sur la relation entre la présence d'Al dans l'eau potable et la MA a été rapportée par deux études en Norvège, où il a été trouvé que le taux de mortalité a augmenté dans les zones à forte accumulation d'aluminium dans l'eau potable. Des études épidémiologiques réalisées dans la Grande-

Bretagne et plusieurs autres pays et qui traitent la même problématique ont montré que la présence de l'Al dans l'eau potable contribue à la MA (**Drago et al., 2008**). Il a été admis que l'Al peut exercer des effets nuisibles sur les systèmes neurologiques, hématologiques et squelettiques chez les patients atteints d'insuffisance rénale (**Rondeau et al., 2009**). Il est bien connu que la sévérité et l'évolution clinique de l'intoxication aux métaux dépend principalement de la dose, la voie et la durée d'exposition ainsi que de différentes espèces. En dépit de ces observations, le rôle causal de l'Al dans la MA a été bien établi. Certains chercheurs n'ont pas réussi à détecter des niveaux élevés de l'Al dans les cerveaux des patients Alzheimer malgré l'utilisation des méthodes de détection très sensibles et sophistiquées (**Chafi et al., 1991 ; Landsberg et al., 1992**).

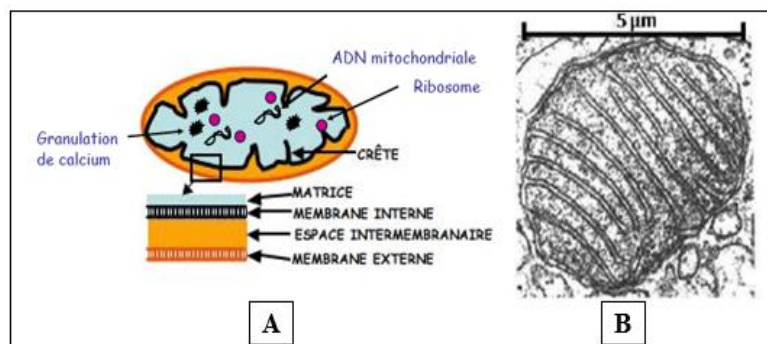
Des résultats contradictoires ne laissent pas croire l'hypothèse d'Al et la MA. Ces divergences ont été renforcées par le fait que l'Al n'a pas de rôle biologique essentiel, et il semble être à la fois mal absorbé et efficacement excrété par le corps (**Atsdr, 2008 ; Priest, 1993 ; Priest, 1998 ; Wills, 1985**). L'Al, ne peut pas donc, s'accumuler dans le tissu cérébral en quantités suffisantes pour causer des dommages physiologiques dans des conditions pertinentes (**Atsdr, 2008 ; Priest, 1993**). La présence d'Al dans le cerveau a ensuite été attribuée à des facteurs expérimentaux (**Landsberg et al., 1992**), ou à l'absorption passive par des neurones dysfonctionnels (**Shore and Wyatt, 1983**). Des échantillons de biopsie du cerveau montrent que, malgré les taux élevés de l'Al dans le cerveau, l'Al intranucléaire n'est pas significativement élevé chez les patients dialysés (**McLachlan, 1980**). La chélation de l'Al par deferoxamine a été faite avec succès pour les personnes souffrant de dialyse, alors qu'il est moins efficace pour améliorer le résultat clinique de la MA (**McLachlan, 1991**). Ces divergences ont été historiquement utilisées pour rejeter l'importance de la toxicité aluminique. La recherche scientifique est douteuse en raison d'un certain nombre d'incohérences des résultats scientifiques pour lesquelles aucune explication adéquate est donnée. Par exemple, **Landsberg et al.** ont publié un travail en **1993**, dans lequel, ils ont été en mesure de détecter l'Al dans les plaques de cerveau des patients Alzheimer. Ils n'ont fourni aucune donnée en ce qui concerne la relation entre l'Al et NFTs (**Lai et al., 1982 ; Landsberg et al., 1993**). Il a été montré sur un modèle animal qui induit la dégénérescence neurofibrillaire que la MA ne peut pas résulter d'une injection intracérébrale directe d'une dose sublétales d'Al utilisée. Des études récentes par **Walton (Walton 2009a, Walton 2009b, Walton 2009c)** ont montré comment de petites doses d'Al neurotoxiques peuvent

s'accumuler au cours de vie en quantités suffisantes pour déclencher une maladie neurodégénérative chez les animaux en bonne santé avec pas des prédispositions génétiques évidentes. Cela a été rapporté par une ingestion chronique d'Al chez le rat, en quantités équivalentes à celles ingérées régulièrement par l'Homme. Les rats ont présenté les caractéristiques neuropathologiques de la MA et s'accompagnent par une détérioration cognitive, une détérioration de l'hippocampe, une augmentation de l'expression d'APP et un dépôt d'une teneur plus élevée d'Al dans les cellules.

### 3. Implication des mitochondries dans la maladie d'Alzheimer

#### 3.1 Structure et fonctionnement des mitochondries

Les mitochondries sont des organites présents dans la plupart des cellules eucaryotes. elles ont été découvertes la première fois dans la cellule par **Altman (Altman, 1890)**. Se sont des organites allongés, de taille qui varie de 1 à 10  $\mu\text{m}$  de long et de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de large, de forme boudinée et limités par une double membrane unitaire. La membrane externe est lisse, tandis que la membrane interne est plissée vers l'intérieur et forme des crêtes. De ce fait, on reconnaît dans la mitochondrie deux compartiments: l'espace intermembranaire, compris entre les deux membranes et celui limité par la membrane interne, la matrice. La matrice contient des ribosomes de type bactérien appelés mitoribosomes, des enzymes, et au moins une boucle d'ADN mitochondrial (**Figure 23**).



**Figure 23:** *Ultrastructure mitochondriale*

**A:** Représentation schématique d'une mitochondrie.

**B:** Mitochondrie observée au microscope électronique.

Les mitochondries sont les seules constituantes de la cellule ayant de l'ADN (ADN mt), des ARN et de protéines. La plupart des cellules humaines contiennent entre 500 et 2000 mitochondries, ce nombre varie en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. Les

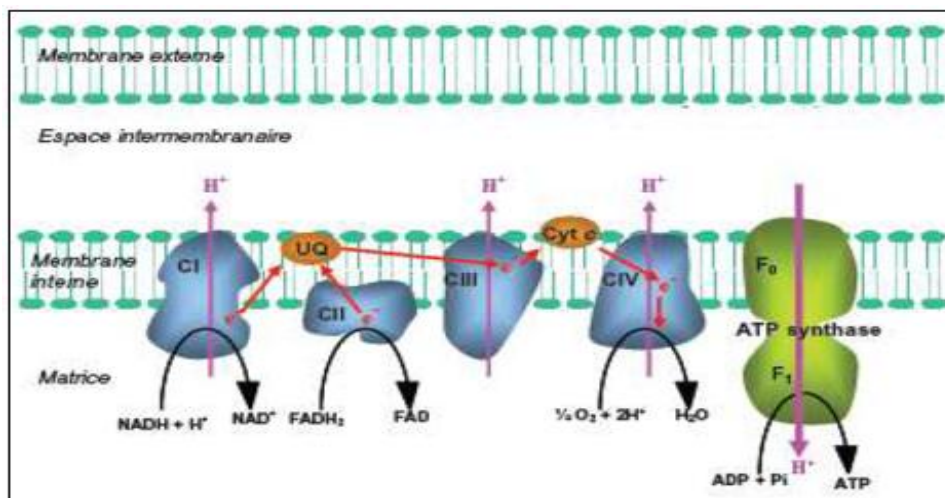
mitochondries interviennent dans la phase finale de l'oxydation des substrats énergétiques (lipides, glucides et protides), et utilisent l'oxygène moléculaire et les combustibles provenant des glucides, des lipides ou des protéines, pour produire, 90 % de l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire sous forme d'ATP (Adénosine tri-phosphate) (**Rolfe and Brown, 1997**). Les mitochondries jouent un rôle central dans la survie et la mort des cellules eucaryotes parce qu'elles assurent à la fois, le métabolisme énergétique et les voies apoptotiques. Elles sont considérées comme un moteur puissant des cellules, fournissant le carburant cellulaire universel par la génération de l'ATP. Les mitochondries contribuent à de nombreuses fonctions cellulaires, y compris l'apoptose, la croissance, la différenciation cellulaire, la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire, la modification de l'état cellulaire d'oxydo-réduction (redox) et la plasticité synaptique (**Grimm et al., 2016**).

Les mitochondries ne sont pas isolées ni figées dans la cellule, leur mouvements et leur accumulations sont coordonnés, puisqu'elles se déplacent en continue, grâce au réseau mitochondrial dynamique qui est finement régulé par des phénomènes de fusion et de fission dans les régions qui nécessitent de l'énergie (**Jakobs, 2006**). Ce réseau est lui-même associé aux microtubules du cytosquelette ainsi qu'aux autres organites cellulaires. Le métabolisme oxydatif dans la mitochondrie est principalement tributaire des acides gras et du pyruvate. Ce dernier est produit par la glycolyse dans le cytosol, et métabolisé en acétyl coenzyme A (acétyl CoA) au niveau de la membrane interne mitochondriale. Cet acétyl CoA aussi fourni par la  $\beta$ -oxydation, mitochondriale et éventuellement peroxysomale, des acides gras est métabolisé en  $\text{CO}_2$  via le cycle de Krebs en produisant des équivalents réduits sous forme de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné) et  $\text{FADH}_2$  (Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée). Tout au long de la chaîne respiratoire, les électrons provenant du NADH et du  $\text{FADH}_2$ , vont perdre de l'énergie qui sera utilisée pour former le gradient électrochimique de proton entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale.

Les électrons riches en énergie ainsi récupérés seront transportés successivement via les différents complexes enzymatiques. Ces derniers sont de l'ordre de 5 complexes dont chacun est formé de plusieurs sous unités protéiques à savoir NADH-ubiquinone-oxydoréductase (Complexe I), succinate-ubiquinone-oxydoréductase (Complexe II), cytochrome C- ubiquinone oxydoréductase (Complexe III), cytochrome c-oxydase (Complexe IV) et ATP synthase (Complexe V). Les électrons sont transportés par le NADH et le  $\text{FADH}_2$ , respectivement aux complexes I et II qui transfèrent l'électron à l'ubisemiquinone qui à son

tour l'achemine au complexe III. L'arrivée de l'électron au complexe IV constitue la fin de la chaîne d'oxydoréduction et entraîne la réduction de l'oxygène moléculaire en eau.

Les réactions associées au passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraînent le passage d'un proton vers l'espace inter-membranaire à travers les complexes. Ce passage établit un gradient électrochimique de protons qui crée une force proton-motrice utilisée par le complexe V pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP, assurant le couplage de la chaîne des oxydoréductions avec la production d'ATP (**Figure 24**) (**Stock et al., 1999**).



**Figure 24:** Chaîne de transport des électrons au niveau mitochondrial

Les électrons sont apportés au niveau de la chaîne respiratoire par les équivalents réducteurs: NADH (complexe I) et FADH<sub>2</sub> (complexe II). L'électron est ensuite amené au niveau du complexe IV où il est utilisé pour former de l'eau. Le passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraîne le passage de protons (H<sup>+</sup>) dans l'espace inter-membranaire et crée un gradient protonique qui va permettre la formation ATP lors du passage des protons au niveau de l'ATP synthase.

### 3.2 Dysfonction mitochondriale et maladie d'Alzheimer

Les mitochondries sont particulièrement importantes dans le système nerveux et nécessitent environ 20% de la consommation totale d'oxygène pour le soutien de l'énergie neuronale (**Shulman et al., 2004**). Les dysfonctionnements mitochondriaux ont été impliqués

dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives, y compris la MA, qui sont caractérisés par un hypométabolisme cérébral et d'une homéostasie altérée dans le statu redox.

Une diminution de l'activité mitochondriale, y compris la phosphorylation oxydative, le niveau des protéines et l'activité des complexes impliqués dans la chaîne des transport d'électron, peuvent être observés avec l'âge (**Grimm et al., 2016 ; Leuner et al., 2012**). Des déformations mitochondriales apparaissent dans les premiers stades de la MA (**Wisniewski et al., 1970**), en premier lieu dans les neurites puis autour des plaques séniles et dans la cellule autour des dégénérescences neurofibrillaires (**Johnson and Blum, 1970**). Les deux protéines, A $\beta$  et tau hyperphosphorylé, se sont avérées avoir un impact direct sur la fonction mitochondriale (**Schmitt et al., 2012**). Plus, précisément, les données cellulaires et les modèles animaux transgéniques ont montré que la présence d'A $\beta$  altère le potentiel de la membrane mitochondriale, diminue l'activité mitochondriale du complexe IV et la production d'ATP, ainsi l'augmentation des niveaux des ERO (**Keil et al., 2004 ; Rhein et al., 2009a ; Rhein et al., 2009b**).

Les mitochondries sont des organites très dynamiques, qui sont fusionnées et divisées en continue afin de maintenir une population mitochondriale homogène en mélangeant leur teneur en ADN, les lipides et les protéines (**Campello and Scorrano, 2010**). Cette dynamique mitochondriale (fusion / fission) est également diminuée en présence d'A $\beta$  et de la protéine tau hyperphosphorylée, et par conséquent, un réseau mitochondrial allongé et fragmenté, ce qui pourrait, vice versa, avoir un impact négatif sur les fonctions bioénergétiques de ces organites (**Wang et al., 2008a ; Wang et al., 2008b ; Wang et al., 2009 ; DuBoff et al., 2012**). Par ailleurs, la perte du transport axonal modifie aussi la répartition des mitochondries dans les différents compartiments cellulaires de régions très diverses comme le cortex cérébral, le thalamus, le striatum, le cervelet ou le locus coeruleus (**Lin and Beal, 2006**). L'A $\beta$  semble déclencher un dysfonctionnement principalement de l'activité mitochondriale du complexe IV et plus tard du complexe I, alors que la présence de la protéine tau anormalement hyperphosphorylée altère l'activité du complexe I en premier lieu (**David et al., 2005 ; Rhein et al., 2009**).

La dissociation des microtubules induite par l'hyperphosphorylation de la protéine tau, altère le transport axonal, et réduit le nombre des mitochondries transportées vers la synapse (**Eckert et al., 2014**), ce qui peut conduire à la dégénérescence synaptique et la mort neuronale. En outre, la présence anormale de la protéine tau affecte l'activité du complexe

mitochondrial *in vitro* et *in vivo* (David *et al.*, 2005 ; Schulz *et al.*, 2012), diminue le niveau d'ATP et augmente la production de ERO. Comme A $\beta$ , tau hyperphosphorylée semble avoir un impact négatif sur la dynamique mitochondriale en réduisant la fission, ce qui induit un allongement du réseau mitochondrial (DuBoff *et al.*, 2012). Des altérations mitochondriales liées au taux de dommage oxydatif présent dans les neurones ont conduit à une réduction de 25% du nombre des mitochondries mais une augmentation de leur taille, cela a été montré suite à une biopsie de cortex fronto-pariétal (Hirai *et al.*, 2001). La relation entre la MA et les enzymes mitochondriales a été bien mise en évidence.

Il a été démontré que trois enzymes-clés mitochondriales du cycle de Krebs présentent une diminution de leur activité dans les tissus nerveux prélevés en post-mortem, l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase dépendante de la thiamine (Gibson *et al.*, 1988 ; Mastrogiacomo *et al.*, 1993), l'isocitrate déshydrogénase (Bubber *et al.*, 2005) et la pyruvate déshydrogénase servant à transformer le pyruvate en acétyl-CoA (Yates *et al.*, 1990) évalué chez les patients Alzheimer (Bubber *et al.*, 2005).

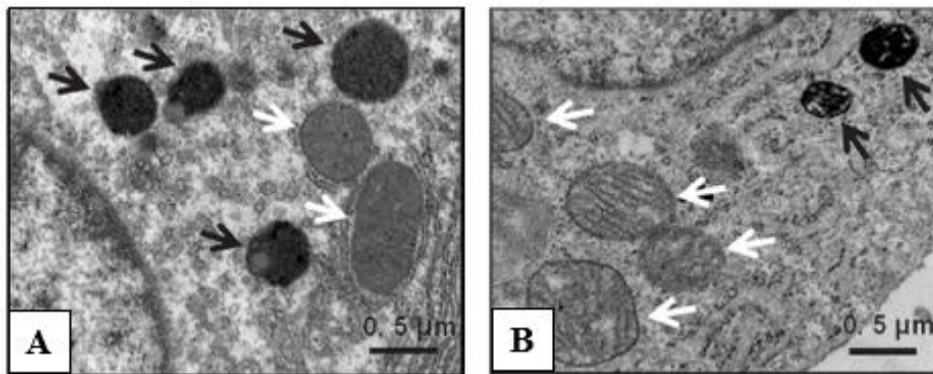
#### 4. Implication des peroxysomes dans la maladie d'Alzheimer

##### 4.1 Structure et fonctionnement des peroxysomes

Les peroxysomes (encore appelés microbodies) sont des organites cellulaires ubiquitaires signalés en 1954 par Rhodin et purifiés pour la première fois en 1966 par l'équipe De Duve (De Duve and Baudhuin, 1966). Ces deux auteurs ont donné le nom «peroxysome» à cet organite suite à la découverte de sa première fonction, la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $2\text{H}_2\text{O}_2$ ) en  $2\text{H}_2\text{O}$  et en  $\text{O}_2$  par la catalase. Ces organites sont uni-membranaires, à fonction oxydative mais non génératrice d'énergie. Ils sont présents dans toutes les cellules eucaryotes (à l'exception des érythrocytes) ainsi que dans les eucaryotes unicellulaires et les cellules végétales supérieures (Hruban *et al.*, 1972 ; Islinger *et al.*, 2012). Les peroxysomes apparaissent sous forme de vésicules closes de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils sont délimités par une simple membrane phospholipidique de 6 à 8 nm d'épaisseur (Figure 25). A l'aide de coupes striées en microscopie électronique, l'équipe de Fahimi a pu reconstituer l'organisation intracellulaire de cet organite qui se présente comme un véritable réseau peroxysomial (Latruffe, 1992 ; Yamamoto and Fahimi, 1987). Cette structure en réticulum est à relier au mécanisme de biogenèse de peroxysomes dérivant de la division de peroxysomes préexistants, une fois que ceux-ci ont incorporé suffisamment de matériel protéique et



lipidique nouvellement synthétisés (Latruffe, 1992 ; Lazarow, 2003 ; Girzalsky *et al.*, 2010).



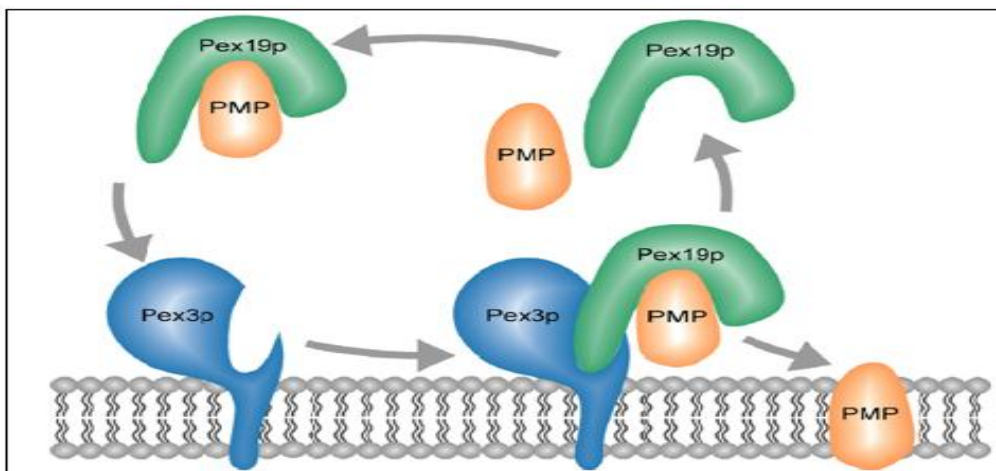
**Figure 25: Identification des peroxysomes par microscopie électronique à transmission**

(A) Ultrastructure des peroxysomes dans un hépatocyte de rat (Lizard *et al.*, 2012) et (B) dans les oligodendrocytes murins (Novikoff and Goldfischer, 1969 ; Baarine *et al.*, 2009).

Les peroxysomes, dupliquent leur contenu au cours de la division de la cellule. Cela nécessite des protéines pour assurer les processus de fusion et fission de l'organelle, et le maintien de leur nombre. La taille, la forme et le nombre des peroxysomes dépendent de l'organisme et du type cellulaire. Les peroxysomes sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques importantes. Ils catalysent les réactions redox et sont également des régulateurs importants du stress oxydatif (Del Rio, 2011 ; Nordgren and Fransen, 2014). Les peroxysomes possèdent environ 50 activités enzymatiques différentes d'où leurs rôles métaboliques essentiels dans le développement harmonieux des organismes (Wanders and Waterham, 2006). Ils participent à la dégradation des AGTLC via la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et la voie de l' $\alpha$ -oxydation de l'acide phytanique. Ils sont impliqués dans le catabolisme des leucotriènes (Mayatepek *et al.*, 1993), la synthèse des lipides (esters de phospholipides), d'acide docosahexaénoïque (DHA), des plasmalogènes, des acides biliaires (Schrader and Fahimi, 2008) et du cholestérol (Faust and Kovacs, 2013). Les peroxysomes sont dépourvus d'ADN. Ils ne peuvent pas synthétiser leurs protéines et doivent donc les importer (Subramani *et al.*, 2000). Ces protéines sont synthétisées dans le cytosol par les ribosomes libres et transportées après traduction aux peroxysomes où elles y seront

insérées (Platta and Erdmann, 2007). L'insertion de protéines membranaires du peroxyosome (PMP) nécessite le Pex3p, Pex19p et dans certains organismes Pex16p (Fujiki *et al.*, 2006).

La Pex19p est censée fonctionner comme un récepteur d'importation pour les protéines membranaires du peroxyosome grâce à une séquence spécifique mPTS (Platta and Erdmann, 2007) (Figure 26). La Pex3, à son tour, interagit comme récepteur avec Pex19 pour faciliter l'insertion des PMP (protéines membranaire peroxyosomale) (Fang *et al.*, 2004).



**Figure 26:** *Cascade d'importation des protéines membranaires peroxyosomales*

La plupart des protéines de la membrane du peroxyosome (PMP) contiennent une séquence de protéines signals mPTS qui est reconnue par le récepteur d'importation Pex19p qui les dirige vers la membrane peroxyosomale. Pex3p est une protéine d'ancrage membranaire pour le complexe Pex19-PMP. D'après (Platta and Erdmann, 2007).

#### 4.2 $\beta$ -oxydation peroxyosomale

Le peroxyosome joue un rôle clé dans la  $\beta$ -oxydation des AGTLC. En effet, la  $\beta$ -oxydation peroxyosomale est la voie exclusive de dégradation des AGTLC. Se sont les acides gras possédant une chaîne supérieure à 22 carbones qui sont oxydés dans les peroxyosomes avant d'être entièrement dégradés par la  $\beta$ -oxydation dans les mitochondries.

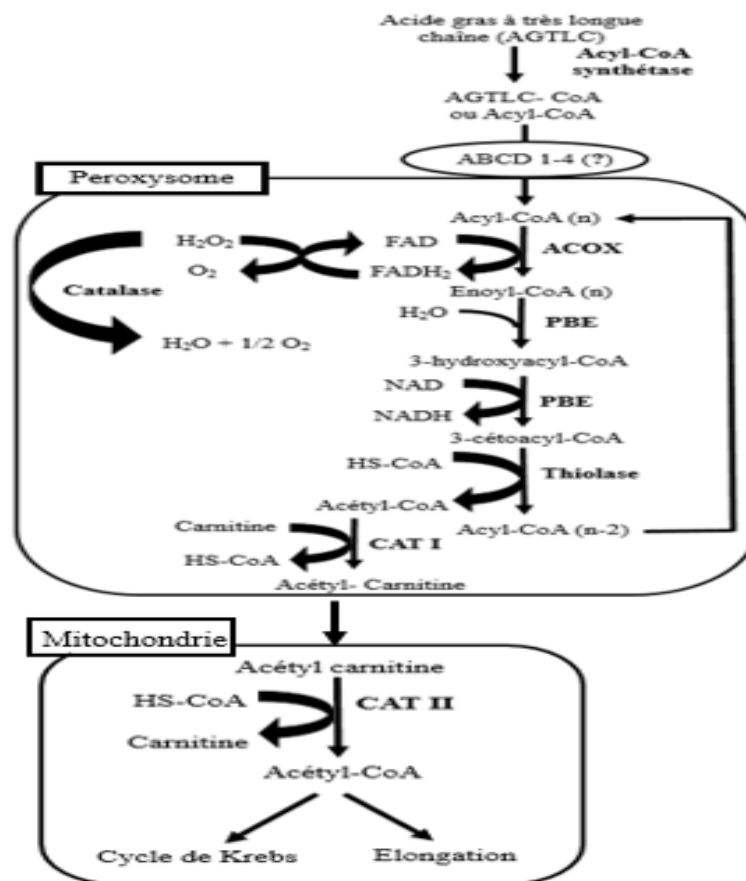
La  $\beta$ -oxydation implique une série de quatre réactions successives : (1) une déshydrogénation, (2) une hydratation, (3) une déshydrogénation à nouveau et (4) un clivage thiolitique. Ces réactions sont catalysées dans le peroxyosome par trois enzymes : (1) Acyl-

CoA oxydase (déshydrogénation), (2) enzyme bifonctionnelle (hydratation de la double liaison et déshydrogénation à nouveau) et (3)  $\beta$ -cétotiolase (clivage thiolitique) (**Wanders and Waterham, 2006**). La  $\beta$ -oxydation des acides gras par les peroxysomes est capable de raccourcir la chaîne des AGTLC en une chaîne moyenne d'ester acyl-CoA, suivi par le transport vers la mitochondrie par la carnitine pour permettre l'oxydation complète en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ .

Les AGTLC sont tout d'abord activés en AGTLC Coenzyme A (CoA) (ou acyl-CoA) par l'acyl-CoA synthétase dans le cytosol et sont transportés dans les peroxysomes pour y être  $\beta$ -oxydés. Parmi les 48 transporteurs ABC présents chez l'Homme, certains participent au transport de lipides, tels que le cholestérol, les stérols végétaux, les acides biliaries, les phospholipides, les sphingolipides ou encore les AGTLC. Les AGTLC métabolisés dans les peroxysomes y sont importés non pas à l'aide de la navette de la carnitine, mais grâce à des hémi-transporteurs ABC qui doivent s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec un autre transporteur de la famille ABCD (ABCD1, ABCD2, ABCD3, ABCD4) pour être fonctionnels (**Tanaka et al., 2002 ; Guimaraes et al., 2004**). L'homo ou l'hétérodimérisation entre les différents transporteurs ABCD serait à l'origine des spécificités de substrats et donc du type d'acides gras transportés. ABCD1, ABCD2, ABCD3 sont des transporteurs peroxysomaux (**Kemp and Wanders, 2007**) alors que le quatrième est localisé dans le réticulum endoplasmique (**kashiwayama et al., 2009**).

La première réaction de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale est l'oxydation des acyl-CoA en 2-trans-enoyl-CoA, par l'acyl-CoA oxydase (ACOX). Cette oxydation induit la production de peroxyde d'hydrogène qui sera ensuite éliminé par la catalase. La deuxième et la troisième réaction de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale sont réalisées par un complexe enzymatique multifonctionnel : le PBE (Peroxisomal Bifunctional Enzyme), appelé aussi multifunctional protein-2 (MFP2) qui conduit à la production du enoyl-CoA hydratase et une activité 3-hydroxyacyl CoA-déshydrogénase. L'activité enoyl-CoA va permettre l'hydratation du 2-trans-enoyl-CoA en D-3-hydroxyacyl-CoA et l'activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase va permettre la déshydrogénation du D-3-hydroxyacyl-CoA en 3-cétoacyl-CoA. La quatrième et dernière réaction de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale implique le clivage du 3-cétoacyl-CoA en acyl-CoA possédant deux atomes de carbone en moins (n-2) que l'acyl-CoA initial et en acétyl-CoA (**Figure 27**). Cette étape nécessite deux enzymes : la  $\beta$ -cétotiolase et l'acyl-CoA synthétase. L'acyl-CoA (n-2) va subir d'autres cycles de  $\beta$ -oxydation afin de

réduire son nombre de carbones jusqu'à l'octanoyl-CoA (C8 :0 CoA). L'octanoyl-CoA va ensuite rejoindre la voie de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, afin d'y subir une oxydation complète. L'acétyl-CoA aura plusieurs destinées possibles, notamment celle de rejoindre le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP ou de subir une élongation afin de produire de nouveaux acides gras (**Figure 27**).

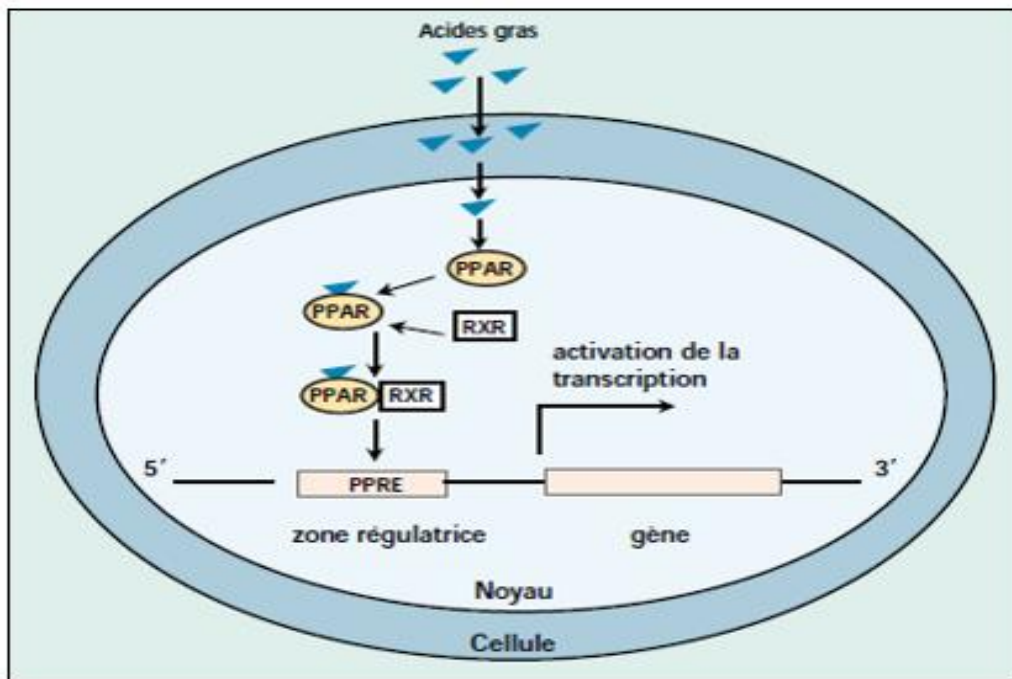


**Figure 27:** Schéma de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale

L'activation des acides gras se fait avec l'acyl-CoA synthase avant d'être transportés à travers la membrane peroxysomale par des hémi-transporteurs ABC qui s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent pour être fonctionnels. L'acyl-CoA va prendre la voie de la  $\beta$ -oxydation. Cette oxydation induit la production de peroxyde d'hydrogène qui sera ensuite éliminé par la catalase. La voie de la  $\beta$ -oxydation est constituée de quatre réactions catalysées par trois enzymes (1) Acyl-CoA oxydase (déshydrogénation), (2) enzyme bifonctionnelle (hydratation de la double liaison et déshydrogénation à nouveau) et (3)  $\beta$ -cétothiolase (clivage thiolytique). La chaîne d'acyl-CoA est raccourcie en une chaîne moyenne d'ester d'acyl-CoA. Ce dernier est transporté par la suite vers la mitochondrie par la carnitine pour l'oxydation complète en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ . La sous unité acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs pour une oxydation supplémentaire ou sert pour l'élongation des chaînes des acides gras. ACOX : acyl-CoA oxydase, PBE (Peroxisomal Bifunctional Enzyme multifunctional protein-2 (MFP2), CAT Carnitine acétyltransférase. D'après (Wanders and Waterham, 2006).

### b. Régulation transcriptionnelle du métabolisme des acides gras

Les acides gras sont des molécules biologiques ubiquitaires, ils jouent un rôle très important comme substances énergétiques aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Les cellules peuvent en accumuler de très grandes quantités sous forme de triglycérides. Les acides gras ont un rôle essentiel dans la régulation de certaines réactions métaboliques chez l'homme. Ils contribuent de ce fait à la prévention ou au développement de maladies chroniques telles que l'athérosclérose, le diabète insulino-résistant et certains cancers. Les acides gras peuvent exercer leur action métabolique en altérant la structure des membranes, en modifiant les activités enzymatiques ou en contrôlant des signaux de transductions cellulaires. Il est donc important de contrôler les niveaux des acides gras. Pour cela la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras est essentielle pour l'homéostasie lipidique (**Desvergne *et al.*, 2006**). Cette régulation est exercée par des récepteurs nucléaires du type PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) dont le PPAR $\alpha$  joue un rôle majeur (**Cherkaoui-Malki *et al.*, 2001**) (**Figure 28**). Les PPAR $\alpha$  sont donc, des activateurs des facteurs de transcription impliqués dans l'expression des certaines enzymes de la voie de  $\beta$ -oxydation peroxysomale et mitochondriale. Parmi ces gènes cibles, l'Acyl-CoA oxydase (ACOX1) qui est la cible directe de la PPAR $\alpha$ .



**Figure 28: Mode d'action des acides gras sur la transcription des gènes par PPAR**

Dans un premier temps, les acides gras se lient au PPAR, ils activent ce facteur de transcription, probablement en modifiant sa structure tertiaire. PPAR activé se lie à son tour à un second facteur de transcription, le Retinoic X Receptor (ou RXR). Le complexe protéique ainsi formé appelé – hétérodimère- reconnaît une séquence nucléotidique consensus, le « Peroxisome Proliferator Responsive Element », ou PPRE dans le promoteur des gènes. Enfin la fixation de l'hétérodimère sur le PPRE active la transcription du gène.

#### 4.3 Dysfonctionnement peroxysomale et maladie d'Alzheimer

Dans la MA, des altérations lipidiques sont présentes au début de la progression de la maladie. Certaines de ces altérations pointent vers un dysfonctionnement du peroxysome (Kou *et al.*, 2011). Chez l'homme, les déficiences liées à la biogenèse et les fonctions des peroxysomes peuvent causer plusieurs dommages et contribuer à l'élaboration des maladies neurodégénératives graves (Aubourg and Wanders, 2013 ; Munter, 2015). Le dysfonctionnement du peroxysome a montré qu'il est associé au vieillissement cellulaire ainsi que des maladies dégénératives liées à l'âge (Titorenko and Terlecky, 2011).

Une diminution de l'activité catalase, une faible synthèse des plasmalogènes et sénescence des peroxysomes pourraient favoriser l'apparition de maladies neurodégénératives y compris la MA (Goodenowe *et al.*, 2007 ; Farooqu and Horrocks, 2001 ; Terlecky *et al.*, 2006 ; Lizard *et al.*, 2012). La première preuve du rôle potentiel des peroxysomes dans le développement de la MA a été mise en évidence *in vitro* sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat. Dans ces cellules, la prolifération des peroxysomes, induite par le Wy-14.463, un agoniste puissant de PPAR $\alpha$ , a été associée avec une protection de la mort cellulaire induite par l'A $\beta$  (Santos *et al.*, 2005). Il a été démontré précédemment que les peroxysomes sont impliqués dans les premiers stades de la MA, comme étudié *in vivo* chez le modèle de souris transgéniques alzheimer (Tg2576), âgés de 3 mois, en l'absence de signes neuroanatomiques ou cytologiques apparents de la maladie, des altérations significatives des peroxysomes ont été observées (Cimini *et al.*, 2009). Ces dysfonctionnements des peroxysomes peuvent contribuer à la progression de la MA. Cela a été bien signalé sur les tissus du cerveau post-mortem des patients atteints de la MA (Kou *et al.*, 2011). Les peroxysomes sont nécessaires pour certaines étapes de la synthèse de plusieurs lipides, notamment plasmalogènes (Kuczynski and Reo, 2006) et de DHA (Calon *et al.*, 2004). Il a été démontré que les niveaux de ces deux lipides sont réduits dans les cerveaux des patients alzheimer (Ginsberg *et al.*, 1995 ; Han, 2010 ; Han *et al.*, 2001 ; Martin *et al.*, 1997 ; Pettegrew *et al.*, 2001). Le niveau de circulation d'éthanolamine- plasmalogènes est significativement diminué dans le serum des sujets souffrant de la MA, cliniquement et pathologiquement diagnostiqués à tous les stades de la démence (Goodenowe *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2010 ; Igarashi *et al.*, 2011). Une étude de cohorte Vienne- Transdanube Aging (VITA) faite sur des patients Alzheimer regroupés en trois cohortes de plus en plus graves (stades I-II, III-IV, et V-VI, respectivement selon la classification de Braak and Braak). Cette étude a montré une diminution des taux de plasmalogènes, une augmentation de la densité des peroxysomes dans les cellules neuronales, une diminution du nombre des peroxysomes dans les neurites des cerveaux Alzheimer et une accumulation de C22 :0 et des AGTLCs (C24 :0, C26 :0), substrats spécifiques de la  $\beta$ -oxydation péroxysomale (Kou *et al.*, 2011). Un double modèle de souris transgénique de la MA qui co-exprime un précurseur mutant humain de la protéine amyloïde de  $\beta$  (A $\beta$ PP<sub>swe</sub>) et préséniline 1 sans exon 9 (PS1 $\Delta$ E9) a été utilisé afin d'évaluer l'effet de la prolifération des peroxysomes sur la neurotoxicité d'A $\beta$  *in vivo*. Cette étude a montré des améliorations significatives dans la mémoire spatiale, formation des



niveaux inférieurs des agrégats d'A $\beta$ , réduction de la réponse inflammatoire, évaluée par l'astroglie et microglie, diminution de la phosphorylation de tau, diminution des protéines post-synaptiques, tout en favorisant la plasticité synaptique sous la forme d'une potentialisation à long terme (**Inestrosa et al., 2013**).

Il a été bien admis que l'augmentation des AGTLCs dans le cerveau de la MA implique un dysfonctionnement de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale. Des cultures primaires des neurones du cortex cérébral traitées par la thioridazine induit une accumulation des AGTLCs (C24:0 and C26:0). Cela a conduit à une augmentation de l'expression d'ARNm d'APP 751+770, de la protéine APP, de BACE1 ( $\beta$ -sécrétase) et des niveaux d'agrégation A $\beta$ 40 (**Shi et al., 2012**).

## 5. Stress oxydatif et maladie d'Alzheimer

### 5.1 Stress oxydatif et systèmes de défense

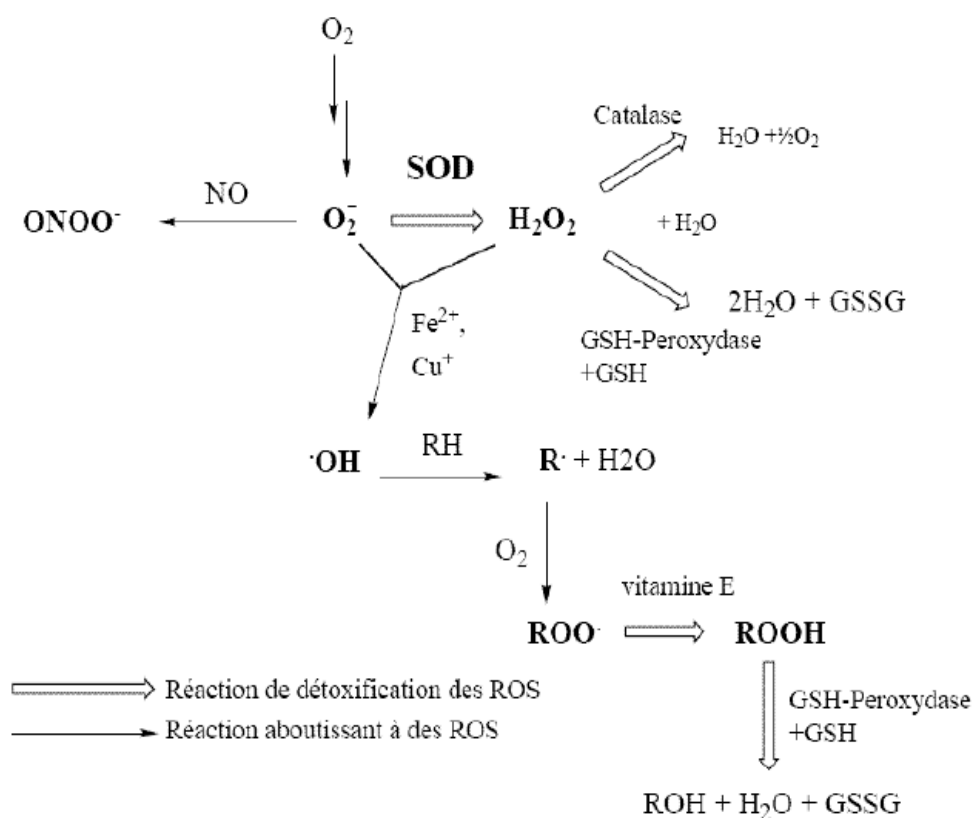
La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP en ATP. Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales: Production des molécules d'ATP et génération des radicaux libres (**Haleng et al., 2007**). Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche périphérique (**Halliwell, 1985**). La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules, la plupart du temps, une grande instabilité. Il s'agit d'espèces chimiques très réactives, agressives et à durée de vie très courte ( $10^9$ - $10^{-6}$ sec). Ces radicaux cherchent dans leur environnement un électron pour s'apparier en déclenchant une série de réactions en chaînes attaquant les structures voisines et en faisant ou non intervenir différentes enzymes (xanthine oxidase, NADPH-oxydases, iNOS). Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires: les radicaux primaires et les radicaux secondaires. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels et le radical hydroxyle OH $\cdot$  et l'anion superoxyde O $_2^{\cdot-}$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO $\cdot$ , ces deux derniers ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs des autres espèces plus réactives. Les radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Yoshikawa et al., 2000**).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $\text{ONOOH}$ ), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. Les radicaux comme les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}\cdot$ ) ou surtout le radical hydroxyle ( $\text{HO}\cdot$ ) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants (**Flavier, 2003**). Les radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote, même réactifs, ne sont pas uniquement toxiques. Ils peuvent avoir à la fois un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, sont générées en faible quantité et jouent un rôle physiologique important capables, notamment de réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose, et activer des facteurs de transcription, eux-mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (phagocytose) (**Haleng *et al.*, 2007; Flavier, 2003**).

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydantes. Lorsque la production des ERO devient excessive ou résulte de phénomènes toxiques exogènes, l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants (**Favier, 2003**). Certains composés antioxydants peuvent agir en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, et les transformant en molécules ou ions stables, il s'agit de la vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par l'alimentation sous forme de fruits et légumes (**Kinsky, 1989**). La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases (**Packer, 1991**). De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes, phytates (**Bors *et al.*, 1990**). La vitamine E neutralise les radicaux peroxydes et inhibiteur de la formation de peroxydes lipidiques. La vitamine C permet de neutraliser l'anion superoxyde. Notons, la présence d'autres composés endogènes, synthétisés par les cellules et jouent le même rôle d'antioxydants puissant, le plus important est le glutathion réduit, qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le  $\text{NO}\cdot$ . Le GSH à son tour permet de métaboliser le peroxyde d'hydrogène.

Le deuxième type de défense contre les ERO est de nature enzymatique visant à détruire les superoxydes et peroxydes. Les superoxydes dismutases (SOD) qui dismutent l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ( $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ). Ce dernier

est ensuite éliminé par la catalase ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ) ou par une autre peroxydase comme la glutathion peroxydase ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{GSSG}$ ) (Alves de Almeida *et al.*, 2007). Les superoxydes dismutases existent sous plusieurs isoformes : superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol ( Cu-ZnSOD). La glutathion peroxydase est chargée d'éliminer les peroxydes organiques. Elle réagit avec les peroxydes en présence de GSH (Hebbel, 1986). Le glutathion oxydé (GSSG) résultant de la réaction est de nouveau réduit par la glutathion réductase avec consommation de NADPH ( $\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$ ) (Hasspieler *et al.*, 1994) (Figure 29).



**Figure 29:** Diverses réactions impliquant soit les ERO, soit les enzymes anti-oxydantes

### 5.3 Dommages cellulaires induit par le stress oxydant

Lorsque les antioxydants et les enzymes antioxydantes n'arrivent pas à neutraliser les ERO, divers dommages peuvent affecter toutes les composantes de la cellule. Ces dommages se manifestent par une alévation de l'ADN, des protéines et des lipides cellulaires. Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux

doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>). Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde (R-O-O-R') au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer et al., 1992**). Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonaldialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal (4-HNE) (**Favier, 2003**). La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes. L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est donc la cible des ERO, il est à proximité directe de la source de production, du fait qu'il est fixé à la membrane interne. L'ADNmt est fragile car il est dépourvu d'histones et ne semble pas avoir de système de réparation aussi efficaces que celui de l'ADN nucléaire (ADNn) (**Bohr, 2002 ; Stevnsen, 2002**). L'attaque radicalaire de l'ADN peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées: 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, des cassures des brins d'AND et formation des adduits de l'ADN (**Favier, 2003**). Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle. Il s'agit de certains acides aminés comme la cystéine, la méthionine et la tyrosine. Une oxydation plus franche des protéines peut conduire à leur carbonylation et à leur dénaturation (**Barouki, 2006**).

#### ***5.4 Implication du stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer***

Le système nerveux central est particulièrement vulnérable aux dommages des radicaux libres, en raison du taux élevé de la consommation d'oxygène dans le cerveau, de la teneur élevée en lipides, et du taux faible des enzymes antioxydantes par rapport à d'autres tissus (**Coyle and Puttfarcken, 1993**). Ces dernières années, beaucoup d'études ont fourni des arguments qui montrent qu'une augmentation du stress oxydatif a été enregistrée dans le cerveau des patients Alzheimer, cela pourrait avoir un rôle dans la dégénérescence des neurones et la mort cellulaire (**Markesbery, 1997; Markesbery and Ehmann, 1993**).

Il a été démontré qu'une augmentation de concentration de Fe et d'Al dans les cerveau des patients Alzheimer, est capable de stimuler la production des radicaux libres (**Alzheimer, 1907**). Le fer génère, donc, des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la

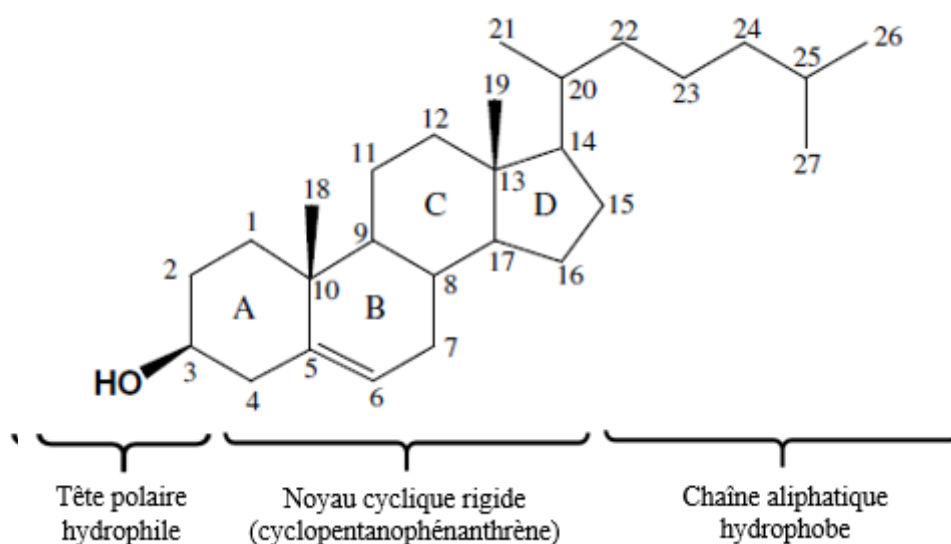
réaction de Fenton. Une forte concentration de Fe a été révélée dans le cortex, l'amygdale, l'hippocampe, et la voie olfactive des sujets Alzheimer (**Goodman, 1953 ; Thompson et al., 1988 ; Samudralwar et al., 1995**). Une étude a montré que la substance grise (cortex) des sujets Alzheimer est surchargée en Fe (467 mg/g) par rapport aux témoins (280 mg/g) (**Ehmann and Markesbery, 1986**). L'aluminium stimule la formation des ERO dans les cellules gliales murins en culture (**Evans et al., 1992**). Il a été suggéré qu'une alimentation riche en Al a conduit à une peroxydation des lipides dans le cerveau des animaux (**Fraga et al., 1990**). Il a été montré que le taux de 4-HNE est augmenté chez les patients Alzheimer cet aldéhyde a été produit lors la peroxydation lipidique dans le liquide céphalo-rachidien des patients Alzheimer (**Evans et al., 1989**). La grande réactivité du 4-HNE cause la mort cellulaire en altérant les ATPases impliquées dans le transfert ionique et dans l'homéostasie calcique (**Siems et al., 1996**). Une augmentation de la peroxydation lipidique a été remarquée au niveau du lobe temporal des patients Alzheimer où les altérations histopathologiques sont considérables (**Markesbery, 1997**). Des études ont montré la présence des produits de la peroxydation lipidique à savoir le malondialdéhyde, le peroxydinitrite, les carbonyles et les AGEs (advanced glycosylation end products) dans le cerveau des patients Alzheimer, en particulier au niveau des DNF (**Christen, 2000**).

Une augmentation de l'oxydation de l'ADN mitochondrial et nucléaire a été observée dans le cortex pariétal des patients Alzheimer en utilisant le 8-hydroxy-2-désoxyguanosine comme marqueur de l'oxydation de l'ADN. L'oxydation de l'ADN mitochondrial est de 10 fois plus élevée que l'ADN nucléaire et de 15 fois plus élevée chez les patients âgés de plus de 70 ans (**Mecocci et al., 1993 ; Mecocci et al., 1994**). L'oxydation des protéines a été augmentée dans le pôle frontal et occipital des sujets âgés et Alzheimer (**Smith et al., 1991**). Les protéines carbonyles ont été augmentées de 42% dans l'hippocampe, et de 37% dans le lobe pariétal inférieur par rapport au cervelet des patients Alzheimer (**Hensley et al., 1995**). Il a été démontré que l'A $\beta$  cause l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules neuronales de l'hippocampe (**Mattson et al., 1995**), et dans les neuroblastoma en culture (**Behl et al., 1994**). L'A $\beta$  cause aussi la peroxydation lipidique (**Butterfield et al., 1994**). C'est une source des radicaux libres, neurotoxiques pour les enzymes et les cellules. Il a été montré *in vitro* que le processus oxydatif stimule l'agrégation de l'A $\beta$  (**Dyrks et al., 1992**).

## 6. Cholestérol et neurodégénérescence

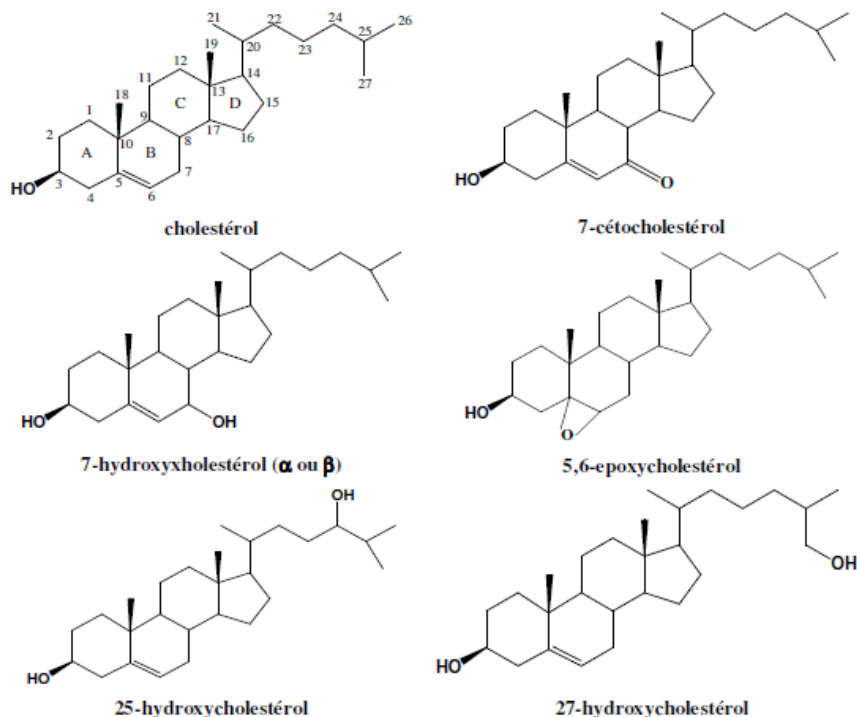
### 6.1 Structure du cholestérol et oxystérols

Le cholestérol est un composé amphiphile grâce à sa tête hydrophile et sa queue hydrophobe. Il possède 27 atomes de carbone, et il comprend un noyau tétracyclique de quatre anneaux de carbone appelés A, B, C et D, une chaîne d'isooctyle en position 17, et une fonction alcool en position 3. Le groupe hydroxyle en position 3, les deux méthyles en 18 et 19 ainsi que la chaîne d'isooctyle sont en position bêta (**Róg et al., 2009**). Les positions 5, 6 et 7 sont sensibles à l'oxydation, c'est là où elle est la plus fréquente (**Figure 30**). Les oxydations peuvent également avoir lieu sur la chaîne latérale. L'estérification du cholestérol par les acides gras qui se fait au niveau du groupement hydroxyle efface ses propriétés hydrophiles. Les cholestéryl esters ainsi formés sont la forme de stockage du cholestérol.



**Figure 30:** Structure du cholestérol

Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol formés soit par auto-oxydation (7 $\beta$ -hydroxycholestérol, 7-cétocholestérol) (**Figure 31**) (**Vejux et al., 2011**), soit synthétisés par l'intermédiaire d'une enzyme, CYP (7 $\alpha$ -hydroxycholestérol, 24(S)-hydroxycholestérol (24S-OHC), 27-hydroxycholestérol (27-OHC)), soit résultant des 2 processus. Les oxystérols sont détectés dans le sang, la bile et dans des organes comme le foie, les poumons ou le cerveau où leur présence pourrait induire un bon nombre d'effets biologiques. Les oxystérols servent de moyen d'élimination du cholestérol dans les tissus périphériques, comme le 24S-OHC dans le cerveau, ou le 27-OHC dans les macrophages (**Bjorkhem, 1994 ; Norlin, 2000**).



**Figure 31:** Structures du cholestérol et de certains dérivés oxydés (oxystérols)  
(Vejux *et al.*, 2011)

### 6.1 Stress oxydatif et oxystérols

Les oxystérols comme le 7-cétocholestérol (7KC) sont capables d'induire un stress oxydant via la production des ERO (Lemaire-Ewing *et al.*, 2005 ; Vejux *et al.*, 2009). Des études sur les oxystérols ont montré qu'une augmentation du stress oxydatif dans les promonocytes humaines U937 traités par le 7KC ou le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol a été traduite par une peroxydation lipidique, une chute du glutathion intracellulaire (Lizard *et al.*, 1999 ; O'Callaghan *et al.*, 2002) et d'une inhibition de la production de monoxyde d'azote endogène (Monier *et al.*, 2003). Il a été montré sur des cellules musculaires lisses d'aorte humaine, que le 7KC induit un stress oxydant, en activant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase (NADPH) qui est une enzyme impliquée dans la formation des ERO (Pedruzzi *et al.*, 2004). Des rats nourris d'un régime contenant une mixture d'oxystérols ont montré une augmentation du taux de la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase par rapport aux rats témoins (Vejux *et al.*, 2008). Il a été bien établi que le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol sont plus toxiques dès la concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$  (50  $\mu\text{M}$ ) (Nury *et al.*, 2014). Le 7KC et le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol, peuvent induire également la nécrose des fibroblastes (Lizard *et al.*, 1999). Le 7KC peut être incorporé dans les radeaux lipidiques des

membranes plasmiques, cela peut induire l'apoptose ou les voies de transduction du signal dans l'inflammation (Vejux *et al.*, 2009 ; Massey and Pownall, 2005). Il a été démontré sur des cellules musculaires lisses aortiques humaines, que le 7KC provoque un processus autophagique, par l'induction de la mort cellulaire associé avec la conversion de LC3-I en LC3-II (Martinet *et al.*, 2004).

### 6.2 Implication du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer

Le cholestérol est une molécule essentielle au niveau cérébral. Le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol dans le corps, il n'est donc pas surprenant qu'il contienne des oxystérols, et qu'il doit être étroitement régulé (Björkhem and Meaney, 2004 ; Ragot *et al.*, 2011). Des altérations au niveau de métabolisme de cholestérol peuvent conduire à des niveaux cérébraux anormaux des oxystérols. Cela peut contribuer à certaines maladies neurologiques, comme la MA. Chez les mammifères, 25 % du cholestérol corporel est situé dans le cerveau, bien que celui-ci ne représente que 10 % de la masse corporelle (Vance, 2005). La barrière hémato-encéphalique isole le cholestérol cérébral de la circulation sanguine. Le rôle clé des oxystérols dans la pathogenèse de la MA a été fortement pris en compte pour chercher leur implication dans la modulation, la neuroinflammation, l'accumulation d'A $\beta$ , et la mort cellulaire (Gamba *et al.*, 2015). Le 24S-OHC qui est un dérivé d'oxyde de cholestérol, pourrait constituer un biomarqueur potentiel de la MA (Jeitner *et al.*, 2011). La présence de ce composé dans le cerveau humain a été décrite pour la première fois en 1953 (Di Frisco *et al.*, 1953). Le cerveau est supposé contenir environ 80% de 24S-OHC contenu dans le corps. La concentration de 24S-OHC dans le cerveau et les glandes surrénales est de 30 à 1500 fois plus élevée que dans d'autres organes (Lütjohann *et al.*, 1996). Celui ci a été trouvé sous forme d'isomère de 24S-OHC dans le cerveau, les glandes surrénales et le plasma (Breuer and Björkhem, 1995). L'excès de cholestérol est converti en 24OHC par l'intermédiaire du 24S-hydroxylase (CYP46), une enzyme de la famille des cytochromes P-450, qui constitue la voie majoritaire d'élimination du cholestérol (Leoni and Caccia, 2013). Le CYP46A1 est une enzyme exprimée dans les neurones, y compris les neurones de l'hippocampe et du cortex, qui sont importants pour l'apprentissage et la formation de la mémoire (Russell *et al.*, 2009). Il a été rapporté que le taux de cette enzyme augmente avec l'âge et que cette modification pourrait contribuer à la détérioration cognitive chez les personnes âgées (Lund *et al.*, 1999 ; Martin *et al.*, 2008). Cette enzyme est localisée dans le réticulum endoplasmique (Mast *et al.*, 2008). Une hypothèse suggère que le



taux anormal de 24S-OHC dans le liquide céphalorachidien (LCR) et / ou dans le plasma des patients atteints de la MA pourrait être un marqueur biochimique putatif d'altération de l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau et / ou de la dégradation neuronale. Cette hypothèse a conduit à l'identification des niveaux accrus de 24S-OHC dans le LCR, dans le plasma des patients atteints de la MA et dans la démence vasculaire (**Lütjohann et al., 2000 ; Papassotiropoulos et al., 2000 ; Bogdanovic et al., 2001**). Une diminution des concentrations 24S-OHC dans le plasma des patients atteints de la MA ont été attribués à l'atrophie du cerveau, ce qui pourrait être une conséquence de la diminution des neurones métaboliquement actives (**Bretillon et al., 2000 ; Solomon et al., 2009 ; Kölsch et al., 2004 ; Zuliani et al., 2011**).

Certaines données suggèrent que le 24S-OHC inhibe la production d'A $\beta$  en modulant l'expression des gènes codant pour l'APP et la  $\beta$ -sécrétase, facilite le clivage de l'APP selon la voie non amyloïdogénique. Les cellules neuronales SH-SY5Y traitées avec 24S-OHC conduit à une augmentation nette de l'expression de l'sAPP $\alpha$  et de l' $\alpha$ -sécrétase, ainsi qu'une baisse de la régulation des activités de la  $\beta$ -sécrétase (**Famer et al., 2007 ; Prasanthi et al., 2009**). Notons que la  $\beta$ -sécrétase est située dans des radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Ceux-ci sont riches en cholestérol (**Cordy, 2006**). Il a été donc démontré qu'une augmentation de la concentration cellulaire en cholestérol semble favoriser le clivage par la  $\beta$ -sécrétase, ce qui entraîne une accumulation de peptides A $\beta$  (**Puglielli, 2003 ; Xiong, 2008**). Une autre étude a montré qu'une inhibition de l'ACAT1 conduit à une augmentation du cholestérol libre et donc une répression de la synthèse d' $\beta$ -sécrétase (**Puglielli, 2004**). L'administration de statines (agents hypocholestérolémiant) réduit le taux plasmatique de 24S-OHC et le taux intra et extracellulaire d'A $\beta$  (**Vance, 2005**). Le 27-OHC est l'oxystérol le plus abondant dans la circulation humaine (**Khatib and Vaya, 2014**). Il a été détecté dans le cerveau et il est capable de traverser la BHE. Le 27-OHC, issu de la conversion du cholestérol par la 27S-hydroxylase (CYP27A1) (**Lund et al., 2003**), a été augmenté dans le cortex frontal des patients atteints de la MA par rapport à des sujets témoins (**Heverin et al., 2004**). L'expression de CYP27A1 et les niveaux 27-OHC plasmatiques ont diminué chez les patients atteints de MA (**Brown et al., 2004 ; Kolsch et al., 2004**). Le traitement des SH-SY5Y avec 27-OHC conduit à une augmentation du niveau d'expression de protéines APP et  $\beta$ -sécrétase (**Prasanthi et al., 2009**). Il a été démontré que le taux de 27-OHC est augmenté 4 fois dans différentes régions du cortex de patients portant la mutation Suédoise APP670/671 (**Shafaati**

*et al.*, 2011). Le 27-OHC inhibe la formation d'A $\beta$  *in vitro* en augmentant l'activité de l' $\alpha$ -sécrétase et en diminuant celle de la  $\beta$ -sécrétase (Brown, 2004 ; Famer, 2007).

*In vivo*, l'une des premières études qui ont établi que le cholestérol pourrait contribuer à la production d'A $\beta$ . Cette étude a montré une augmentation de l'intensité des dépôts intracellulaires de peptides amyloïdes dans les neurones d'hippocampe de lapins nourris avec une alimentation riche en cholestérol. (Sparks *et al.*, 1994). D'autres études réalisées *in vivo* sur des souris transgéniques de MA ont montré une diminution de l'accumulation du peptide A $\beta$  après traitement par des statines (Sparks *et al.*, 2000). Cette diminution pourrait être due à une modification du clivage de l'APP. En effet, une diminution du clivage par l' $\alpha$ -sécrétase a été observée en traitant des cellules avec des taux élevés de cholestérol (Bodovitz *et al.*, 1996) alors qu'une diminution du niveau de cholestérol membranaire favorise la voie non amyloïdogène et conduit à une diminution de l'activité  $\beta$ -sécrétase (Kojro *et al.*, 2001). Chez les souris sauvages (C57BL/6), un régime alimentaire riche en cholestérol favorise une réponse neuroinflammatoire dans le cerveau (analyse immunohistochimique a révélé la présence de la microglie et les astrocytes activés dans l'hippocampe) et des dysfonctions cognitives (Thirumangalakudi *et al.*, 2008). L'implication des autres oxystérols dans la pathogenèse de la MA et en particulier leur capacité éventuelle à induire l'agrégation d'A $\beta$  a été bien établie. Il a été démontré que le 7KC facilite la localisation d'A $\beta$  dans les membranes lipidiques, tandis que le 25-OHC stimule son insertion. La cytotoxicité induite par 7KC sur les cellules neuronales est contrecarrée par 24S-OHC via l'activation de la transcription de la voie de signalisation LXR (Okabe *et al.*, 2013). Le 7KC et 7 $\beta$ -OHC résultant de l'auto-oxydation du cholestérol (Iuliano, 2011) peuvent être formés en conséquence de stress oxydatif, souvent observé dans la MA (Vaya and Schipper, 2007 ; Baarine *et al.*, 2012).

## 7. Mort cellulaire et maladie d'Alzheimer

### 7.1 Généralité

La mort cellulaire est un processus de déclin spontané et désorganisé de la vie. Elle ne pouvait résulter que d'accidents, de destructions, d'agressions de l'environnement, sans intervention pharmacologique ou génétique (Galluzzi *et al.*, 2015). On parle de mort cellulaire à partir du moment où les fonctions vitales et les réactions chimiques de son métabolisme ont cessé. La mort cellulaire est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire, au développement et à la différenciation cellulaire. Elle

est donc indispensable à la cellule pour s'adapter à un certains mécanismes, comme par exemple l'élimination des neurones en surnombre ou des cellules ayant un phénotype anormal, de même que la correction des erreurs (**Oppenheim, 1991**). Il existe trois principaux types de mort cellulaire qui sont induits de façon programmée ou qui sont activés par les stimuli de stress extracellulaire. On distingue l'apoptose (mort dite de type I), la mort cellulaire autophagique (mort dite de type II) et la nécrose (mort dite de type III) (**Kroemer et al., 2009**).

## 7.2 Apoptose

L'apoptose est un processus de mort programmée (programmed cell death ou PCD) utilisé la première fois par Kerr pour décrire une forme morphologiquement distincte de mort cellulaire (**Kerr, 2002 ; Kerr et al., 1972**). L'apoptose est une réponse à des signaux intra ou extra-cellulaires déclencheurs de mort, ou à l'absence de signaux de survie dans l'environnement de la cellule. Une cellule apoptotique subit des changements morphologiques durant ce processus, comme la diminution du volume cellulaire, condensation de la chromatine, fragmentation des noyaux et apparition de vésicules intracellulaires nommées corps apoptotiques. Ces derniers sont rapidement éliminés par phagocytose sans intervention d'un phénomène inflammatoire. Une cellule apoptotique se caractérise aussi par des modifications biochimiques : chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ( $\Delta\psi_m$ ), externalisation des résidus de la phosphatidylsérines de la membrane plasmique, fragmentation d'ADN et activation des caspases. Les caspases (de l'anglais **cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases** ou aspartic-acid-specific cystein proteases) appartiennent à la famille de protéases à cystéine intracellulaires qui interviennent dans le processus de mort cellulaire après stimulus. Typiquement le clivage des caspases est effectué au niveau des résidus aspartates. Les caspases jouent un rôle clé dans les phases d'initiation et d'exécution de l'apoptose. Elles sont présentes dans le cytoplasme sous forme de pro-caspases (zymogène) inactives (**McIlwain et al., 2016**). Lors de leur activation, elles sont clivées en deux sous-unités : une petite et une grande. Ces sous-unités forment des hétérotétramères composés de deux petites sous-unités et de deux grandes sous-unités pour donner les formes actives des caspases (**Reed, 2000**). Ce sont ces hétérotétramères qui sont actifs pour cliver les protéines. Les caspases ont été largement classées en trois groupes par leurs rôles connus dans l'apoptose: *Groupe I*: caspases initiatrices (6, 8, 9 et 10), sont impliquées dans les premières étapes de l'apoptose. *Groupe II*: caspases effectrices (caspase 2, 3, et 7), sont directement impliquées dans

l'exécution de l'apoptose et conduisent à la dégradation de la cellule (clivage des protéines) (**Kroemer et al., 2007**), et *Groupe III*: Caspases 1, 4 et 5, participent à la maturation des cytokines durant l'inflammation (clivage de pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL18) (**Amarande-Mendes and Green, 1999**). Il existe deux voies principales de signalisation aboutissant à l'apoptose:

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale: elle est activée par des signaux de stress cellulaire comme la privation de facteur de croissance, la rupture du cytosquelette, les lésions de l'ADN, l'accumulation de protéines dépliées, l'hypoxie, l'exposition à des radiations UV, l'irradiation  $\gamma$ , les altérations de l'ADN (**Brenner and Mak, 2009 ; Kroemer, 2003**). Cette voie est caractérisée par une perméabilité de la membrane interne conduisant à une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, suivie par la libération des facteurs apoptogènes séquestrés dans l'espace intermembranaire mitochondriale, parmi lesquels le cytochrome c, les caspases -2,-3,-8 et -9 ; Smac/DIABLO (« second mitochondrial activator of caspase » / « direct IAP binding protein with low pl »), l'AIF (« apoptosis-inducing factor »), et l'endonucléase G (**Parone et al., 2002**). Il est bien établi aujourd'hui que la famille de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 sont capables de former des pores dans la membrane externe mitochondriale en se complexant avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak afin de permettre la libération du Cyt-c dans le cytosol (**Korsmeyer et al., 2000**). Lorsque le cytochrome c se retrouve dans le cytoplasme, il se complexe avec l'ATP, la protéine Apaf-1 et la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome (**Li et al., 1999**). Lorsque la caspase-9 est activée, elle est donc capable d'activer à son tour les caspases effectrices comme la caspase-3 et caspase-7 (**Reed, 2000**).

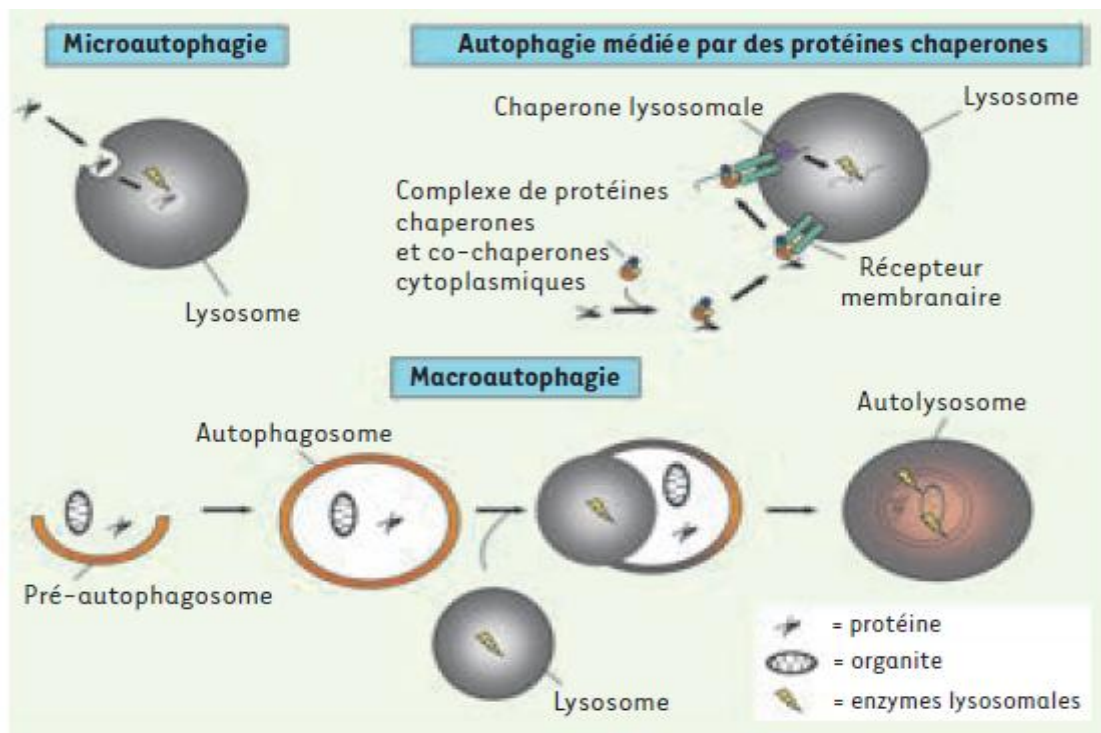
La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort: elle est déclenchée par des signaux extracellulaires livrés sous forme de ligands qui se lient à des récepteurs de mort (DRS). Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNFR) et incluent des récepteurs tels que le récepteur Fas, les récepteurs de TNF (TNFR-1, TNFR-2) et les récepteurs du TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) DR-4 et DR-5 (**McIlwain et al., 2016**). La fixation du ligand sur les récepteurs de mort induit le recrutement des protéines adaptatrices comme Fas-Associated protein with Death Domain (FADD). Ces protéines adaptatrices se lient à la caspase initiatrice (la procaspase-8) pour former le death-inducing signaling complex (DISC), via le Death effector domain (DED). Le FADD stimule l'activation de la pro-caspase-8 qui va être clivée en caspase-8. La caspase-8 activée déclenche l'activation des caspases effectrices -3, -6 et -7 (voie de Type I) (**Madema**

*et al.*, 1997). La caspase-8 ne peut pas elle-même effectuer l'apoptose, par contre elle clive la protéine Bid, ceci va initier par la suite la voie intrinsèque de l'apoptose (voie de Type II) (Reed, 2000 ; Li *et al.*, 1998).

### 7.1 Autophagie

L'autophagie, signifie littéralement : se manger soi-même, est un processus d'auto-digestion qui consiste en une dégradation de composants intracellulaires par le lysosome. Il existe trois différents types d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperones et la forme principale, la macroautophagie (Cuervo, 2004). Elle joue un rôle physiologique important dans la croissance cellulaire, la différenciation et surtout dans le maintien de l'homéostasie qui nécessite l'élimination et le remplacement continu des protéines et des organites non fonctionnels (Puyal *et al.*, 2009). L'autophagie est le principal mécanisme impliqué dans le catabolisme des protéines à longue durée de vie et des organites (mitochondries, réticulum endoplasmique, peroxysomes...). Trois formes d'autophagie (Figure 32) ont été décrites (Puyal *et al.*, 2009) :

- La microautophagie est un processus impliquant la séquestration d'une partie du cytoplasme par la membrane du lysosome directement.
- L'autophagie médiée par des protéines chaperones concerne spécifiquement les protéines qui portent une séquence précise de 5 acides aminés (KFERQ). Ces protéines sont prises en charge par un complexe formé par les protéines chaperones (hsc70) et co-chaperones (hip, hop, hsp40, hsp90 et bag1) qui les dirigent jusqu'au lysosome où un récepteur associé à la membrane lysosomale (LAMP-2A) les reconnaît et permet leur translocation dans la lumière du lysosome.
- La macroautophagie, forme la moins sélective d'autophagie, dans laquelle une portion entière de cytoplasme contenant les organites ou les protéines à dégrader sont séquestrées dans une vésicule formée de plusieurs membranes nommée autophagosome. L'origine de ces membranes n'est pas élucidée mais on parle d'un processus d'élongation d'une structure membranaire nommée « pré-autophagosome » (ou phagophore). L'autophagosome va ensuite fusionner avec un lysosome pour former un « autolysosome » dans lequel les enzymes lysosomales pourront digérer les différents constituants. Ainsi la macroautophagie génère des nucléotides, des acides aminés et des acides gras libres qui pourront être réutilisés pour la synthèse de nouvelles macromolécules et d'énergie (ATP).



**Figure 32:** Différents types d'autophagie

L'activation de l'autophagie permet également une production énergétique suffisante au maintien des fonctions vitales lors de conditions pauvres en nutriments (Puyal *et al.*, 2009). La protéine kinase mTor (mammalian target of rapamycin) est l'acteur central de la régulation et de l'induction de l'autophagie (Carrera, 2004 ; Pattingre *et al.*, 2008). Lorsque mTor est activée, elle inhibe la voie de l'autophagie, mais son inactivation permet de lever l'inhibition et donc de lancer l'autophagie. De nombreux gènes gouvernent l'autophagie. Ces 30 gènes sont indispensables pour que l'autophagie se déroule normalement. Il s'agit des gènes ATG (autophagy genes) (Ravikumar *et al.*, 2010). Leurs produits ont des fonctions très diverses. On y trouve Atg3, Atg5, Atg7, Atg10, Atg12 et Atg 8 (LC3) qui sont nécessaires à la maturation du phagophore et donc, la formation d'autophagosome. LC3 existe sous deux formes, cytosolique (LC3-I) ou associé au phagosome (LC3-II). LC3-II pourrait jouer une fonction structurale permettant l'élongation et la formation de l'autophagosome mature (Puyal *et al.*, 2009), et constitue un marqueur cellulaire pour révéler la présence d'autophagosomes (Kabeya *et al.*, 2000). Le taux de la LC3-II produite suite à un clivage subit par LC3-I, est corrélé à la formation de l'autophagosome et donc à la présence d'un processus d'autophagie.

### 7.1 Nécrose

La nécrose est un processus de mort cellulaire survenant de façon accidentelle, déclenchée par des stress non spécifiques et non physiologiques et qui ne présente pas les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose et de l'autophagie. Elle se caractérise par un gonflement des cellules, également appelée oncose, un gonflement des organites et une rupture de la membrane plasmique des cellules et à la libération dans le milieu environnant de leur contenu cellulaire, ce qui déclenche une forte réaction inflammatoire. La nécrose se traduit par un dysfonctionnement mitochondrial, une augmentation de la génération d'espèces réactives de l'oxygène, et de la déplétion intracellulaire en ATP (**Golstein and Kroeme, 2007**). Des récepteurs de mort membranaires (TNFR1, Fas/CD95 et TRAILR) ainsi que des récepteurs Toll-like (TLR3 et TLR4) sont impliqués dans l'initiation de la nécrose. Il existe également une forme programmée de nécrose : la nécroptose (**Rosenbaum et al., 2010**).

### 7.2 Types de mort cellulaire et maladie d'Alzheimer

Des preuves croissantes suggèrent que la mort cellulaire neuronale sélective dans la MA implique l'activation des caspases, qui participent de façon critique à l'apoptose par l'ouverture de voies intracellulaires et le clivage protéolytique de plusieurs protéines responsables des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose (**Dickson, 2004 ; Cribbs et al., 2004**). L'analyse post mortem de cerveaux des patients décédés de la MA, montre la présence des formes activées des caspases.

Ces résultats ont été similaires à ce qui a été observé dans les modèles in vitro de neurotoxicité d'A $\beta$  (**Rohn et al., 2001 ; Ioo et al., 1993**). Il a été aussi démontré sur ces tissus post mortem de cerveaux alzheimer, la présence des neuronaux contenant de la chromatine condensée (**Broe et al., 2001**). Une déficience dans la fusion avec le lysosome semblerait être à l'origine de l'accumulation des vacuoles autophagiques et par conséquent du défaut de l'élimination de  $\beta$ -amyloïde (**Nixon, 2007**). Une déficience de l'autophagie peut mener à une formation d'agrégats comme cela a été démontré chez les souris dont seuls les neurones n'expriment pas Atg5 ou Atg7 et qui développent rapidement des symptômes de maladies neurodégénératives avec la présence d'inclusions (**Komatsu et al., 2006 ; Hara et al., 2006**). Une altération de la dégradation des autophagosomes a été due à la réduction de l'expression de Beclin1 (protéine nécessaire à l'initiation de la formation de l'autophagosome pendant

l'autophagie) et à des taux élevés d'APP et d'A $\beta$  (**Jaeger et al., 2010**). Il a été montré qu'un traitement par la rapamycine, molécule qui participe à l'activation de l'autophagie, diminue l'agrégation de la protéine Tau (**Caccamo et al., 2010**). Des autres preuves soutiennent l'idée que les formes oligomères solubles de l'amyloïde  $\beta$ -peptide peuvent conduire à des dysfonctions neuronales et la mort dans les premiers stades de la MA. Cependant, les mécanismes moléculaires associés à l'apoptose neuronale induite par A $\beta$  solubles restent à élucider. Il a été montré sur des neurones corticaux, que les peptides A $\beta$  solubles entraînent une apoptose caspase-3, -9 et calpaïnes dépendante, impliquant un stress oxydant et une déstabilisation précoce du réseau de microtubules (MTs) (**Fifre et al., 2006 ; Saponne et al., 2003**). Il a été montré que le peptide  $\beta$ -amyloïde induisait la mort cellulaire programmée dans des neurones du cortex cérébral (**Martinou, 1995**).



# Objectifs et Modèles d'Etude



## **Objectifs et Modèles d'Etude**

Le système nerveux central est particulièrement vulnérable aux dommages des radicaux libres, en raison du taux élevé de la consommation d'oxygène dans le cerveau, de la teneur élevée en lipides, et du taux faible des enzymes antioxydantes par rapport à d'autres tissus (**Coyle and Puttfarcken, 1993**). Lors du développement de certaines maladies neurodégénératives comme la MA, une augmentation du stress oxydant est souvent observée ce qui pourrait, en partie, s'expliquer par une diminution des défenses antioxydantes liées à l'âge (**Hekimi et al., 2011**). Cette augmentation du stress oxydatif pourrait conduire à une rupture de l'équilibre RedOx et par exemple à une peroxydation lipidique incluant la formation de dérivés du cholestérol, en particulier de 7KC, pouvant exercer des effets toxiques sur les cellules du SNC, particulièrement les oligodendrocytes, et par conséquent la dégénérescence des neurones et la mort cellulaire. De même, L'Al est un métal fortement neurotoxique, capable à la fois de perturber le processus métabolique dans le cerveau et être impliqués dans la neurotoxicité. Il est largement biodisponible chez l'humain et accumulé à des concentrations plus élevées dans le cerveau. Une augmentation de concentration de l'Al dans les cerveaux des patients Alzheimer et dans les cellules gliales murins en culture, est capable de stimuler la production des radicaux libres en conduisant à une peroxydation des lipides dans le cerveau des animaux (**Evans et al., 1992 ; Fraga et al., 1990**).

Devant l'expansion des maladies neurodégénératives, et en particulier la MA, aussi bien en nombre d'individus que de pays touchés, il est judicieux de mettre en place des stratégies preventives contre cette maladie. Il n'existe aucun traitement véritablement efficace contre les maladies neurodégénératives. Des approches nutritionnelles peuvent servir de base pour fonder des stratégies préventives. A l'heure actuelle, le bénéfice des suppléments alimentaires en huile d'argan a pourtant été prouvé chez l'Homme dans la prevention de plusieurs maladies comme les maladies cardiovasculaires et l'artériosclérose, mais aucune étude n' a été mise en place pour évaluer les effets protecteurs de l'huile d'argan contre la neurodégénérescence. Il est donc, possible d'envisager une alimentation contrôlée ou fonctionnelle avec l'huile d'argan (ou certains de ces composés) afin de prévenir certaines formes de neurodégénérescences.

Afin de préciser l'intérêt de l'huile d'argan pour prévenir la neurodégénérescence, l'huile d'argan ou certains de ces composés ont été évalués sur différents modèles *in vitro* et *in vivo*. Pour réaliser cette étude, trois approches ont été mises en oeuvre :

❖ **Screening phytochimique d'extraits l'arganier**

Afin d'identifier des extraits ou des molécules capables de résoudre notre problématique, plusieurs tests chimiques ont été élaborés sur les cinq parties d'*Argania spinosa* à savoir : l'amande, pulpe, coque, feuilles et rameaux provenant de deux régions marocaines (Berkane et Agadir). Dans un premier temps, nous avons préparé trois extraits (extrait brut, extrait non lipidique et extrait hexanique) des différentes parties de la plante, quantifié leurs métabolites secondaires par des tests colorimétriques et évalué leur potentiel antioxydant par tests chimiques (DPPH, FRAP...). En ce qui concerne l'huile d'argan, une caractérisation de sa composition chimique en terme de tocophérols, stérols, acides gras et polyphénols a été réalisée en utilisant des méthodes de chromatographie en phase liquide à haute performance et la chromatographie en phase gazeuse.

❖ **Etude *in-vivo* sur des rats**

Sur un modèle animal de rat wistar, nous avons tenté d'évaluer les effets protecteurs de l'huile d'argan ainsi que la poudre d'amande d'arganier sur la toxicité induite par le chlorure d'aluminium. Au cours du traitement, nous avons effectué deux tests de comportements : labyrinthe à 8 bras et la piscine de Morris, afin de voir si le chlorure d'aluminium affecte les fonctions cognitives des rats. Après sacrifice, plusieurs tests biochimiques et histologiques ont été réalisés sur les deux zones de cerveau (cortex et hippocampe) : dosage des paramètres plasmatiques, dosage des marqueurs de stress, évaluation de l'accumulation de chlorure d'aluminium...

❖ **Etude *in-vitro* sur les cellules neuronales**

L'étude *in-vitro* a été réalisée sur les oligodendrocytes murins 158N. Sur ces cellules, nous avons étudié les effets protecteurs de deux types de l'huile d'argan (alimentaire et cosmétique) contre une cytotoxicité induite par le 7-KC. Cette étude permet de préciser d'une part les activités biologiques du 7KC sur des paramètres impliqués dans le développement des pathologies neurodégénératives : modifications mitochondriales, lysosomales, stress oxydatif, mort cellulaire par apoptose et autophagie... et d'autre part, préciser les effets protecteurs de l'huile d'argan.

**Matériels**  
**Et**  
**Méthodes**



## Matériels et Méthodes

### I. ARGANIER ET HUILES D'ARGAN

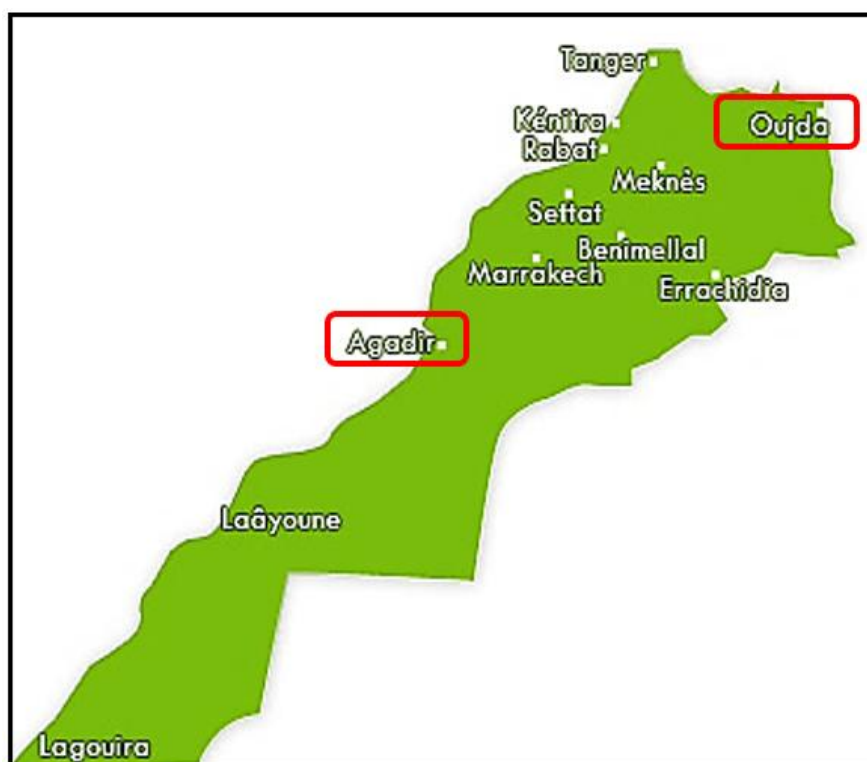
#### 1. Arganier

##### 1.1 Préparation des extraits d'*Argania spinosa*

La caractérisation des extraits d'*Argania spinosa* a porté sur les différentes parties de l'arbre à savoir : amande, coque, pulpe, feuilles et rameaux.

##### a. Récolte de la plante

Les différentes parties d'*Argania spinosa* provenant de deux régions, Berkane (Oujda, Nord-Est du Maroc), Targa (Agadir, Sud-Ouest du Maroc), ont été récoltées entre les mois de Février et Avril 2014 (**Figure 33**).



**Figure 33:** Carte du Maroc situant les régions de récolte d'arganier

##### b. Séchage

Les différentes parties d'*Argania spinosa*, fraîchement récoltées, ont été lavées et laissées sécher à l'étuve à 50°C avec ventilation, afin de préserver au maximum l'intégrité de leur composition chimique. Devenues sèches, les parties utilisées sont récupérées dans des sacs propres.

### **c. Préparation de la poudre**

Après séchage, les différentes parties d'*Argania spinosa* ont été broyées finement à l'aide d'un broyeur, puis criblées sur des tamis.

### **d. Extraction par solvant organique**

10 g de poudre sont mis à macérer avec le méthanol pendant une nuit (12 h) sous agitation douce. Le macérât est filtré sur papier filtre de type wattman N°4. Le filtrat est évaporé sous vide à sec en utilisant un rotavapeur (BÜCHI), à la température de 45-50°C, afin d'obtenir un extrait brut (EBr). 35 mL de cet extrait a été conservé pour effectuer les dosages des métabolites secondaires. Le volume restant est mélangé avec l'hexane (v/v) et après décantation, l'hexane récupéré est évaporé. L'extrait résultant est considéré comme étant la fraction lipidique (ELi). Le reste de cette fraction est considéré comme étant l'extrait non lipidique (ENL).

## ***1.2 Détermination des propriétés chimiques des extraits d'Argania spinosa***

### **a. Détermination de la teneur en eau**

La teneur en eau est déterminée selon la méthode no. 934.06. 1990, recommandée par l'association AOAC (The Association Of Analytical Communities) (**AOAC International, 1990**). 5 g d'échantillon ont été pesés à l'état frais, puis placés dans une étuve réglée à 50 °C pendant une nuit. La matière sèche est retirée de l'étuve après refroidissement dans un dessiccateur, l'échantillon séché est pesé. La teneur en eau est calculée selon la formule suivante:

$$\mathbf{H\% = ((Pf - Ps) / Pf) \times 100}$$

**Pf** : Poids de l'échantillon « plante fraîche ».

**Ps** : Poids de l'échantillon « plante sèche ».

**H %** : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

### **b. Détermination de teneur de la matière minérale**

La teneur en matière minérale est déterminée selon la méthode no. 923.03.1990, recommandée par A.O.A.C (**AOAC International, 1990**). Cette méthode consiste à calciner l'échantillon à 550 °C dans un four à moufle jusqu'à l'obtention d'une cendre blanchâtre de poids constant. 2 g d'échantillon sont pesés dans des creusets et sont ensuite placés dans un four à moufle réglé à 550 °C pendant 5 heures, jusqu'à l'obtention des cendres blanchâtres.



Les creusets sont pesés après refroidissement dans un dessiccateur. La matière organique est calculée selon la formule suivante :

$$M (\%) = ((M_i - M_f) / P) \times 100$$

Où :

**M %** : Teneur en matière organique

**M<sub>i</sub>** : Masse initiale (masse du creuset contenant l'échantillon en g)

**M<sub>f</sub>**: Masse finale (masse de creuset et des cendre en g)

**P** : Masse de la prise d'essai

#### **c. Détermination de la teneur en lipides**

La teneur en lipides est déterminée selon la méthode AOAC (**AOAC International, 1990**). 25 g d'échantillon ont été ajoutés dans les cartouches en papier filtre, puis placés sur le Soxhlet. 250 mL d'hexane ont été versés dans un ballon. Le ballon a été chauffé pendant 4 heures. Après l'élimination du solvant par distillation, le ballon est séché à une température de 70-80 °C, puis pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La teneur en matière grasse est déterminée selon la formule suivante :

$$L (\%) = ((P_2 - P_1) / P_3) \times 100$$

**P<sub>1</sub>** : poids du ballon vide (g)

**P<sub>2</sub>** : poids du ballon avec l'huile extraite (g)

**P<sub>3</sub>** : poids de la prise d'essai (g)

#### **d. Détermination de la teneur en protéine**

La teneur en protéine est déterminée selon la méthode de Kjeldhal no. 960.52. 2000, recommandée par A.O.A.C (**AOAC International, 1990**). Cette méthode est basée sur la quantification de la teneur en azote, puis la teneur en protéine est calculée en multipliant le taux d'azote total N (%) par le coefficient 6,25. Cette méthode se passe en deux étapes : La première est la phase de **digestion** qui consiste en une attaque chimique par l'acide sulfurique pour éliminer la matière organique. 1g d'échantillon a été mélangé avec 1g de catalyseur Kjeldhal (sulfate de cuivre et de potassium) et 15 mL d'acide sulfurique, le mélange a été préparé dans un matras de minéralisation en appliquant un chauffage progressif. Quand la solution devient limpide, elle est refroidie et complétée jusqu'à 100 mL avec de l'eau distillée. La deuxième étape est la **distillation** qui consiste à solubiliser l'azote minérale sous forme d'ammoniac, cette étape est réalisée dans un rotavapor en ajoutant 20 mL de soude à 35

% dans le matras et 25 % d'acide borique dans une fiole de 250 mL. L'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique. La dernière étape est la **titration**, elle a été réalisée par l'ajout de quelques gouttes de l'indicateur de TACHIRO (mélange de bleu de méthylène et rouge de méthyle) dans la fiole contenant l'ammoniac et l'acide borique. L'excès d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique 0,05 N par simple titration. La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N (\%) = (Co \times 2 \times V \times 14) / P$$

$$P (\%) = N (\%) \times 6,25$$

**N** : Pourcentage d'azote (%)

**P** : Pourcentage de protéine (%)

**Co**:Normalité de l'acide sulfurique (0.05)

**V** : Volume de l'acide sulfurique versé (mL)

**P** : Poids de la prise d'essai (g)

#### **e. Détermination de la teneur en sucre**

La teneur en sucre est calculée simplement selon la formule suivante :

$$S (\%) = 100 - (H + P + L + M)$$

**H**: Humidité (%) (= teneur en eau)

**P**: Protéine (%)

**L**: Lipide (%)

**M**: Matière minérale (%) (= teneur en cendre)

### **1.3 Dosage des métabolites secondaires des extraits d'*Argania spinosa***

#### **a. Dosage des polyphénols**

La teneur en composés phénoliques des différents extraits d'*Argania spinosa* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (**Li et al., 2007**) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) phosphomolybdique (MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Brièvement, 2,5 mL de réactif de Folin (10 fois dilué) sont ajoutés à 500 µL d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions

convenables, 2 mL d'une solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5 %) (Sigma Aldrich). Après 15 min d'incubation au bain marie à 45°C, l'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc sans extrait. La quantification des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-0,25 µg/mL) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

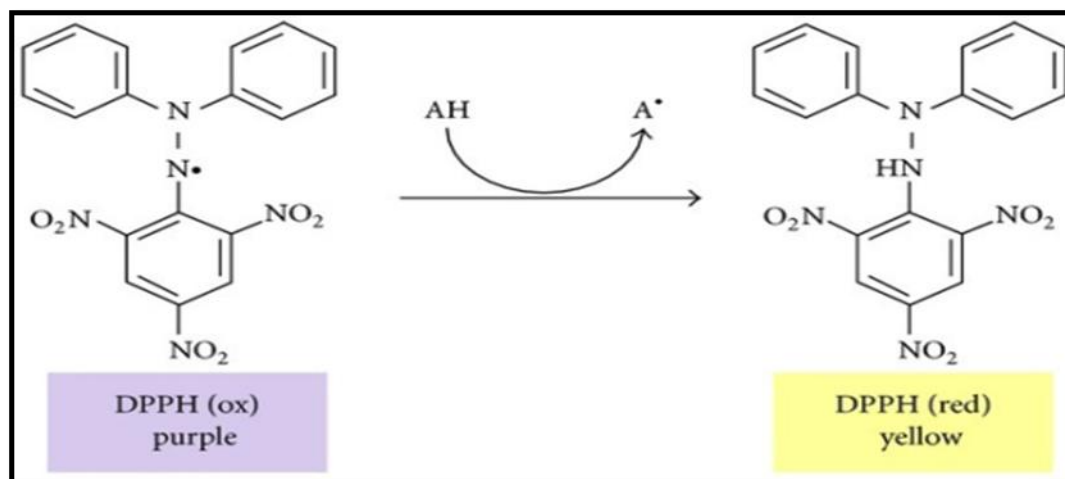
### **b. Dosage des flavonoïdes**

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée par la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium décrite par Dehpeur (**Dehpeur *et al.*, 2009**). Pour cela, 500 µL de chaque extrait à analyser sont ajoutés à 1500 µL de méthanol à 95 % (Sigma Aldrich), 100 µL de AlCl<sub>3</sub> à 10 % (m/v) (Sigma Aldrich), 100 µL d'acétate de sodium (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich), 1 M et 2,8 mL d'eau distillée. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 415 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-0,3 µg/mL) et elle est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g MS). Afin de quantifier et comparer les flavonoïdes, une droite d'étalonnage ( $y = ax + b$ ) a été réalisée avec la quercétine dans les mêmes conditions opératoires (concentrations) que les échantillons.

## ***1.4 Potentiels antioxydants des extraits d'arganier***

### **a. Test antioxydant par DPPH**

Pour étudier l'activité anti-radicalaire de nos différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le diphényl picryl-hydrate (DPPH) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par (**Huang *et al.*, 2011**) (**Figure 34**).



**Figure 34:** Principe du test DPPH. La forme libre du DPPH (diphényl picryl-hydrayl) de couleur violette sera réduite par les antioxydants en DPPH (2,2-diphényl picryl-hydrazine) en couleur jaune.

Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le DPPH 2,2-diphényl picryl-hydrazine ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) (Sigma Aldrich), dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu. La solution de DPPH est solubilisée dans du méthanol absolu (0,2 mM). 2,5 mL de l'extrait à tester ont été ajoutés à 0,5 mL de la solution de DPPH. Après agitation du mélange par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à température ambiante pendant 30 min. La lecture est effectuée par mesure de l'absorbance à 517 nm par spectrophotomètre. Le contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH. La concentration de DPPH est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec le Trolox (2,5-160 mg/mL).

L'activité anti-radicalaire (AAR) a été calculée en pourcentage de la décoloration du DPPH en solution dans le méthanol.

$$\text{AAR \%} = [(\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon}) / \text{Abs}_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

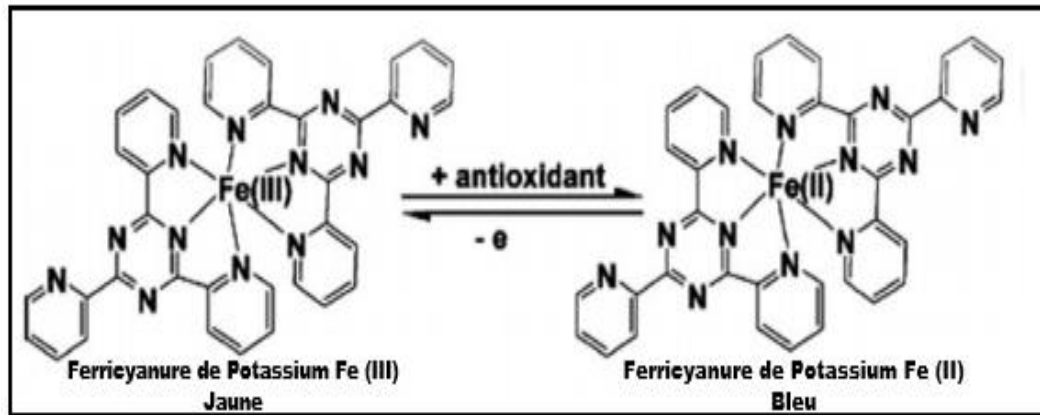
Soit:

**AAR:** Activité Anti-radicalaire

**Abs:** Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

### b. Pouvoir antioxydant du fer FRAP

Le pouvoir réducteur du fer dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (Oyaizu *et al.*, 1986). Elle est basée sur la réduction du fer ferrique en fer ferreux par les antioxydants qui donnent la couleur bleue (Figure 35).



**Figure 35:** Réduction du fer ferrique de couleur jaune par les antioxydants en fer ferreux de couleur bleue (Test FRAP)

1 mL de l'extrait ou du standard Trolox est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1 %. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 1000 g pendant 10 min. 2,5 mL du surnageant sont mélangés avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de  $FeCl_3$  (Chlorure ferrique) à 0,1 %. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). La concentration de FRAP est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la Trolox (2,5-160 mg/mL). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton *et al.*, 1965). Le pouvoir réducteur des extraits est représenté en mg Trolox par g de matière sèche (mg Trolox /g MS). Il est calculé par la réaction suivant :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{700} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{700} \text{ échantillon})}{\text{Abs}_{700} \text{ contrôle}} \times 100$$

## 2. Huile d'Argan

### 2.1 Préparation de l'huile d'argan

L'huile d'argan alimentaire et cosmétique utilisées pour le traitement des cellules et des rats proviennent de deux régions : Berkane (Oujda, Nord-Est du Maroc), Targa (Agadir, Sud-Ouest du Maroc). Elles sont extraites en 2014 à partir des amandes de fruit d'arganier. L'extraction de l'huile d'argan alimentaire s'effectue d'une manière artisanale traditionnelle à partir des amandons torréfiés, alors que l'huile d'argan cosmétique est extraite à partir des amandons non torréfiés (El manfalouti *et al.*, 2010 ; Charrouf and Guillaum, 2007).

#### a. Récolte des fruits d'argan :

Lorsque les fruits arrivent à maturité, ils sont récoltés par les femmes et les hommes berbères dans les arganeraies ; souvent c'est toute la population du village qui y participe. Les fruits sont ensuite séchés au soleil pour faciliter la prochaine étape de production traditionnelle.

#### b. Extraction traditionnelle :

L'extraction de l'huile d'argan est réalisée par les femmes d'une manière très artisanale. Quand les fruits sont mûrs, ils sont soigneusement débarrassés de leur pulpe (dépulpage), cette dernière est mise au rebut. Les noyaux sont écrasés manuellement par les femmes à l'aide des pierres tout en les tenant entre le pouce et l'index (concassage). Les amandes ainsi séchées, sont ensuite torréfiées dans des plats en terre chauffés sur un feu doux (**Figure 36**).



**Figure 36:** *Etapes d'extraction traditionnelle de l'huile d'argan*

**A:** Dépulpage des fruits, **B:** Concassage des noix, **C:** Torréfaction traditionnelle

Les amandes grillées sont refroidies et moulues à l'aide d'une meule manuelle (trituration), donnant une pâte onctueuse de couleur brune, qui est malaxée avec de l'eau chaude pendant plusieurs minutes (malaxage). La pâte est ensuite pressée avec les mains

jusqu'à ce qu'elle devienne dure et libère de l'huile sous forme de gouttelettes qui est laissée reposer jusqu'elle devient limpide et de couleur brunâtre (pressage), elle présente un goût de noisette. Le résidu d'extraction (tourteau) est très amer, riche en huile, il est utilisé pour nourrir le bétail (**Figure 37**).



**Figure 37:** *Etapes d'extraction traditionnelle de l'huile d'argan*

**D:** Trituration; **E:** Malaxage; **F:** Pressage manuel

En ce qui concerne l'huile d'argan cosmétique, l'extraction suit les mêmes étapes citées auparavant. La récupération des amandes est inchangée. Ce sont les étapes suivantes du processus, les plus pénibles à faire manuellement, qui ont été mécanisées. Les amandes ne sont pas grillées et on obtient une huile de couleur jaune-or dite « pressée à froid ». La fabrication n'est faite que par des procédés mécaniques, sans adjonction de produits chimiques ou même d'eau. L'huile est ensuite décantée, filtrée puis mise en bouteille.

## **2.2 Etude de la composition chimique de l'huile d'argan**

### **a. Analyse des phytostérols**

La matière insaponifiable a été déterminée en utilisant la méthode modifiée de **Mounts, Abidi and Rennick, (1996)**. La fraction insaponifiable a été déterminée en saponifiant 50 mg de l'huile avec 5 mL de la solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (1 N) (Merck, Darmstadt, Allemagne) et 25  $\mu$ L de la solution de cholestanol (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Celle-ci a été mise dans un flacon et utilisée comme étalon interne. Le mélange est laissé à réagir pendant une nuit à température ambiante. Après addition de 10 mL d'eau distillée et 10 mL de dichlorométhane (Fluka, Ridelde Haën, Suisse), le mélange a été mélangé vigoureusement et centrifugé à 3000 tours/min pendant 3 min. La fraction organique a été transférée dans deuxième flacon. La matière insaponifiable est extraite deux fois avec du dichlorométhane (10 mL). Les extraits de dichlorométhane ont été lavés avec de l'eau distillée (5 mL) jusqu'à neutralité. Le solvant est ensuite évaporé à sec

sous un courant de N<sub>2</sub> à 40 °C. Les analyses ont été effectuées en triplicate. Les dérivés de stérol (TMS) ont été préparés selon **Park and Adiss, (1985)**. Après élimination du dichlorométhane, le résidu a été mélangé avec 300 µL de bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA) (avec 1% triméthylchlorosilane) (TMCS) (Pierce, Rockford, IL, USA) et 50 µL de pyridine (Sigma, L'Isle D'Abeau, France). Le mélange a été chauffé à 60 °C pendant 30 min. Les stérols 4-desméthyl, alcools triterpéniques, 4-monométhyle stérols et stanols ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse - couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG FID). Le système de CPG utilisé est un Hewlett-Packard HP-4890D équipé d'un DB-5MS, fusionné à une colonne capillaire de silice (30 m x 0,25 mm d'épaisseur de film de 0,25 µm de diamètre interne). La température de la colonne a été maintenue constante à 50 °C pendant 1 min, portée à 290 °C à 20 °C / min. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à une pression d'entrée de 120 kPa. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont à 290 °C. Le rapport de division est 1: 20. La quantification des phytostérols et phytostanols a été obtenue par addition de cholestanol comme étalon interne. La quantité de chaque stérol a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{La quantité en mg/100g d'huile} = (\text{PA}_s \text{ m}_{is} / \text{PA}_{is} \text{ m}_s) \times 100$$

Avec

$\text{m}_{is}$  = masse (mg) de l'étalon interne

$\text{m}_s$  = masse (mg) de l'huile analysée

$\text{PA}_s$  = aire de pic de stérol

$\text{PA}_{is}$  = aire de pic de l'étalon interne

#### - *Identification des stérols*

L'identification des stérols 4-desméthyl, alcools triterpène, stérols 4 monométhyliques et stanols a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CPG--SM). L'analyse CPG-SM utilise un spectromètre Shimadzu GC-2010 couplé à un quadripôle (Shimadzu France, Marne la Vallée), et équipé d'un DB-5ms fusionné à une colonne capillaire de silice (30 mx 0,25 mm d'épaisseur de film id 0,25 µm ; Varian, Les Ulis, France). Les conditions de l'analyse étaient les mêmes que celles utilisées pour l'analyse par CPG. La température de la colonne a été maintenue à 50 °C pendant 1 min, portée à 290 °C à 20 °C / min. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 1 mL / min. L'injection (1 µL) a été effectuée en mode splitless. L'injecteur et le détecteur sont maintenus à 290 et 200 °C, respectivement. L'impact électronique d'ions positifs (EI) et les spectres de masse ont été



enregistrés à l'énergie d'ionisation de 70 eV. La ligne de transfert fonctionne à 290 ° C. Les spectres ont été comparés à ceux de la bibliothèque interne de l'INRA (INRA, 2004). Ils ont été confirmés avec NIST Mass Spectral Bibliothèque et avec la littérature (Nasri *et al.*, 2013). Les analyses ont été effectuées en triplicate.

### **b. Analyse des tocophérols**

Les huiles d'argan ont été stockées à 4 °C jusqu'à l'analyse. Elles ont été analysés entre 6 et 12 mois après avoir été obtenues.

#### **- Préparation des standards**

$\alpha$ -tocophérol (0,5- 40  $\mu$ g),  $\gamma$ -tocophérol (1-25 pg) et  $\delta$ -tocophérol (0,1-2  $\mu$ g) ont été injectés dans le système HPLC, chaque standard était dissous dans 1 mL de la phase mobile HPLC: acétonitrile / méthanol contenant 50 mM d'acétate d'ammonium / eau / dichlorométhane (700: 150: 50: 100 v / v / v / v). L'équation de régression linéaire pour chaque courbe d'étalonnage a ensuite été obtenue en rapportant les quantités des standards injectés à la surface du pic. L'équation de régression et le coefficient de corrélation ( $r^2$ ) ont été calculés en utilisant le logiciel ChromNav (JASCO).

#### **- Extraction et analyse des tocophérols**

Les extractions et analyses de tocophérols ont été réalisées sur la plateforme lipidomique de l'INRA de Dijon (France). 40 mg d'huile ont été suspendus dans 1 mL de solution de la phase mobile utilisée en chromatographie liquide haute performance (HPLC) : acétonitrile / méthanol, contenant 50 mM d'acétate d'ammonium / eau / dichlorométhane (700 : 150 : 50 : 100 v / v / v / v). Le mélange est agité au vortex pendant 30 s. 80  $\mu$ L de l'échantillon ont été injectées dans le système HPLC pour l'analyse des tocophérols. L'appareil de HPLC utilisé est un Jasco PU-1580 Plus intelligent pump, équipé d'un système d'injection automatique AS300 (Thermo Finnigan, les Ulis, France) et un Jasco MD-1510 Plus multi-longueur d'onde détectrice (JASCO International Co., Ltd., Japon). Les analyses HPLC ont été effectuées en utilisant RP HPLC avec une colonne Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm, taille des particules 5  $\mu$ m) et une colonne VIDAK C18 (250 x 4,6 mm id, 5  $\mu$ m taille des particules). Les conditions analytiques étaient basées sur celles rapportées par Lyan *et al.* (2001) avec quelques modifications: système de solvant isocratique; acétonitrile / méthanol à 50 mM d'acétate d'ammonium / eau / dichlorométhane (700: 150: 50: 100 v / v / v / v), débit = 2 mL min<sup>-1</sup>, et détection à 298 nm pour les tocophérols. L'identification des tocophérols a été assurée en

comparant les temps de rétention et le spectre d'absorption des pics inconnus avec ceux des étalons de référence de chromatographie et avec les standards  $\alpha$ ,  $\gamma$ , les  $\delta$ -tocophérol.

### **c. Analyse du profil des acides gras**

Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme lipidomique de l'INRA de Dijon (France). Les lipides ont été extraits à partir de différentes huiles selon le procédé de **Moilanen and Nikkari, (1981)**. C19:0 a été utilisé comme étalon interne. Les lipides ont été transmethylés en utilisant du trifluorure de bore dans du méthanol selon **Morrison and Smith, (1964)**. Les esters méthyliques des acides gras ont ensuite été extraits avec de l'hexane et analysés par CPG sur une machine Hewlett Packard Modèle 5890 (Palo Alto, CA, USA) en utilisant une colonne CP-88 SIL (100 mx 0,25 mm id, l'épaisseur du film de 0,20 mm, Varian, Les Ulis, France), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur (pression d'admission, 210 kPa). La température du four a été maintenue à 60 °C pendant 5 min, augmentée jusqu'à 165 °C à 15°C / min et maintenue pendant 1 min, puis à 225 °C à 2 °C / min et finalement à 225 °C pendant 17 min. L'injecteur et le détecteur sont maintenus à 250 °C. Les ester méthylique des acides gras ont été identifiés par comparaison avec des étalons commerciaux et synthétiques (Sigma Aldrich). Les données ont été traitées en utilisant le logiciel EZChrom Elite (Agilent Technologies, Massy, France) et reportés comme mg g<sup>-1</sup> de lipides totaux.

### **d. Analyse du profil des polyphénols**

3 g de l'huile ont été dissous dans 6 mL d'éther de pétrole 40-60%, puis ont été purifiés sur une cartouche SPE de silice (préalablement conditionnée par 6 mL d'éther de pétrole 40-60%). La cartouche est ensuite lavée avec 12 mL d'éther de pétrole 40-60%, et séchée sous atmosphère d'azote pendant 10 min. Les composés polyphénoliques ont été élués avec 8 mL d'un mélange méthanol / eau distillée 80/20 v/v, puis avec 8 mL d'acétonitrile. L'éluat est évaporé à sec sous pression réduite à 50 °C. Le résidu est repris dans 1 mL d'un mélange méthanol / eau distillée 60/40. L'extrait obtenu est filtré à travers une membrane en nylon de 0,45  $\mu$ m. L'analyse des polyphénols est effectuée par HPLC, appareil Perkin Elmer 200, équipé d'un injecteur automatique, une pompe quaternaire, un four à colonne à effet Peltier, et un détecteur DAD. L'analyse par HPLC a été réalisée en utilisant une RP HPLC avec 100 Lichrospher RP-18 colonne (150 x 4,6 mm de diamètre, la taille des particules 5  $\mu$ m, Merck).

Les conditions d'analyse :

- Le solvant A: Eau distillée, ajustée à pH 2,2 avec de l'acide trifluoroacétique (ATF).
- Le solvant B: Acétonitrile.
- Gradient de solvant: 0 à 5 min de solvant A à 100% et de 5-50 min avec 100% de solvant à 40%.
- Débit: 1 mL / min.
- Température de la colonne: 27 °C.
- Injecteur: 20 µl
- Détection 280 nm, 345 nm, les spectres UV-Visible.
- Courbe standar: 25 à 400 µg de quercétine/L.

Les résultats sont exprimés en équivalents de quercétine mg pour 100 g d'huile. Le temps de rétention et les spectres UV-visible de la molécule détectée sont comparés à notre bibliothèque de composés polyphénoliques.

#### **e. Test KRL (Kit radicaux libres)**

Ce test permet l'évaluation de la résistance globale du sang soumis à une attaque radicalaire. Les défenses antioxydantes intra- et extra-cellulaires contribuent au maintien de l'intégrité membranaire et des fonctions cellulaires jusqu'à la lyse des globules rouges. Ce test biologique permet donc, une mesure dynamique du potentiel global de défense antiradicalaire d'un individu. A l'aide de ce test, nous pouvons également déterminer *in vitro*, dans des conditions biologiques, la capacité antioxydante des huiles (Pieri *et al.*, 1996 ; Rossi *et al.*, 2013). L'oxydation des globules rouges par l'oxygène moléculaire a été effectuée dans une suspension aqueuse en utilisant le composé 2,2'azobis (2-méthyl-propionamide) dihydrochloride (AAPH ; Sigma-Aldrich) comme initiateur de radicaux libres, sans ou avec les différentes huiles.

La résistance globale du sang témoin à l'attaque radicalaire en présence ou non du produit AAPH est exprimée par le temps au bout duquel 50% des cellules sanguines sont lysées (T 1/2 en min). Les résultats sont standardisés en équivalents de mmol Trolox / mole d'huile (analogue hydrosoluble de la Vitamine E) et/ou en équivalent de mmol d'acide gallique par quantité d'huile ce qui permet une comparaison entre les huiles.

La lyse des cellules a été enregistrée en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits en mesurant la décroissance de la densité optique à 450 nm. Pour chaque puits, des mesures d'absorbance ont été effectuées 75 fois, une fois tous les 150 s (**Erosi et al., 2013**). La même analyse a été effectuée sur l' $\alpha$ -tocophérol (VitE), afin de comparer les activités antioxydantes de ces deux molécules à celles de différentes huiles.

## **II. MODELE CELLULAIRE**

### **1. Lignée cellulaire**

Les cellules 158N sont des oligodendrocytes murins (**Ghandour et al., 2002 ; Baarine et al., 2009**), immortalisés par l'antigène T du virus SV40 à partir de culture primaires mixtes de cerveaux souris mâles sauvages Tabby (Ta/Y). Ces cellules présentent les caractéristiques d'oligodendrocytes différenciés (expression des protéines de myéline).

### **2. Culture des cellules**

Les cellules 158N sont entretenues dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Lonza, Bale, Suisse). Ce milieu de base contient des nutriments indispensables à la survie cellulaire, des ions minéraux, des cofacteurs, des vitamines, des acides aminés et du glucose. Il est supplémenté avec 5% de Sérum de Veau Foetal (SVF) (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Allemagne), décomplémenté par chauffage pendant 30 min à 56°C, qui apporte les facteurs de croissance indispensables. Pour éviter d'éventuelles proliférations bactériennes, 1 % d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline (100 U/ml) - streptomycine (100U/mL) (Pan Biotech GmbH) est ajouté au milieu de culture. Lorsque le tapis de culture arrive à confluence, les cellules sont décollées grâce à l'action combinée de la trypsine (0,5 mg/mL) et d'EDTA (0,2 mg/mL) (Pan Biotech GmbH) .

Ces cellules sont rincées avec 2 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) sans calcium et magnésium pour supprimer toute trace d'inhibiteurs de trypsine. Ensuite, 2 mL de trypsine sont ajoutés par boîte de Pétri (100 x 20 mm style, BD Biosciences), puis placées à 37°C pendant 3 min. Une fois les cellules décollées, l'action de trypsine est arrêtée par l'ajout de milieu de culture complet, puis les cellules sont récupérées par centrifugation (250 g pendant 5 min). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu de culture complet frais puis les cellules sont comptées sur cellule de Malassez.

### 3. Traitement des cellules

Les cellules 158N sont ensemencées à une densité de 240 000 cellules par puits en plaque 6 puits (2 mL de milieu de culture), 120 000 cellules par puit en plaque de 12 puits (1 mL de milieu de culture) et de 600 000 cellules par boîtes de Pétri (60 x 15 mm style, BD Biosciences) (5 mL de milieu de culture). La concentration initiale en 7-cétocholestérol et phytostérols (800 µg/mL = 2 mM) a été préparée comme suit : 1 mg (7-cétocholestérol, spinastérol, schotténol) + 50 µL d'éthanol absolu + 1,2 mL de milieu de culture (DMEM) supplémenté avec 5 % SVF et 1 % d'antibiotiques. Le 7-cétocholestérol (7KC) a été utilisé comme molécule de référence pour induire la mort cellulaire sur les cellules 158N (**Nury et al., 2014**). L'acide férulique a été préparé à la même concentration (2 mM) dans le milieu de culture complet.

Le traitement des cellules 158N pour différents tests a été réalisé comme suit: Après 24 h d'ensemencement des cellules dans des plaques de 12 puits, les cellules ont été cultivées pendant 24 h en présence de différentes concentrations de phytostérols (schotténol, spinastérol) et d'acide férulique (5; 10; 20; and 40 µM) et en présence de 7KC (5; 10; 20; and/or 40 µg/mL : 12,5; 25; 50; 100 µM) (**Badreddine et al., 2015**).

Après 24 h d'ensemencement des cellules 158N en plaques 6 puits, les cellules ont été cultivées pendant 24 h en absence ou en présence de 7KC (25 µM: 10 µg/mL) associé ou non à deux types d'huile d'Argan : alimentaire (Berkane, Agadir) et cosmétique (Berkane) (1 %) et ou à l' $\alpha$ -tocophérol (400 µM) (Sigma Aldrich). Les huiles d'argan (alimentaire et cosmétique) et l' $\alpha$ -tocophérol ont été mis en présence des cellules 2 h avant le 7KC.

Le chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich) a été préparé dans l'eau distillée et filtrée sur filtre Millipore de diamètre 0,4 µm afin d'obtenir une solution stérile. Le chlorure d'aluminium a été pesé afin d'obtenir une concentration de 30 mM.

Le traitement des cellules avec le chlorure d'aluminium a été réalisé comme suit : après 24 h d'ensemencement des cellules 158N en boîtes de Petri de 60 x 15 mm, les cellules ont été cultivées pendant 24 h en absence ou en présence de différentes concentrations de chlorure d'aluminium (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µM) diluées dans du milieu DMEM supplémenté avec 5 % SVF et 1 % d'antibiotiques, associés ou non aux phytostérols (schotténol et spinastérol : 10 µM), acide férulique (10 µM), vitamine E (400 µM) et huiles d'argan (1%) (alimentaire et cosmétique)

#### **4. Analyse de la morphologie cellulaire**

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

La morphologie des cellules 158N a été étudiée en plaques 6 puits après 24 h de traitement par 7KC à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Axiovert 40CFL, Zeiss) équipé d'une caméra AxioCam utilisée pour digitaliser les images.

##### ***4.2 Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342***

La coloration avec le Hoechst 33342 est utilisée pour distinguer entre mort cellulaire par apoptose ou par nécrose (**Lizard *et al.*, 1995**). Au cours de l'apoptose, les cellules mortes se caractérisent par des noyaux condensés et /ou fragmentés alors que les cellules nécrotiques en fonction de leur progression dans le processus de nécrose ont soit des noyaux gonflés (cellules oncotiques), soit des noyaux recroquevillés, plus petits aux contours diffus. En revanche, les cellules vivantes ont des noyaux ronds et réguliers. Les cellules 158Nensemencées et traitées pendant 24 h avec 7KC ont été collectées par trypsination, fixées avec du PFA 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Après lavage en PBS, les cellules sont incubées avec du Hoechst 33342 à 2 µg/mL pendant 5 minutes puis lavées et « cytospinées » (Cytospin, Shandon/Thermo Scientific) à 1500 tours/minute pendant 5 minutes. Le montage lame / lamelle est effectué avec du « mounting fluorescent medium » (Dako); les lames sont stockées à + 4°C. Les cellules colorées au Hoechst 33342 sont observées sous Ultra-violet (UV) à l'aide d'un microscope droit à fluorescence (Axioskop, Zeiss). 300 noyaux sont comptés par lame pour déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques.

#### **5. Effet sur la viabilité cellulaire**

Afin d'évaluer l'effet de 7KC sur la viabilité et la prolifération des cellules 158N plusieurs méthodes complémentaires ont été utilisées.

##### ***5.1 Numération cellulaire en présence de bleu trypan***

Le bleu de trypan est connu pour être un colorant vital qui colore les tissus ou les cellules mortes en bleu. Il permet de faire une estimation de la proportion des cellules viables dans une population donnée. Le bleu de trypan a tendance à entrer dans toutes les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule entraîne un mécanisme d'exclusion, qui

va éjecter cette dernière dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi une cellule vivante expulsera le bleu de trypan et restera réfringente (blanche) au microscope, alors qu'une cellule morte sera colorée en bleu. Le bleu de trypan colore la cellule seulement si la membrane cellulaire est endommagée.

Après culture et traitements des cellules, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récupérées et centrifugées à 300 g pendant 5 min. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de milieu de culture. La coloration au bleu de trypan a été réalisée en prélevant 50 µL de suspension cellulaire mis en présence de 50 µL de la solution de Bleu trypan. Le comptage a été réalisé à l'aide d'une cellule de comptage de Malassez.

### ***5.2 Quantification des cellules adhérentes par coloration au crystal violet***

Après culture et traitements des cellules 158N, les surnageants contenant les cellules mortes sont éliminés et le tapis cellulaire est rincé une fois au PBS pour éliminer les cellules non adhérentes. 500 µL de la solution de crystal violet (Crystal Violet 0,5%, méthanol 25 %) (Sigma Aldrich) est alors ajoutée sur les cellules adhérentes pendant 5 minutes. Plusieurs lavages sont réalisés avec de l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de crystal violet. Les cellules sont alors séchées, incubées dans une solution de citrate de sodium 0,1 M dans de l'éthanol 50 %. Après 10 min d'incubation sous agitation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 570 nm avec un spectrophotomètre lecteur de plaques (MRX Revelation, Dynex Technologies).

### ***5.3 Evaluation de la mortalité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium***

L'intégrité de la membrane cytoplasmique peut être évaluée par coloration à l'iodure de propidium (IP) et analysée par cytométrie en flux. L'IP est un agent fluorescent intercalant des acides nucléiques (ADN ; ARN). Il est utilisé pour quantifier la viabilité cellulaire ; il ne colore que les acides nucléiques des cellules mortes et/ou ayant perdu leur intégrité membranaire. C'est une sonde hydrophile qui ne rentre que dans les cellules ayant une membrane plasmique altérée. L'IP s'excite à 305 et 538 nm et il émet une fluorescence orange/rouge avec un maximum d'émission 617 nm. La solution mère d'IP est préparée dans de l'eau milliQ à la concentration de 1 mg/mL. Cette solution est stockée à +4°C à l'abri de la lumière. Après 24 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été collectées par trypsination et resuspendues dans une solution d'IP à 1 µg/mL dans le PBS. Après une

incubation de 15 min à 37°C, les cellules sont analysées par cytométrie en flux sur un cytomètre équipé d'un laser bleu émettant à 488 nm à la puissance de 15 mW en prenant en compte 10 000 cellules. La fluorescence de l'IP a été sélectionnée par un filtre passe-bande  $590 \pm 20$  nm. Les données ont été analysées avec le logiciel Flowjo (Tree Star Inc.). Le pourcentage de cellules mortes correspond au pourcentage de cellules IP positives.

## **6. Effet sur l'activité mitochondriale des cellules 158N**

### ***6.1 Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par coloration au 3,3' dihexyloxacarboyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3))***

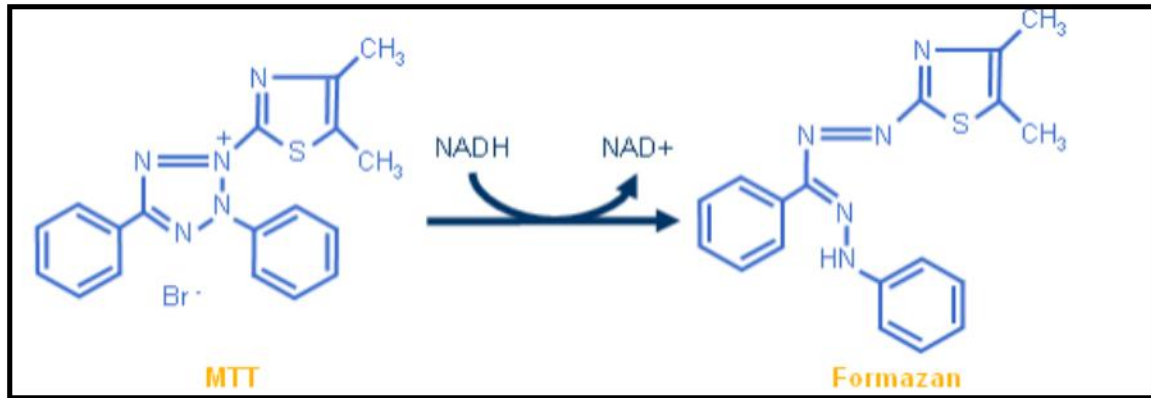
Une différence de potentiel existe de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Cette différence est créée par les pompes à protons qui créent un gradient électrochimique ( $\Delta\Psi_m$ ) entre l'espace inter-membranaire et la matrice provoquant une polarisation entre les deux faces de la membrane interne. La mesure de  $\Delta\Psi_m$  est largement utilisée pour caractériser l'activité métabolique mitochondriale et la mort cellulaire à un stade précoce. Le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) a été mesuré par coloration au DiOC<sub>6</sub>(3) et analysé par cytométrie en flux. Le DiOC<sub>6</sub>(3) ( $\lambda_{Ex\ Max} = 488$  nm;  $\lambda_{Em\ Max} = 501$  nm) est un fluorochrome cationique, lipophile; son accumulation dans la mitochondrie dépend du  $\Delta\Psi_m$  et l'intensité de sa fluorescence est inversement proportionnelle au  $\Delta\Psi_m$ .

Pour effectuer la coloration en présence de DiOC<sub>6</sub>(3), les cellules sont mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution mère de DiOC<sub>6</sub>(3) est préparée dans du DMSO à une concentration de 1 mM. Cette solution est par la suite diluée dans de l'eau distillée à une concentration de 20  $\mu$ M et utilisée sur les cellules dans le milieu de culture à la concentration finale de 40 nM. Après 15 min d'incubation à 37°C, l'analyse est réalisée extemporanément par cytométrie en flux en prenant en compte 10 000 cellules. Le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées correspond au pourcentage de cellules DiOC<sub>6</sub>(3) négatives est quantifiée sur une échelle logarithmique de fluorescence en utilisant le logiciel FlowJo.

### ***6.2 Mesure de l'activité mitochondriale et/ou de la prolifération cellulaire par le test MTT***

Le test MTT donne une indication sur l'activité mitochondriale et la densité cellulaire. Le principe du test MTT consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale.





**Figure 38:** Réaction de réduction du MTT en bleu de formazan, catalysée par la succinate-déshydrogénase en présence du coenzyme (NAD) (Test MTT)

La succinate déshydrogénase par coupure du cycle tétrazolium transforme le MTT (3 [4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium bromure), de couleur jaune, en cristaux de bleu de formazan de couleur pourpre et insoluble (**Figure 38**). La membrane des cellules est imperméable aux cristaux de formazan conduisant ainsi à leur accumulation intracellulaire. L'addition d'un détergent solubilise les cristaux de formazan.

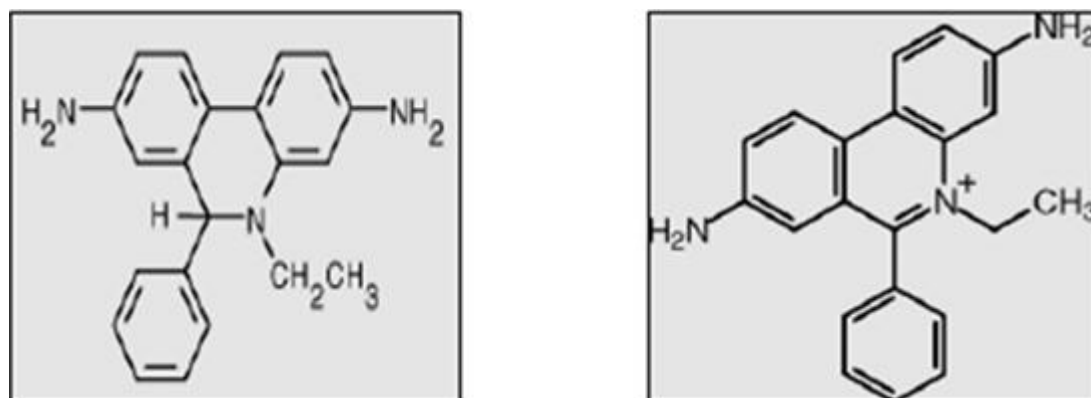
Après 24 h du traitement, le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en présence d'une solution de MTT (0.05 mg/mL) diluée dans du milieu DMEM complet à raison de 2 mL/puits pendant 3 h à 37°C. La solution de MTT a ensuite été éliminée et les puits ont été rincés deux fois avec du PBS. Les cristaux de formazan insolubles formés ont été dissous dans la solution de DMSO puis l'absorbance a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque (MRX Revelation, Dynex Technologies). L'activité succinate déshydrogénase est déterminée par rapport à celle des cellules contrôles.

## 7. Effet sur stress oxydatif

### 7.1 Evaluation de la production d'anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux

L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) intracellulaire peut être détecté par coloration à la dihydroéthidine (DHE). La DHE est un composé non fluorescent pouvant diffuser à travers la membrane cytoplasmique et qui, sous l'action de  $O_2^{\bullet-}$ , s'oxyde rapidement en éthidium fluorescent ( $\lambda_{Excitation\ Max} = 488\ nm$ ;  $\lambda_{Emission\ Max} = 575\ nm$ ) (**Figure 39**). L'éthidium va ensuite se fixer de façon covalente au niveau des bases de l'ADN (**Rothe et al., 1990**). Ceci permet sa rétention dans la cellule et donc sa détection par cytométrie en flux. Les cellules ont été trypsinées et mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution mère de DHE a été

préparée dans du DMSO à une concentration de 1,6 mM. Cette solution est par la suite utilisée sur les cellules à la concentration finale de 2  $\mu$ M. Après 15 min d'incubation à 37°C, l'analyse est réalisée par cytométrie en flux sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence de l'éthidium produit est collectée par un filtre « passe bande »  $590 \pm 20$  nm est mesurée sur une échelle logarithmique de fluorescence en prenant en compte 10 000 cellules. Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo.



**Figure 39:** *Oxydation de DHE en HE sous l'action de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )*

### 8. Coloration des lysosomes par l'acridine orange

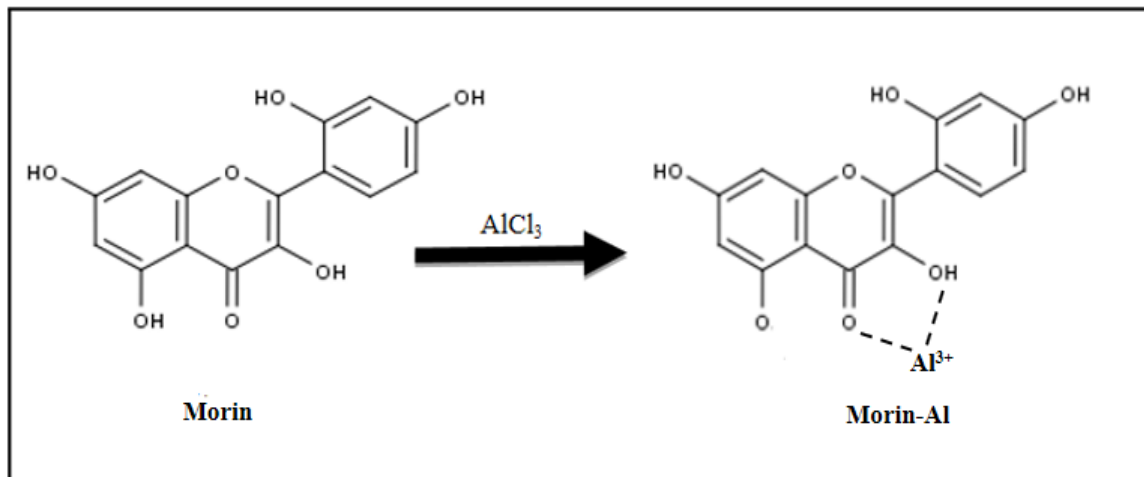
La déstabilisation de la membrane lysosomale peut être étudiée par coloration à l'acridine orange (AO). L'AO ( $\lambda_{Exc} Max = 502$  nm,  $\lambda_{Em} Max = 525$  nm) est une sonde lysosomotropique lipophile, cationique capable de traverser la membrane cytoplasmique et celle des organites cellulaires.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

Après 24 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récupérées dans 1 mL de PBS. Afin d'évaluer les cellules à membrane lysosomale perméable, la suspension cellulaire a été incubée en présence de 1  $\mu$ g/mL d'AO pendant 15 min à 37°C. L'analyse a été réalisée extemporanément par cytométrie en flux; les fluorescences verte et rouge ont été sélectionnées respectivement par des filtres « passe-bande »  $520 \pm 20$  nm et « passe-long » 630 nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence est quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique en utilisant un cytomètre en flux Galaxy (Partec).

## 9. Evaluation de l'accumulation du chlorure d'aluminium par la coloration au Morin Hydrate

### 9.1 Détermination de la concentration de l'aluminium dans les cellules

Le fluorochrome Morin hydrate (2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone) est une molécule chargée négativement (c'est un flavone) qui se lie à l'aluminium chargé positivement formant un complexe fluorescent Morin –Aluminium, qui peut être quantifié par fluorimétrie (Infinite M200 Pro, Tecan) (Browne *et al.*, 1990) (Figure 40).



**Figure 40 :** Complexation de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) avec le Morin formant le « Al-Morin »

La détermination de la concentration d' $\text{AlCl}_3$  dans le lysat cellulaire a été effectuée selon le protocole de Levesque *et al.* (Levesque *et al.*, 2001). Toutes les procédures évoquées ci-dessous ont fait l'objet de mises au point au laboratoire. Après culture et traitement des cellules avec les différentes concentrations d'aluminium, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récupérées par centrifugation à 1000 g pendant 5 min.

La totalité du surnageant est éliminée de façon à obtenir un culot sec. Le culot cellulaire a été lavé 2 à 3 fois avec 2 mL de Tampon Tris Salin (TBS 50 mM, pH 7,4), pour supprimer toute trace du milieu de culture. Le culot est suspendu dans 1 mL de TBS (50 mM) contenant 1 % de Triton pendant 1 h à température ambiante afin de permettre l'éclatement total des cellules. Les lysats sont ensuite centrifugés à 1 000 g pendant 5 min pour éliminer les débris cellulaires non lysés et les surnageants sont récupérés. La solution mère du Morin hydrate est préparée dans du DMSO à une concentration de 6 mM. Cette solution est par la suite diluée dans du DMSO à une concentration de 30  $\mu\text{M}$  puis utilisée sur les cellules.

Après 15 min d'incubation dans l'obscurité, 300  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon ont été prélevés et déposés en plaques 96 puits. La fluorescence a été mesurée en utilisant un fluorimètre (Infinite M200 Pro, Tecan). La longueur d'onde d'excitation était de  $420 \pm 5$  nm et l'émission a été mesurée à  $515 \pm 20$  nm. Pour doser les échantillons, une gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution de chlorure d'aluminium à 30 mM, (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000  $\mu\text{M}$ ). Cette gamme a permis de déterminer la concentration d' $\text{AlCl}_3$  accumulée dans les cellules.

## **10. Quantification des protéines par western blot**

### *10.1 Extraits des extraits protéines*

Les cellules ensemencées dans des boîtes de Petri (100 x 20mm) et traitées avec différentes concentrations du 7KC, ont été collectées par trypsination. Afin de préparer les extraits cellulaires, le contenu de chaque boîte a été transvasé dans un tube Falcon de 15 mL. Les tubes ont été centrifugés à 400 g pendant 5 min. Le culot a ensuite été lavé en PBS.

L'intégralité du surnageant est éliminée de façon à obtenir un culot sec (ce dernier peut alors être congelé à  $-20^\circ\text{C}$  avant la lyse). Le culot a été suspendu dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet NP40 1%, sodium déoxycholate 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 2 mM et NaF 50 mM pH 8) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics Corporation) pendant 30 min dans la glace. Les lysats sont ensuite centrifugés 15 minutes à 12 000g à  $4^\circ\text{C}$  pour éliminer les débris cellulaires non lysés et les surnageants contenant les protéines sont récupérés dans de nouveaux tubes qui peuvent être stockés à  $-20^\circ\text{C}$  avant le dosage des protéines jusqu'au moment de son utilisation. Toutes ces étapes sont effectuées dans la glace.

### *10.2 Dosage des protéines*

Le dosage des protéines a été réalisé en utilisant le kit BCA (Sigma Aldrich), afin de déposer des quantités de protéines équivalentes pour chaque condition. Ce kit dose les protéines en utilisant l'acide bicinchoninique. Ce dernier est un composé coloré qui réagit avec les ions Cu(I) qui proviennent de la réduction des ions Cu(II). Le dosage est réalisé en plaque 96 puits avec 1  $\mu\text{L}$  d'échantillon auxquels sont ajoutés 24  $\mu\text{L}$  d'eau distillée. 200  $\mu\text{L}$  d'un mélange BCA/Cu(II) (50/1) est ajouté dans chaque puit. Une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution de BSA allant de 0 à un 1mg/kg de protéines par puits (le

blanc est remplacé par l'eau). La plaque est incubée 30 min à 37°C puis l'absorbance du BCA est lue à 595 nm sur un spectrophotomètre (MRX Revelation, Dynex).

### ***10.3 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes***

Cette technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" ou SDS-PAGE) a été décrite par Ulrich Laemmli en 1970. Elle permet la séparation des protéines chargés négativement par le SDS et soumises à un champ électrique. Comme il y a une charge négative par molécule de SDS, sa liaison masque toutes les charges de la protéine, et lui confère une charge globale négative élevée.

La dénaturation complète des protéines se fait par la chaleur et en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol et de dodécyl sulfate de sodium (SDS). Les protéines sont séparées sur gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire avec le système « Protein Electrophoresis Classroom Lab Set 2 » (Biorad).

Le gel d'électrophorèse est constitué d'un gel de concentration de 4% et d'un gel de séparation de 14% en acrylamide/bisacrylamide. Le pourcentage en acrylamide est choisi en fonction de la taille de la protéine à détecter. Plus, la protéine a un poids moléculaire élevé et plus le pourcentage du gel sera faible.

Le gel de séparation a été coulé entre deux plaques de verres d'épaisseur de 1,5 mm. Un petit volume d'isopropanol a été ajouté sur le gel pour éliminer les bulles d'air et avoir une surface régulière. Celui-ci sera éliminé et rincé avec de l'eau distillée une fois le gel est polymérisé. Le gel de concentration est coulé par-dessus du gel de séparation (**Tableau 8**), et le peigne a été immédiatement positionné pour tracer les puits où seront déposés les échantillons.

**Tableau 8: Composition des différents types de gel d'acrylamide**

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

#### 10.4 Migration des protéines

Après avoir retirés les peignes. Les gels sont placés dans une cuve de migration où on leur ajoute le tampon de migration (Tris base 25 mM, SDS 0,1 %, glycine 190 mM, pH entre 8,3 et 8,8). Les extraits protéiques (70 µg) sont ajoutés dans 5 µl de tampon de charge (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; glycérol 25%; bleu de Bromophénol 1%; β-mercaptoéthanol 14,4 mM), et déposés dans les puits avec le marqueur de poids moléculaire qui est également déposé dans un puits (Precision Plus Protein™ Standards, Biorad). La migration dans le gel de concentration a été faite à 50 V puis à 120 V pour le gel de séparation grâce au système Mini Trans-Blot Cell (Biorad). La migration est arrêtée avant que le front de migration ne sorte du gel.

#### 10.5 Transfert des protéines sur membrane

Une fois la migration est achevée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose imbibé de tampon de transfert (Nitrocell mbrane-0,45 µM, Fisher scientific). L'ensemble est composé d'un sandwich comprenant: un scotch britt, deux feuilles de papier Whatman (Dominique Dutsher), le gel d'acrylamide, la membrane de nitrocellulose, deux feuilles de papier Whatman et un scotch britt. Le montage est ensuite placé dans la cuve de

transfert remplie de tampon de transfert (Tris base 50 mM, acide borique 50 mM). Le transfert a été réalisé à 50V pendant 45 min sous agitation, avec refroidissement.

Lorsque le transfert est terminé, la membrane est plongée dans une solution de saturation constituée du PBST (PBS, 0,1% Tween20), additionnée de 5% de lactoprotéines (Régilait) pendant 1 h à température ambiante sur un agitateur. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 5 min avec la solution de TBST 0,1%. L'incubation avec les anticorps primaires est faite pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois avec du PBST, elles sont ensuite incubées pendant une heure sous agitation avec l'anticorps secondaire couplé à la Horse Raddish Peroxidase (HRP) dilué dans du PBST-1% lait. Un marquage de l'actine a été réalisé (**Tableau 9**). Les membranes sont lavées encore une fois 3 fois pendant 5 min. La membrane est révélée en utilisant le kit Supersignal West Femto Maximum Sensitivity (Fisher Scientific), le signal est enregistré avec l'appareil ChemiDoc XRS+ (BioRad) et pour certaines protéines, l'analyse de densitométrie des bandes obtenues est effectuée par le logiciel Image Lab (BioRad).

**Tableau 9: Conditions d'utilisation des anticorps primaires pour le western blotting**

<b>Anticorps</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>dilution</b>	<b>Solution</b>	<b>Espèces</b>
<i>Anticorps primaires</i>				
<b>Caspase-3</b>	Cell signaling	1/1000	PBST 5% lait	Lapin
<b>LC3</b>	Sigma Aldrich	1/1000	PBST 1% lait	Lapin
<b>β-actine</b>	Sigma Aldrich	1/10 000	PBST 1% lait	Souris
<i>Anticorps secondaires</i>				
<b>chèvre-anti lapin-HRP</b>	Santa Cruz	1/5000	PBST 1% lait	Chèvre
<b>chèvre-anti souris-HRP</b>	Santa Cruz	1/5000	PBST 1% lait	Chèvre

## **11. RT-qPCR**

### *11.1 Extraction d'ARN*

L'extraction des ARN totaux a été réalisée avec le Kit « RNeasy Mini Kit (250) » (Qiagen). Après 24 h de traitement, les cellules ont été trypsinées, lavées avec du PBS puis 600 µL de tampon de lyse RLT (RNA lysis Tissus) et 1 % de β-mercaptoéthanol ont été ajoutés. Ce tampon contient des sels de guanidium qui sont hautement dénaturants et qui, avec l'aide du β- mercaptoéthanol, permettent la lyse des cellules ainsi que l'inactivation des

RNases. Les lysats cellulaires ont été transférés dans des tubes Eppendorfs où un volume de 600  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 70 % a été ajouté.

Les lysats ont été transférés par la suite sur colonne « RNeasy Mini Spin » (Qiagen) où les ARN sont retenus par la membrane de silice. Deux lavages des colonnes ont été effectués avec le tampon RW1 (RNA Wash Buffer 1). La DNase I (« RNase-free DNase Set » Qiagen) a ensuite été déposée dans chaque colonne pendant 15 min à température ambiante afin de digérer l'ADN génomique. Deux nouveaux lavages ont été réalisés avec le tampon RPE (RNA Buffer Ethanol), avec des centrifugations de 30 secondes à 8000 g pour laver la colonne. La colonne est ensuite séchée par une centrifugation de 1 min à 12 000g puis cette dernière est placée dans un nouveau tube Eppendorf. Un volume de 30  $\mu\text{L}$  d'eau ultrapure (DNase et RNase free (Qiagen)) est ajouté dans la colonne puis une centrifugation d'une minute à 8 000 g permet de récupérer les ARN totaux. Les ARN peuvent alors être congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***11.2 Dosage des ARN***

Le dosage des ARN totaux a été réalisé en utilisant un spectrophotomètre par lecture de la densité optique (DO) à 260 nm avant de procéder à la RT-qPCR. 2  $\mu\text{L}$  d'échantillons sont placés sur le dispositif TrayCell (Hellma) et la densité optique est lue à 260 et 280 nm par le spectrophotomètre (UV-1800, Shimadzu). Les concentrations ont été calculées sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ARN. Le rapport  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  doit être compris entre 1,80 et 2,2 unités d'absorbance car en dessous de 1,80, une contamination protéique est à redouter, alors qu'au-dessus de 2, c'est l'ADN génomique qui risque d'être le contaminant. La valeur de la DO à 260 nm permet de calculer la concentration en ARN de l'échantillon avec le logiciel UVProbe (Shimadzu).

### ***11.3 RT-PCR: Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction***

La RT-PCR a été effectuée à l'aide du Kit « i Script CDNA Synthesis » (Biorad), dans un thermocycleur « PTC- 100, Programmable Thermal Controller ». Des ADN complémentaires ont été synthétisés à partir des ARN totaux de nos échantillons par l'action d'une polymérase (appelée Reverse Transcriptase) qui utilise de l'ARN comme matrice. Les échantillons d'origine qui ont été dosés sont tous ajustés à la même concentration de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans un volume de 30  $\mu\text{L}$  d'eau stérile. Pour chaque condition, on a: 1  $\mu\text{g}$  d'ARN, 4  $\mu\text{L}$  de 5X iScript react mix, 1  $\mu\text{L}$  de iScript Reverse Transcriptase et 14  $\mu\text{L}$  d'eau. Le volume final est de 20  $\mu\text{L}$ . Les échantillons sont alors chauffés 5 min à  $25^{\circ}\text{C}$  puis 1 h à  $42^{\circ}\text{C}$  (température de



réaction de la RT) et 5 min à 95°C (destruction de l'enzyme). Les ARN sont alors rétro-transcrits en ADNc et peuvent être stockés à -20°C.

#### **11.4 qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction**

La PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel a été effectuée à l'aide du kit « Mesa green qPCR MasterMix Plus » (Eurogentec), dans un thermocycleur Step One Plus (AB Applied Biosystems). La qPCR est une réaction de PCR classique visant à amplifier spécifiquement un ADN particulier, dans le but de quantifier par fluorescence la formation du produit de PCR. Le fluorophore utilisé a été le MESA green, un agent intercalant des acides nucléiques doubles brins qui se fixe au niveau du petit sillon, et qui est capable d'émettre de la fluorescence dans le vert lorsqu'il est excité en UV. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de MESA green fixé, donc à la quantité d'ADN dans l'échantillon. Le but de la PCR quantitative est de quantifier le niveau d'expression d'un gène donné en amplifiant les ADNc issus des ARNm par une réaction de PCR.

Pour cela, les échantillons obtenus par la RT sont tous dilués préalablement en ajoutant 80 µL d'eau aux 20 µL d'ADNc d'origine. Un volume de 25 µL de chaque échantillon est alors ajouté dans un même tube afin de réaliser plus tard la gamme standard. Un nouveau volume de 225 µL d'eau est ensuite ajouté aux 75 restants pour obtenir un volume final d'échantillon de 300 µL. La technique de qPCR est faite en plaque 96 puits dans laquelle 20 µL de mix de qPCR et 5 µL d'ADNc dilué sont introduits. Le mix de qPCR est préparé à partir du Mesa green, les dNTPs, et d'autres éléments nécessaires à la réaction comme le MgCl<sub>2</sub>, auxquels sont ajoutées des amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt (300 nM final chacune), et de l'eau stérile, soit 0,075 µL d'amorce sens (100 µM), 0,075 µL d'amorce anti-sens (100 µM), 7,35 µL d'eau et 5 µL d'échantillon.

Le gène de la protéine ribosomale 36b-4 a été choisi comme gène de référence lors de la qPCR. En effet, l'expression de ce gène n'est pas modifiée par les différents traitements appliqués aux cellules. Les amorces de qPCR sont choisies à partir des indications obtenues sur le site Primer Bank, pour les gènes 36b-4, PPAR- $\alpha$ , Acox-1, Abcd-3, Abcd-1 et Mfp-2. Les séquences sont résumées dans le **Tableau 10**.

**Tableau 10: Séquences des différentes amorces utilisées pour les qPCR**

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>36b-4</i>	5'-CGACCTGGAAGTCCAACACTAC-3'	5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG-3'
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	5'TATTCGGCTGAAGCTGGTGTAC3'	5'-CTGGCATTGTGTTCCGGTTCT -3'
<i>Acox-1</i>	5'-GCCCAACTGTGACTTCCATT-3'	5'-GGCATGTAACCCGTAGCACT 3'
<i>Abcd-3</i>	5'-GTTCAAAGAGAAGGATGGGATG 3'	5'TGCTCACGGCACTGGTACATTC3'
<i>Abcd-1</i>	5'-GCCAAGTTGTGGATGTGGAG-3'	5'-TTCCGCAGAGTCGGGATAGA-3'
<i>Mfp-2</i>	5'-AGGGGACTTCAAGGGAATTGG-3'	5'- GCCTGCTTCAACTGAATCGTAA 3

La plaque 96 puits est centrifugée (1 min à 1000 g) puis insérée dans le thermocycleur (Step One Plus Real-Time, PCR système)

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

### 11.5 Analyse des résultats de qPCR

Les courbes de fluorescence obtenues ont été analysées avec le logiciel « Step One Software » ce qui nous permet de déterminer les cycles seuil (Thershold Cycle, Ct), cycle auquel la fluorescence commence à être suffisante pour être quantifiée. Le Ct correspond au nombre de cycles de qPCR nécessaires pour atteindre une certaine valeur de fluorescence, appelée seuil, fixée pour tous les échantillons. Le gène 36b4 a été utilisé comme gène de normalisation, il a été sélectionné comme étant le plus stable pour les traitements. Pour chaque échantillon, nous obtenons un Ct. Le  $\Delta$ Ct qui correspond à la différence entre le Ct du traité et le Ct du témoin a été calculé : plus la différence est importante, plus le traitement a un

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

### **III. MODELE ANIMAL**

#### **1. Conditions d'élevage**

##### *1.1 Conditions expérimentales*

Les rats mâles Wistar âgés de 2 ans et demi provenant du centre d'élevage et expérimental TiT Mellil (Institut Pasteur, Casablanca, Maroc) pesant entre  $301 \pm 43$  g à leur arrivée, ont été hébergés par groupe de 10 par cage, de manière à favoriser les interactions sociales et l'établissement d'une hiérarchie naturelle. Après quelques jours, ils sont regroupés à raison de 4 rats par cage afin de ne pas désavantager les rats dominés dans leur accès à la nourriture et à l'eau. Avant le traitement, les rats ont été acclimatés aux conditions expérimentales du laboratoire (humidité, température, lumière) pendant 10 jours. La nourriture des rats (granulés) est composée de maïs, d'orge, sorgho, issus de blé, tourteaux d'oléagineux et de compléments vitamines (A, D3, E) (Industrie d'alimentation animale moderne I.N.A.A.A.M, Casablanca, Maroc). L'eau de boisson est servie à volonté dans des biberons.

##### *1.2 Préparation des aliments*

100 g de granulés destinés à l'alimentation des rats sont mélangés avec 6 % d'huile d'Argan ou d'huile d'Olive ou d'huile de Colza (6 g de l'huile qui correspond à 6,53 mL/100g de nourriture) (**El Kebbaj et al., 2015**) et avec l'équivalent de 6 % de la poudre d'amande d'arganier (soit 14,3 %) (**Charrouf, 2002**). L'alimentation de traitement est conservée dans des sacs de plastique fermés.

##### *1.3 Traitement des rats*

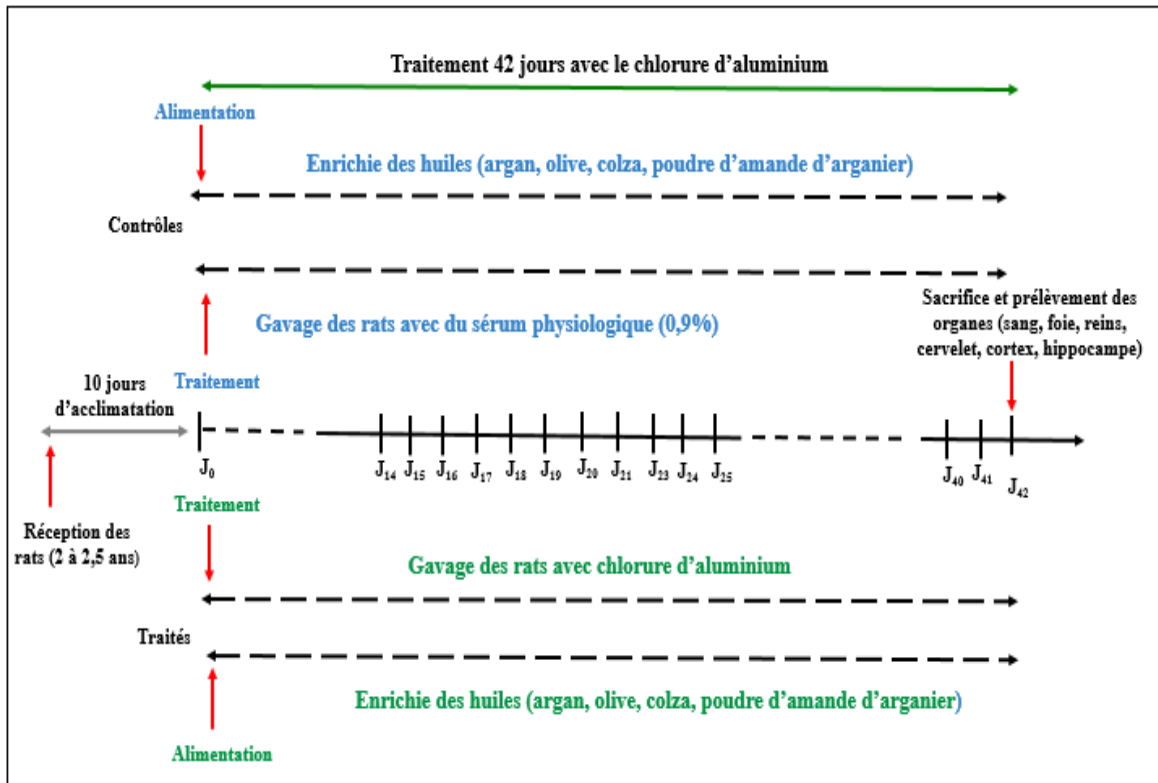
Les rats ont reçu pendant 42 jours, une nourriture enrichie de 6 % en huile d'argan, huile d'olive, huile de colza et poudre d'amande d'arganier (**Tableau 11**). Le traitement des rats avec du chlorure d'aluminium a aussi été fait pendant 42 jours par incubation gastrique à l'aide d'une sonde de gavage à une concentration de 100 mg/kg poids corporel préparée dans l'eau physiologique (0.9% de NaCl) (**Kumar et al., 2011**). Les rats du lot contrôle ont été gavés dans les mêmes conditions avec de l'eau physiologique. Toutes les expériences ont été réalisées entre 7:00 et 9:00 h. En raison de l'extrême susceptibilité des systèmes de riposte au

stress à toutes sortes d'agressions, nous avons attaché la plus grande importance aux conditions de manipulations journalières et à l'environnement où les bruits sont atténués. Le traitement des rats a été conforme aux recommandations du comité d'éthique de l'université Hassan 1<sup>er</sup> Settat.

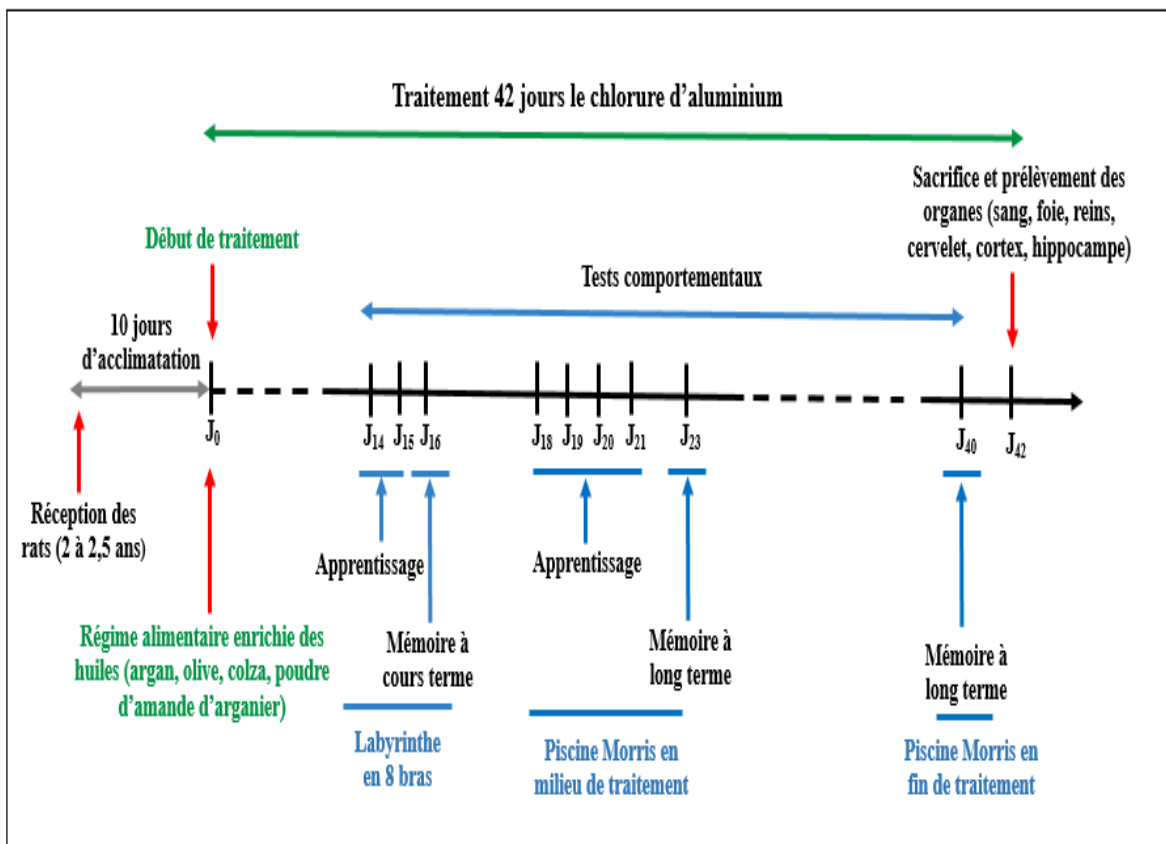
**Tableau 11:** *Conditions de traitement des rats en présence et ou en absence de chlorure d'aluminium avec une alimentation enrichie en huiles (huile d'argan, huile d'olive, huile de colza et poudre de graine d'arganier)*

<i>Groupe</i>	<i>Traitement</i>
Groupe 1	Contrôle, reçoit l'eau physiologique par gavage
Groupe 2	Reçoit le chlorure d'aluminium (100 mg/kg) par gavage
Groupe 3	Reçoit 6% d'huile d'argan dans l'alimentation
Groupe 4	Reçoit le chlorure d'aluminium (100 mg/kg) par gavage + 6% d'huile d'argan dans l'alimentation
Groupe 5	Reçoit 6% d'huile d'olive dans l'alimentation
Groupe 6	Reçoit le chlorure d'aluminium (100 mg/kg) par gavage + 6% d'huile d'olive dans l'alimentation
Groupe 7	Reçoit 6% d'huile de colza dans l'alimentation
Groupe 8	Reçoit le chlorure d'aluminium (100 mg/kg) par gavage + 6% d'huile de colza dans l'alimentation
Groupe 9	Reçoit l'équivalent de 6% de la poudre d'amande d'arganier dans l'alimentation (14,3%)
Groupe 10	Reçoit le chlorure d'aluminium (100 mg/kg) par gavage + l'équivalent de 6% de la poudre d'amande dans l'alimentation (14,3%)

Le mode de traitement des rats conformément au **Tableau 11** est schématisé ci-dessous (**Figure 41 et 42**):



**Figure 41:** Protocole expérimental de traitement des rats avec le chlorure d'aluminium



**Figure 42:** Schéma des tests comportementaux réalisés au cours du traitement avec le chlorure d'aluminium

## **2. Contrôle du poids des rats**

Avant chaque traitement, les rats ont été pesés. Le poids de chaque rat est consigné et son évolution en fonction du traitement est observée pendant 42 jrs. A 42 jrs, les rats sont sacrifiés.

## **3. Etude de comportement des rats**

Les rongeurs font preuve de grandes capacités mnésiques car ils doivent apprendre et se souvenir de l'environnement spatial afin de survivre dans la nature. Beaucoup de tests mnésiques consistent en l'apprentissage d'un environnement spatial, comme par exemple le test du labyrinthe aquatique et du labyrinthe radial.

### ***3.1 Procédure de labyrinthe aquatique de Morris (water maze)***

Ce test a été conçu par **Morris, (1984)** pour évaluer les capacités des rats à mémoriser et à gérer de l'information spatiale pour échapper à une situation peu agréable et aversive (l'eau d'un bassin) en se réfugiant le plus rapidement possible sur une plate-forme non visible immergée à 1cm sous la surface. Ce test repose sur la tendance naturelle présentée par un animal qui, placé dans un environnement stressant et confiné, tente de s'en échapper.

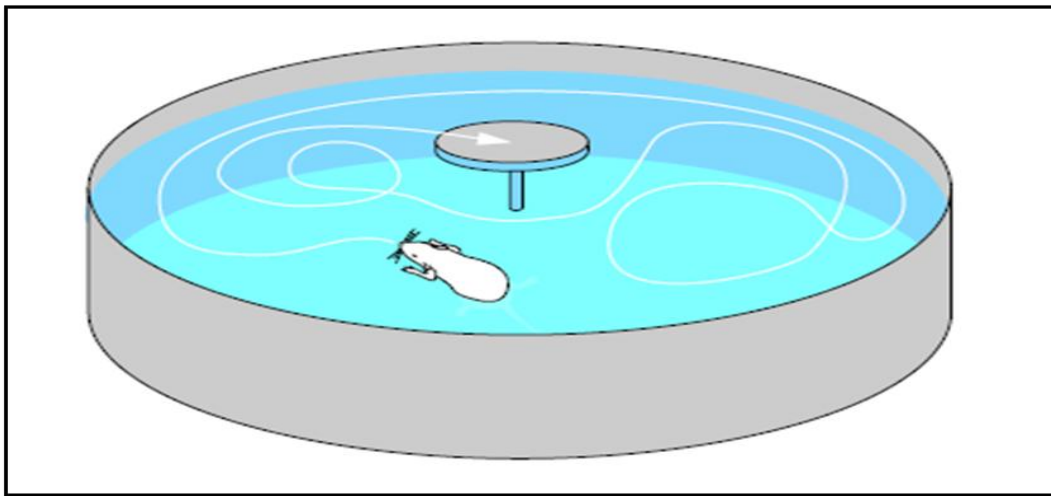
A partir de ce principe, de nombreux protocoles ont été développés pour distinguer différentes composantes de la mémoire (mémoire de référence, mémoire de travail) et déceler les différentes stratégies que peuvent utiliser les animaux pour se repérer dans l'espace. L'animal peut en effet retrouver la plate-forme en utilisant différentes sortes d'indices. Il peut répéter une séquence de mouvements l'ayant déjà mené jusqu'à la plate-forme : il utilisera alors une stratégie égocentrique. Il peut aussi se diriger vers des indices proximaux (situés à l'intérieur du bassin) qu'il aura auparavant associés à la position de la plate-forme. L'animal peut également utiliser des indices distaux (extérieurs au bassin) et repérer la plate-forme : il utilisera alors une stratégie allocentrique). Compte tenu des déficits lourds entraînés par le modèle de lésion choisi, nous avons utilisé une version simplifiée du test, la plate-forme étant maintenue au même endroit tout au long de l'expérience nous nous sommes focalisés sur la mémoire spatiale de référence.

#### **a. Dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental du test de la piscine de Morris est constitué d'une enceinte circulaire de verre blanc de 150 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur (**Figure 43**) remplie à moitié (20 cm) par de l'eau rendue opaque par l'adjonction de lait. La température

relativement basse de l'eau (20°C) confère à ce test un caractère aversif pour l'animal. Une plate-forme, constituée d'un bocal en verre de section hexagonale, est disposée à l'intérieur de l'enceinte et reste invisible pour l'animal, et immergée à 1 cm sous la surface de l'eau.

La piscine est placée dans une pièce comportant plusieurs indices distaux (étagères contenant les cages, évier,) susceptibles de permettre à l'animal de se repérer dans l'espace. Ainsi, l'animal peut repérer la position de la plate-forme par rapport à un cadre de référence allocentrique comportant ces divers indices distaux. Dans cette tâche, l'animal cherche à trouver refuge sur la plate-forme le plus rapidement possible.



**Figure 43 :** *Dispositif de la piscine de Morris avec un exemple de trajectoires suivie par un rat depuis le 1er point de lâché jusqu'à la plateforme invisible*

### **b. Déroulement du protocole**

Le protocole de mémoire de référence consiste à localiser la plate-forme immergée invisible dont la position reste inchangée au cours de 4 jours consécutifs. Chaque rat subit une séance quotidienne de 4 essais séparés par un délai de 5 min durant lequel l'animal est replacé dans sa cage. A chaque essai, l'animal est déposé dans l'eau face à la paroi depuis un point de départ déterminé qui varie d'essai en essai (la séquence des différents points de lâcher variant également d'un jour à l'autre). L'essai se termine lorsque le rat a atteint la plate-forme, ou bien lorsque 60 s se sont écoulées. Si le rat ne trouve pas la plate-forme durant les 60 s de l'essai, il est guidé par l'expérimentateur jusqu'à la plate-forme. Une fois l'animal sur la plate-forme, il y est laissé pendant 10 s avant que l'expérimentateur ne lui présente une grille métallique de transport. Les principales variables relevées sont la latence d'atteinte de la plate-forme (maximum: 60 s) et la distance parcourue au cours du trajet. Puisque les 4 points de lâchers utilisés au cours des 4 essais quotidiens ne sont pas tous situés à la même distance

de la plate-forme. Le trajet effectué par l'animal dans la piscine est filmé à l'aide d'une caméra vidéo. Le test de la piscine de Morris a été réalisé en milieu de traitement et à la fin du traitement.

### ***3.2 Procédure de labyrinthe 8 bras (arm maze)***

Le labyrinthe radial à 8 bras a été développé pour les rats par **Olton and Samuelson, (1976)**. Il constitue une méthode largement répandue pour évaluer les capacités de mémorisation et de gestion de l'information spatiale. Le rat part d'un point de départ et doit trouver la récompense. La motivation peut donc être appétitive (nourriture placée de manière visible dans le labyrinthe), le rat doit alors élaborer une stratégie optimale pour explorer le labyrinthe radial à 8 branches. Les labyrinthes sont des tests qui permettent l'évaluation de la mémoire à court terme ainsi que de l'apprentissage. Le labyrinthe radial comporte une plate-forme centrale d'où irradient un certain nombre d'allées radiales (ou bras) souvent au nombre de huit.

#### **a. Dispositif**

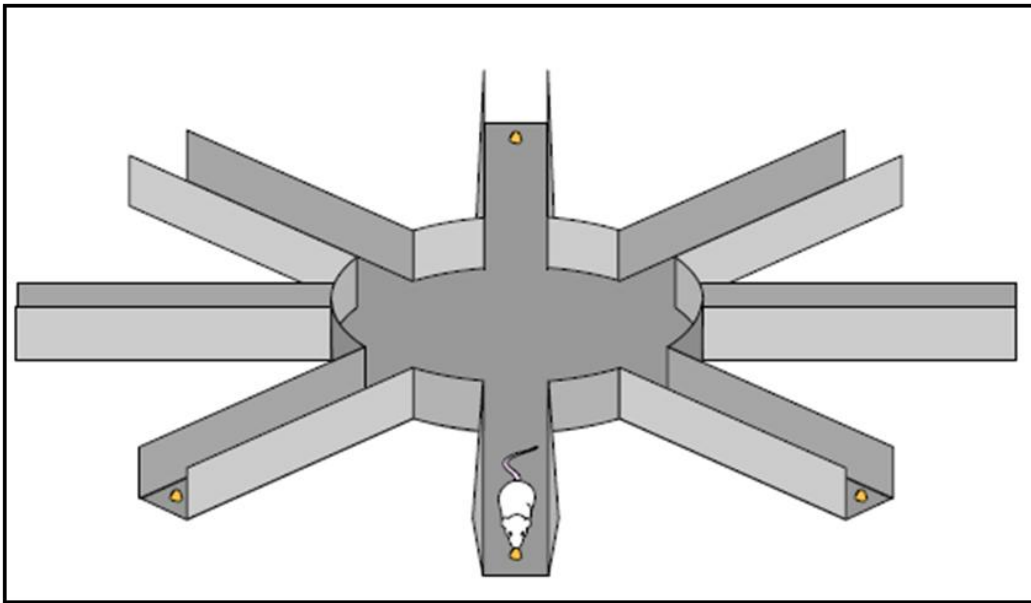
Dispositif radial « arm maze », chaque bras mesure 36 cm de longueur de 7,1 cm de largeur et 2 cm de hauteur.

#### **b. Déroulement du protocole**

Les animaux ont été privés de nourriture pendant 24 h, c'est une sorte de motivation pour chercher la récompense. Des signaux visuels bien distincts sont placés sur les murs de la pièce ainsi que des indices distaux, permettant ainsi aux rats de se situer dans l'espace. L'animal a été placé sur le centre du dispositif ce qui lui permettra d'explorer le labyrinthe pendant 10 minutes par jour. Les rats ont été entraînés à trouver la récompense de nourriture aux extrémités distales de huit bras pendant ces 10 min. Chaque session dure jusqu'à ce que tous les 8 bras soient saisis (considérer entrer dans un bras quand tout le corps, sauf la queue, est à l'intérieur du bras).

Les 4 bras garnis de récompenses sont toujours les mêmes, par exemple 4 parmi les 8 afin d'apprendre à l'animal à ne trouver la nourriture que dans ces 4 bras pendant 10 min (**Figure 44**).





**Figure 44:** *Entrée du rat dans un bras garnis de récompenses. Les 4 bras garnis sont toujours les mêmes afin d'apprendre à l'animal à ne trouver la nourriture que dans ces 4 bras parmi les 8*

Le comportement de l'animal pendant 10 min a été enregistré par une caméra vidéo. Après l'étape de l'apprentissage, si l'animal a réussi à visiter les 4 bras garnis de nourriture dans un délai qui ne dépasse pas 10 min, on arrête l'enregistrement. Lorsque l'animal est devenu hautement performant pour cette tâche, il est possible de distinguer deux types d'erreurs. Les erreurs qui relèvent de la mémoire de référence consistent à entrer à nouveau dans un bras parmi ceux qui ne sont jamais garnis ; ce type d'erreur suggère que l'animal a oublié la tâche de la base, qui consiste à trouver la nourriture dans un sous-groupe particulier de 4 bras. Les erreurs qui touchent à la mémoire de travail sont celles où l'animal entre à nouveau dans un bras parmi ceux qui dont la nourriture a déjà été consommée. Dans ce cas, l'animal semble se souvenir de la tâche (sélectionner un sous-groupe particulier de 4 bras) mais oublie lequel des quatre il a déjà visité. Le test du labyrinthe 8 bras a été réalisé en milieu de traitement.

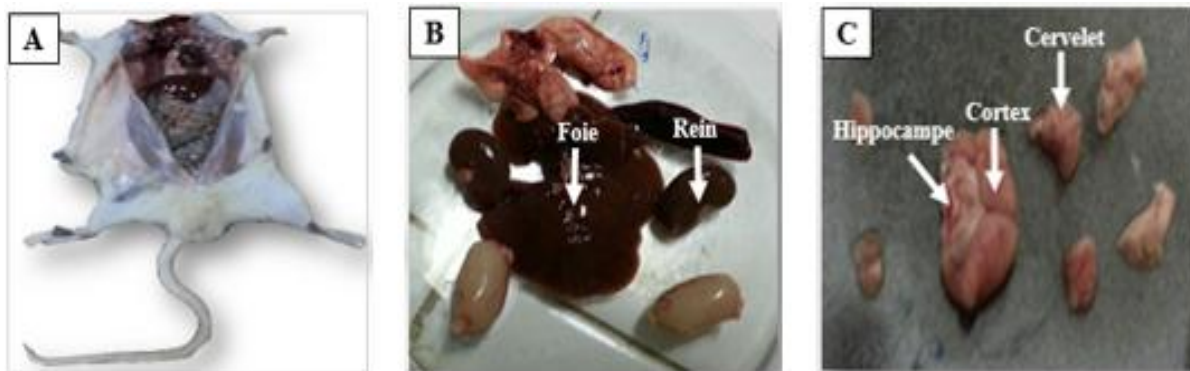
Pour prévenir les odeurs, le labyrinthe a été nettoyé entre les animaux. Les variables utilisés pour l'analyse de la performance sont : le nombre d'erreurs dans chaque session (entrer dans un bras parmi ceux qui ne sont jamais garnis et entrer dans un bras qui a été visité précédemment, sont comptés comme des erreurs), et le temps pris pour visiter chaque bras.

#### 4. Sacrifice des rats

À la fin du traitement, les rats ont été mis à jeun pendant 12 h avant qu'ils soient sacrifiés. Lors du sacrifice, certaines mesures ont été prises en compte : Les instruments de dissection étaient lavés avec de l'acide nitrique 5 % et rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée pour éviter toute contamination des tissus par le matériel. Les tubes eppendorf ont été préalablement lavés avec de l'acide nitrique 5 %, rincés avec de l'eau distillée et codifiés afin d'être utilisés pour le stockage des organes.

##### 4.1 Prélèvements des organes

Au terme des périodes de traitement, les rats ont été décapités. Les organes prélevés (foie, reins.....), ont été d'abord lavés immédiatement avec l'eau physiologique avant d'être pesés et congelés rapidement dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'utilisation. Les cerveaux sont aussi rapidement extraits de la boîte crânienne et placés sur un support en verre en contact avec de la glace (+4°C). Différentes structures cérébrales (hippocampe, cortex et cervelet) (**Figure 45**) sont prélevées par microdissection selon une adaptation de la méthode de Sabine Spijker (**Spijker, 2011**). Toutes les structures cérébrales, sont immédiatement congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à l'utilisation.



**Figure 45:** *Structures cérébrales étudiées*

**A:** Dissection du rat, **B:** Foie et Reins, **C:** Hippocampe, Cortex et Cervelet

En ce qui concerne le sang ; il a été prélevé lors de la décapitation des rats à l'aide d'une seringue et d'une aiguille, puis immédiatement centrifugé à 4°C (8 000 g pendant 10 min), le plasma recueilli a été conservé à -80°C jusqu'à utilisation pour l'analyse des paramètres plasmatiques. Les différents organes prélevés sont destinés d'une part aux analyses biochimiques et d'autres part aux coupes histologiques.

## **5. Dosage des paramètres plasmatiques chez le rat**

L'analyse des paramètres plasmatiques a été effectuée suivant des méthodes enzymatiques et/ou colorimétriques par un auto-analyseur (*Express Plus Bayer, Bayer Diagnostics*). Tous les dosages ont été effectués à l'aide de kits commerciaux (Laboratoire d'analyse médicale, Hôpital Hassan II, Settat, Maroc). Les analyses ont été portées sur le bilan glycémique, rénal (urée), lipidique (cholestérol total, triglycérides), et protéique (transaminases).

## **6. Dosages d'activités enzymatique chez le rat**

### ***6.1 Préparation des homogénats***

10 % (w/v) du foie, hippocampe et cortex sont coupés en petits morceaux avant d'être pré-homogénéisés dans un premier temps à 4°C dans un potter Elvehjem PTFE (pilon et tube de verre, Sigma Aldrich) où le tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (50 mM, pH 7,4) a été ajouté. Au moment de l'emploi, les tissus homogénéisés ont été soniqués avec un sonicateur dans les conditions suivantes : 30 s, 2 cycles, 40 % de puissance puis centrifugés 3 000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants récupérés ont été aliquotés en fractions de 1000  $\mu\text{L}$  (Foie) et de 200  $\mu\text{L}$  (Hippocampes-Cortex) puis conservés à -20°C (conservation 6 mois) jusqu'à leur utilisation (**Weydert and Cullen, 2010**).

### ***6.2 Dosage des activités enzymatiques des marqueurs de stress oxydatif***

#### **a. Dosage des protéines**

La méthode de Lowry consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques (**Lowry et al., 1951**) :

- la réaction de Biuret, dans laquelle  $\text{Cu}^{2+}$ , en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond,
- et la chimie de Folin-Ciocalteu, dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleu-vert.

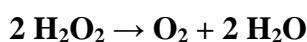
Ainsi, dans un premier temps, et en parallèle des échantillons à doser, une gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution protéique de BSA (bovine serum albumin) à 2 mg/mL (Sigma-Aldrich) en prélevant des volumes variables (0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80  $\mu\text{L}$ ). Dans un second temps, la concentration en protéines totales de l'extrait protéique a été

déterminée par la mesure de l'absorbance des solutions à 750 nm, elle a été dosée comme suit: la solution A est constituée de: 2 g d'hydroxyde de sodium –NaOH- (4 mg/mL) (Sigma-Aldrich), 10 g carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mg/mL) (Sigma, Aldrich) et 400 mL d'H<sub>2</sub>O. Compléter avec l'eau jusqu'à un volume final de 500 mL. La solution B est constituée de 100 mg de potassium sodium tartrate KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>•4H<sub>2</sub>O (10 mg/mL) (Sigma, Aldrich), 50 mg de sulfate de cuivre CuSO<sub>4</sub> (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) et 8 mL d'H<sub>2</sub>O. Compléter avec l'eau jusqu'à 10 mL. Un volume de l'extrait protéique (10 µL) a été mis en présence de la solution de Lowry A et B (50 :1).

Le mélange est ensuite agité au vortex, et il est mis en présence de 0.1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (1 N) (Sigma-Aldrich) dans de l'eau. Après 30 min à 37°C, l'intensité de la coloration a été mesurée à 750 nm au spectrophotomètre. La concentration protéique des échantillons a été calculée à partir d'une gamme d'étalonnage de BSA. La quantité de protéine est exprimée en mg/g de tissu.

#### **b. Dosage de l'activité catalase (CAT)**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'eau oxygénée :



L'activité de la catalase est déterminée par la disparition à 240 nm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Clairbone *et al.*, 1985) avec un facteur d'extinction molaire ( $\epsilon_M$ ) de 43,6 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, durant une min à une température de 25°C. La solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) a été fraîchement préparée à une concentration de 0.019M dans le tampon phosphate 50 Mm (Sigma-Aldrich), à partir d'une concentration initiale qui a été déterminée avant chaque utilisation car la solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se dégrade avec le temps.

$$A = C. L. \epsilon M$$

D'où

**A:** l'absorbance à 240 nm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**L:** longueur de la cuve (cm) = 1cm

**$\epsilon M$ :** coefficient d'extinction molaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) = 43,6 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

Dans une cuve de Quartz de 3 mL, 1,95 mL de tampon phosphate 50 mM, 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.019 M) et 0.05 mL de l'échantillon (homogénat de l'organe ou de tampon phosphate pour le blanc) ont été ajoutés.

La densité optique a été lue à 240 nm à l'instant 0 ( $T_0$ ) et après toutes les 30 s pendant 2 min. Une unité de l'enzyme est définie comme 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommée par min et l'activité spécifique a été normalisée par rapport à la quantité de protéine totale, elle a été exprimée en unités catalase par mg de protéine. L'activité de la catalase est déterminée selon la relation suivante :

$$\text{UI/g} = ((2.3033) / \Delta T) \times (\log A_1 / A_2)$$

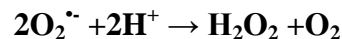
D'où :

$A_1$  : L'absorbance à 240 nm de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à l'instant 0.

$A_2$  : L'absorbance à 240 nm de  $\text{H}_2\text{O}_2$  après 1 min.

### c. Mesure de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

La SOD est l'une des enzymes anti-oxydantes les plus importantes. Elle catalyse la dismutation des anions superoxydes ( $\text{O}_2^-$ ) pour donner  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'oxygène moléculaire ( $\text{O}_2$ ) selon la réaction suivante :



Les SOD, dont le rôle est de réduire l'anion  $\text{O}_2^-$ , inhibent ainsi cette réaction (**Polle *et al.*, 1989**). Après préparation des extraits protéiques, l'activité SOD a été quantifiée selon la méthode de **Beyer and Fridovich, (1987)**. Cette méthode implique l'inhibition de nitrobleu de tétrazolium (NBT) et sa réduction avec la riboflavine utilisée comme générateur de superoxyde. Pour doser l'activité de SOD totale (SODt), un mélange de 3 mL a été préparé en ajoutant du tampon phosphate à 50 mM, contenant du triton X-100 à 0,025%, de l'EDTA (pH 8) à 0,1 mM, de la L-Méthionine à 12 mM, du NBT à 75  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{L}$  de l'extrait protéique et de la riboflavine 2  $\mu\text{M}$  (ajoutée à la fin pour initier la réaction).

La réaction a été effectuée à 25°C et sous une lampe de 15W pendant 10 min dans un incubateur. L'absorbance est lue à 560 nm, l'activité SOD est mesurée selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{A blanc}_{560} - \text{A échantillon}_{560} / \text{A blanc}_{560}) \times 100$$

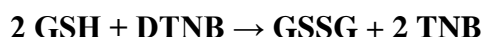
### d. Mesure de l'activité Glutathion Peroxydase (GPx)

L'activité de la glutathion peroxydase est mesurée selon la méthode de **Flohe and Gunzler, (1984)**. Elle a été calculée par la diminution du taux de glutathion réduit par rapport à la réaction non enzymatique et en utilisant  $\text{H}_2\text{O}_2$  comme substrat. Après préparation des extraits protéiques, l'activité GPx a été déterminée dans un milieu réactionnel de volume de 1

mL contenant 0,3 mL de l'extrait enzymatique, 0,3 mL de tampon phosphate (0,1M pH 7,4), 0,2 mL de GSH 2 mM ,0,1 mL de sodium azide 10 mM et 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. Après incubation à 37°C pendant 15 min, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 0,5 mL d'acide tricholoacétique TCA (5 %). Une centrifugation 1 500 g pendant 5 min a été effectuée afin de récupérer 0,1 mL du surnageant qui a été ajouté à 0,2 mL de tampon phosphate 50 mM et à 0,7 mL de DTNB [5-5'-dithiobis (acide -2- nitrobenzoïque)] (0,4 mg/mL, préparé dans tampon phosphate à 0,4 M). L'absorbance est lue à 420 nm et l'activité a été exprimée en µmol de GSH/min/mg de protéine.

#### **e. Dosage du glutathion réduit (GSH)**

Le GSH est oxydé par le DTNB pour donner le disulfure de glutathion (GSSG) avec la formation stœchiométrique de TNB, selon la réaction :



A cette étape, la totalité du glutathion de l'échantillon est sous forme oxydée. Après préparation des extraits protéiques, la concentration de GSH a été déterminée dans un milieu réactionnel de volume contenant 200 µL de TCA (5%), 400 µL de l'extrait protéique. Après centrifugation 12 000 g pendant 10 min, 50 µL du surnageant ont été prélevés et ajoutés à 100 µL de DTNB (6 mM) et à 850 µL du tampon phosphate 50 mM. La densité optique a été lue après 5 min à 412 nm.

#### **7. Détermination de la teneur en aluminium par la spectroscopie d'émission atomique par plasma à coulage inductif (ICP-AES)**

Le cortex, hippocampe et foie ont été analysés par ICP-AES pour déterminer la teneur en aluminium dans ces tissus. ICP-AES a été réalisée par la plateforme Welience (Matériaux et Technologie, Pôle Chimie Moléculaire, Université de Bourgogne) avec un spectromètre ICP/AES iCAP 7400 (Thermo Electron). Une prise d'essai de quelques dizaines de mg ou de quelques centaines de mg d'échantillon a été minéralisée (Micro-Onde Ultrawve, Milestone) en milieu acide dans 4 mL d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>). Un blanc de minéralisation a également été préparé dans les mêmes conditions. Après minéralisation, les échantillons sont complétés à 5 ou 10 mL selon la quantité minéralisée avec H<sub>2</sub>O.

## **8. Effet sur la fragmentation d'ADN**

### ***8.1 Extraction de l'ADN***

L'extraction de l'ADN a été réalisée par l'automate Maxwell 16® (Promega). Cet automate utilise une technologie innovante de capture par billes magnétiques, sans distribution, filtration, ni aspiration de réactifs, limitant le temps de manipulation et les risques d'erreurs. L'extraction a été effectuée en suivant le protocole fourni par le fabricant. Pour cela, 50 mg de chaque tissus (hippocampe, cortex) ont été mis en contact avec des billes magnétiques chargées positivement ce qui permet la capture de l'ADN et son passage d'un puits à l'autre. Un lavage de l'ADN lié aux particules a été effectué pour le séparer des autres composants cellulaires. A la fin, un tube d'élution bleu contenant 300 µL du tampon d'élution, a été mis dans les emplacements pour tubes d'élution, à l'avant de la cartouche pour récupérer l'ADN élué.

### ***8.2 Dosage de l'ADN***

L'ADN est dilué au 1/2,5 dans de l'eau distillée puis dosé par mesure de la densité optique à 260 nm. L'unité d'absorbance à 260 nm correspond à une solution à 50 µg/mL d'ADN double brin. L'ADN est considéré comme pur lorsque le rapport  $A_{260}/A_{280}$  est supérieur à 1,8.

## **9. Gel d'agarose**

L'ADN est mis en présence d'un tampon de charge 1X (tampon de charge 6x : 1,2 mL Glycérol, 0,8 mL Tris-Acétate-EDTA, 0,656 mL d'eau distillée et 1,2 mg du bleu de bromophénol pour 2 mL), puis déposé sur un gel d'agarose de concentration 1,5 % d'agarose contenant 0,5 mg/mL BET (Bromure d'éthidium) préparé à partir d'une solution mère de 1 mg/mL (**Kumar et al., 2009**) dans le tampon TAE 1x [54 g Tris- base (890 mM), acide borique (890 mM), EDTA (20 mM) pour (500 mL à pH 8)]. Le gel d'agarose a été fondu sur une plaque chauffante en le surveillant pour éviter les projections, tout en agitant de temps à autre pour homogénéiser le mélange. Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (environ 60°C).

Le gel a été coulé lentement sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne. Les ADN (hippocampe, cortex) ont été dilués dans un volume total de 20 µL d'eau distillée afin d'avoir une quantité d'ADN équivalente pour chaque échantillon égale à 200 µg. Le tampon de charge et l'ADN ont été mélangés sur parafilm. Après mélange,

les puits ont été remplis en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette. Le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse a été placé en positionnant les puits du côté de la cathode (pôle noir). La cuve a été remplie de tampon TAE en versant délicatement et très lentement lorsque le gel commence à être recouvert pour éviter les fuites d'ADN vers le tampon. La cuve a été fermée puis branchée et mise sous tension. La migration est arrêtée avant que le front de migration ne sorte du gel. La migration a été réalisée pendant 55 min à 50V. L'analyse de densitométrie des bandes obtenues est effectuée par le logiciel Image Lab (BioRad).

### **10. Coupes histologiques**

Après avoir fixé les organes (Foie, hippocampe et cortex) au formaldéhyde, afin de conserver les structures dans leur états de départ, les organes ont passé à l'inclusion qui a été faite au Centre de Pathologie de Dijon. L'inclusion permet donc de réaliser des coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement a d'abord subi une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse. Ensuite les coupes du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre qui sont colorées en hématoxyline- éosine et vues au microscope.



# Résultats

## Résultats

### I. Caractérisation de l'arganier et de l'huile d'argan

#### 1. Arganier

##### *1.1 Détermination des paramètres chimiques de différentes parties d'Argania spinosa*

Le **tableau 12** montre les paramètres chimiques de différentes parties d'*Argania spinosa* en terme de teneur en eau (humidité), cendres (matière minérale), lipides, protéines et en sucre. Comparativement avec la région d'Agadir, les résultats montrent que les différentes parties de la région de Berkane, à savoir:

- l'amande est riche en protéines.
- la pulpe est riche en sucre.
- les feuilles sont riches en protéines.
- la coque est riche en sucre et faible en lipides.

Toutefois, les autres paramètres sont pratiquement les mêmes dans les différentes parties de la plante au niveau des deux régions.

**Tableau 12:** *Composition chimique de différentes parties de la plante d'Argania spinosa*

Partie de la plante	La région	% d'humidité	% de cendres	% de lipides	% de protéines	% de sucre
Amande	Berkane	1,20	3,00	20,00	10,50	65,30
	Agadir	1,15	3,00	27,00	1,75	67,10
Coque	Berkane	1,3	2,00	3,00	1,75	91,95
	Agadir	1,5	1,00	17,00	1,31	79,19
Pulpe	Berkane	73,00	3,00	8,00	5,25	10,75
	Agadir	72,79	5,00	9,00	6,13	7,09
Feuilles	Berkane	59,00	6,00	5,00	10,50	19,50
	Agadir	60,25	7,00	6,00	7,56	19,14

##### *1.2 Détermination des composés phénoliques*

###### **a. Evaluation quantitative des polyphénols totaux**

Le dosage des phénols totaux a été évalué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (**Abdel-Hameed, 2009**). La lecture de la densité optique à 725 nm permet de déterminer la concentration des phénols totaux en se

référant à la courbe d'étalon dressée à partir de concentrations connues de l'acide gallique (exprimée en mg d'acide gallique/g de matière sèche). L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu.

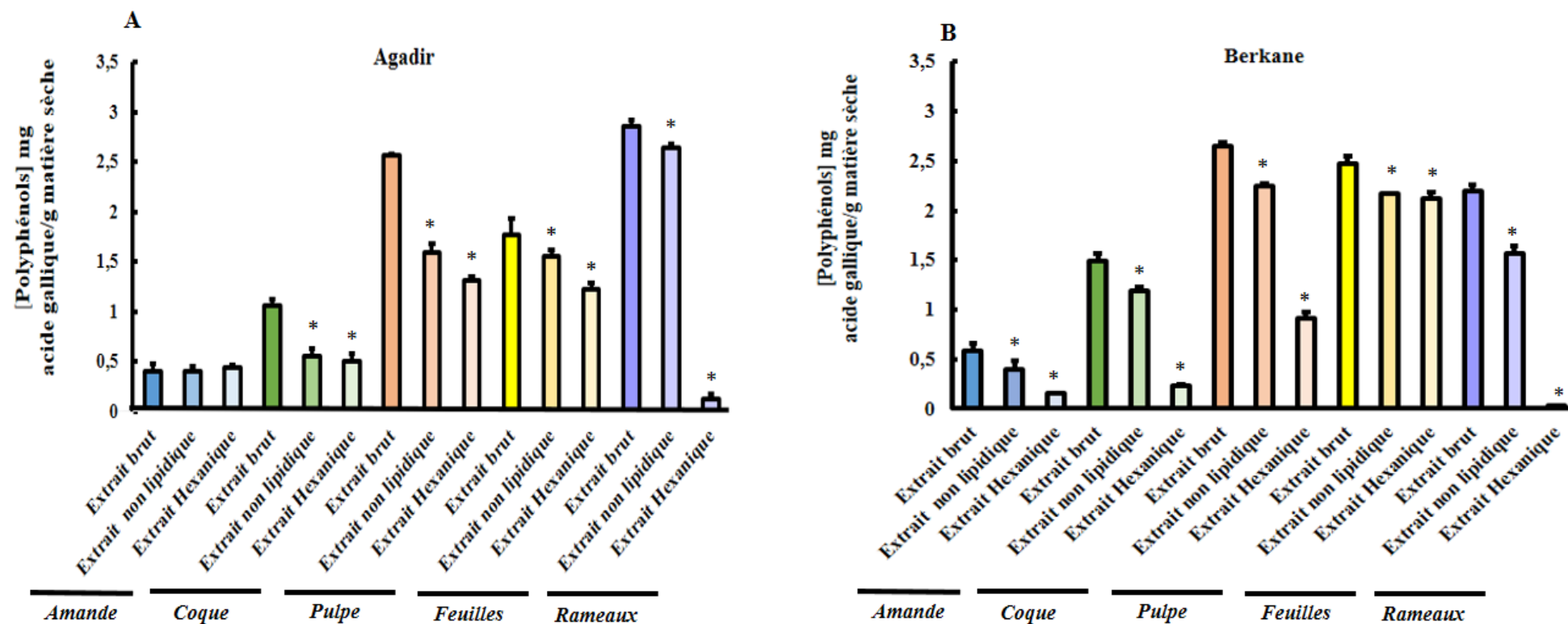
Nous nous sommes intéressés à analyser ces résultats, en mettant l'accent sur la composition des différentes parties de l'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles et rameaux) en terme de polyphénols de deux régions Berkane et Agadir. Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé sur les extraits méthanoliques qu'on appelle les extraits bruts, les extraits non lipidiques et les extraits hexaniques. Les résultats montrent que les teneurs en polyphénols totaux, dans les deux régions, sont plus élevées au niveau des extraits bruts (EB) suivi des extraits non lipidiques (ENL) et les extraits hexaniques (EH) des différentes parties de l'arganier : EB > ENL > EH (**Figure 46**).

La teneur en polyphénols totaux diffèrent d'une partie à l'autre de la plante d'arganier, nous trouvons qu'au niveau de la région de Berkane, la pulpe est la partie la plus riche en polyphénols (**EB** : 2,64 mg d'AG/g MS ; **ENL** : 2,24 mg d'AG/g MS ; **EH** : 0,91 mg d'AG/g MS ), tandis que l'amande est la partie la plus pauvre (**EB** : 0,58 mg d'AG/g MS ; **ENL** : 0,4 mg d'AG/g MS ; **EH** : 0,16 mg d'AG/g MS ) (**Figure 46 B**). Il en est de même pour Agadir, la pulpe contient une grande quantité de polyphénols (**EB** : 2,56 mg d'AG/g MS ; **ENL** : 1,58 mg d'AG/g MS ; **EH** : 1,31 mg d'AG/g MS ), que l'amande n'en possède pas (**EBM** : 0,4 mg d'AG/g MS ; **ENL** : 0,39 mg d'AG/g MS ; **EH** : 0,43 mg d'AG/g MS ) (**Figure 46 A**).

Nous pouvons donc classer la teneur en polyphénols comme suit :

- au niveau de Berkane : La pulpe > Rameaux > Feuilles > Coque > Amande.
- au niveau d'Agadir : La pulpe > Feuilles > Rameaux > Coque > Amande.

En vu d'ensemble, les deux régions contiennent des polyphénols mais avec des grandeurs un peu faible. Cependant la région de Berkane est légèrement riche en polyphénols par rapport à celle d'Agadir.



**Figure 46:** *Quantité des polyphénols totaux exprimée en mg d'acide gallique / g de matière sèche, contenue dans les différentes parties d'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) de deux régions Agadir (A) Berkane (B)*

Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre l'extrait brut et l'extrait non lipidique et entre l'extrait hexanique est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ .

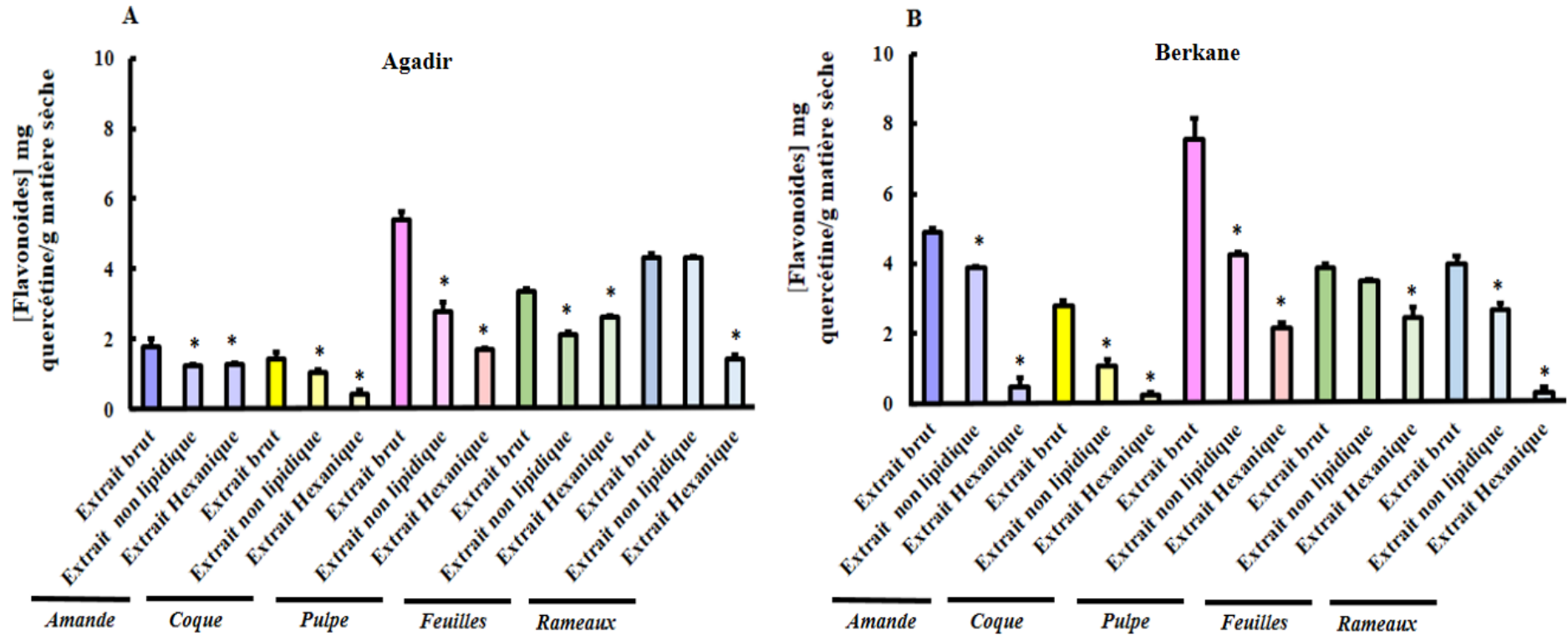
**Extrait brut** = extrait méthanolique ; **Extrait hexanique** = extrait lipidique.

### b. Evaluation quantitative des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée par la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium décrite par Dehpeur (Dehpeur *et al.*, 2009), en utilisant comme standard la quercétine. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg Equivalent quercétine /g de matière sèche.

Les résultats du dosage des flavonoïdes suivent la même logique que ceux des polyphénols. Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé sur les extraits méthanoliques, non lipidiques et hexaniques de différentes parties de la plante (amande, coque, pulpe, feuilles et rameaux) de deux régions d'Agadir et de Berkane. Les résultats montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux, dans les deux régions, sont plus élevées au niveau des extraits bruts méthanoliques (EB) suivi des extraits non lipidique (ENL) et des extraits hexaniques (EH) des différentes parties de l'arganier : **EB > ENL > EH (Figure 47)**.

Comme pour les polyphénols, la teneur en flavonoïdes totaux diffèrent d'une partie à l'autre de la plante d'arganier. Au niveau de la région de Berkane, la pulpe représente la partie la plus riche comparativement à l'amande, rameaux, feuilles et coque (La pulpe > Amande > Rameaux > Feuilles > Coque) (**Figure 47 B**). On note qu'au niveau de la pulpe de Berkane, l'**EB** : 7,56 mg d'AG/g MS ; **ENL** : 4,27 mg d'AG/g MS ; **EH** : 2,16 mg d'AG/g MS, tandis que l'amande est la partie la plus pauvre (**EB** : 4,88 mg d'AG/g MS ; **ENL** : 3,88 mg d'AG/g MS ; **EH** : 0,47 mg d'AG/g MS ). Il en est de même pour Agadir, la pulpe contient une grande quantité de flavonoïdes (**EB** : 5,39 mg d'AG/g MS ; **ENL** : 2,78 mg d'AG/g MS ; **EH** : 1,69 mg d'AG/g MS ), que l'amande n'en possède pas (**EB** : 1,77 mg d'AG/g MS ; **ENL** : 1,25 mg d'AG/g MS ; **EH** : 1,3 mg d'AG/g MS ) (La pulpe > Rameaux > Feuilles > Amande > Coque) (**Figure 47 B**).



**Figure 47:** Quantité des flavonoïdes exprimée en mg de quercétine / g de matière sèche, contenue dans les différentes parties d'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) des deux régions Agadir (A) et Berkane (B)

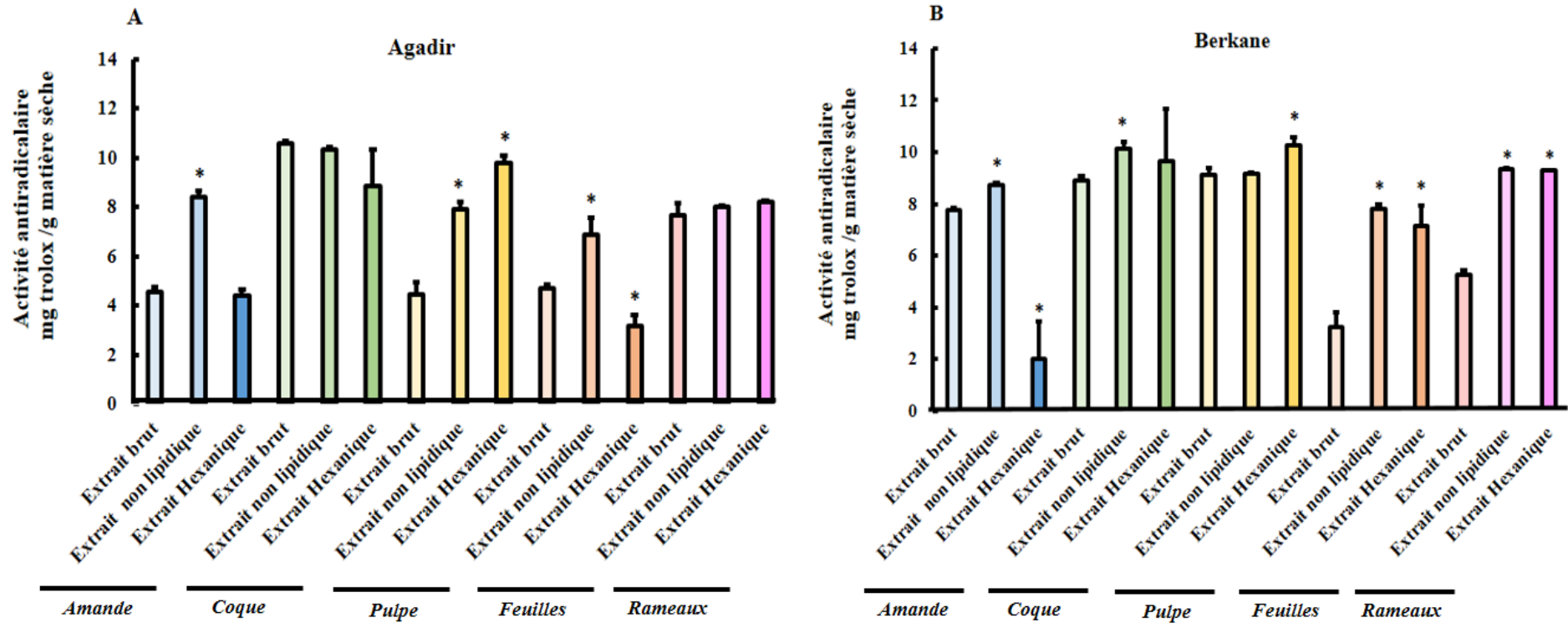
Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre l'extrait brut et l'extrait non lipidique et entre l'extrait hexanique est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ .

**Extrait brut** = extrait méthanolique ; **Extrait hexanique** = extrait lipidique.

### ***1.3 Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits d'arganier***

#### **a. Détermination de l'effet scavenger du radical DPPH**

L'activité antioxydante des différents extraits d'arganier *vis-à-vis* du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Le % de piégeage (= activité anti-radicalaire) du radical libre DPPH montre la capacité de l'extrait, à une concentration donnée, à réduire ou non les radicaux. Nos résultats exprimés en tant que concentration d'extrait (mg/mL) capable d'inhiber 50% de la réaction, les données sont résumées dans la **figure 48**, qui représente l'IC50 des extraits d'arganier de différentes parties de la plantes de deux régions différentes (Berkane et Agadir) vis-à-vis du radical libre DPPH. L'activité anti-radicalaire des extraits de Berkane, l'extrait non lipidique de la coque, l'extrait non lipidique et hexanique des feuilles, l'extrait non lipidique et hexanique des rameaux; était plus importante par rapport à celle d'Agadir. L'activité anti-radicalaire des autres extraits ne présente pas une différence significative en comparant les deux régions étudiées. En vu d'ensemble, les extraits de la région de Berkane étant la région qui possède l'activité antioxydante la plus importante comparativement à la région d'Agadir.



**Figure 48:** *Activité antioxydante exprimée en mg de trolox /g de matière sèche, des différentes parties d’arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) des deux régions Agadir (A) et Berkane (B)*

*Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. La significativité entre l’extrait brut et l’extrait non lipidique et entre l’extrait hexanique est calculée par le test Anova (Sidak’s multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ .*

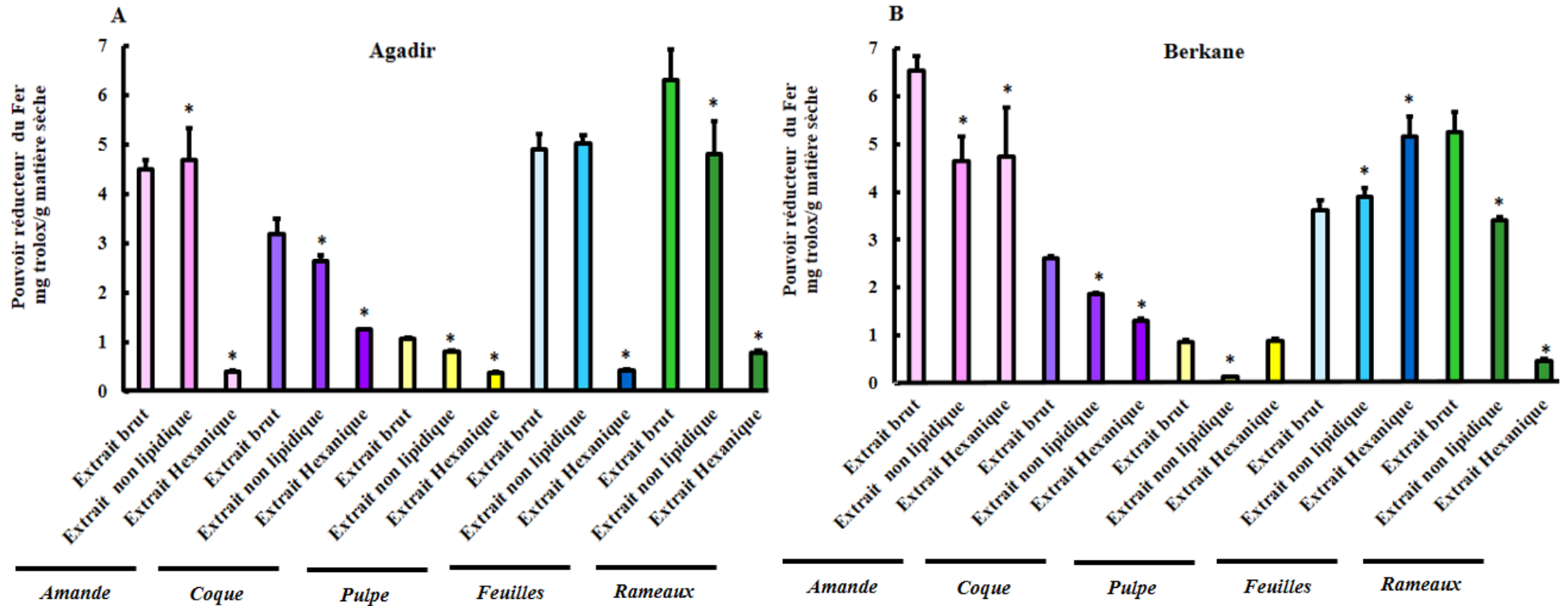
*Extrait brut = extrait méthanolique ; Extrait hexanique = extrait lipidique.*



### **b. Détermination du pouvoir antioxydant du Fer**

L'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. C'est une méthode de mesure de la puissance des extraits à réduire le  $\text{Fe}^{+3}$  en fer ferreux  $\text{Fe}^{+2}$  qui est l'un des mécanismes antioxydants. C'est une technique rapide, facile et reproductible (**Karagözler et al., 2008**). Beaucoup de publications actuelles ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (**Bentabet et al., 2014**).

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différents extraits des parties d'arganier. Les résultats obtenus illustrés dans la **figure 49**, montrent que l'ensemble des extraits bruts et les extraits non lipidiques de toutes les parties de la plante des deux régions (Agadir et Berkane) sont dotés d'un pouvoir antioxydant et chélateur du fer beaucoup plus par rapport aux extraits hexaniques. Or, on note que l'extrait brut de l'amande de Berkane possède le plus grand pouvoir antioxydant par rapport aux autres extraits. Les résultats indiquent que les extraits de coque, de pulpe, de feuilles et de rameaux de la région d'Agadir possèdent un pouvoir antioxydant plus important que ceux de Berkane. La conclusion que nous pouvons tirer c'est que la région d'Agadir qui contient le pouvoir antioxydant et chélateur de fer le plus élevé.



**Figure 49:** *Activité antioxydante par la méthode FRAP exprimée en mg de trolox / g de matière sèche, des différentes parties d'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) des deux régions Agadir (A) et Berkane (B)*

*Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. La significativité entre l'extrait brut et l'extrait non lipidique et entre l'extrait hexanique est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ .*

*Extrait brut = extrait méthanolique ; Extrait hexanique = extrait lipidique.*

## 2. L'huile d'argan

### 2.1 Analyse des constituants chimiques de l'huile d'argan

Pour mener à bien les différentes études abordées i) *in vitro* pour préciser les effets cytoprotecteurs de l'huile d'argan sur les cellules gliales en cultures, ii) *in vivo* pour tenter d'évaluer l'effet protecteur de l'huile d'argan dans un environnement pro-oxydant, il est donc nécessaire de déterminer la composition de l'huile d'argan en terme de stérols, tocophérols, acides gras et polyphénols. L'huile de colza et l'huile d'olive utilisées comme contrôle positifs *in vivo* sont aussi caractérisées. Il est à noter que la caractérisation de l'huile d'argan, l'huile de colza et l'huile d'olive a été réalisée par notre équipe de recherche. Cette caractérisation a été menée par **Zarrouk et al. (Zarrouk et al., 2016b)**, afin de déterminer la composition chimique de différents types des huiles utilisées dans le traitement des rats de la partie *in vivo*.

#### a. Détermination des stérols

Les phytostérols sont des composants présents dans la fraction insaponifiable des lipides des aliments, principalement le  $\beta$ -sitostérol, le campestérol et le stigmastérol qui sont des composés naturels présents dans les plantes végétales et qui sont abondants dans les huiles végétales comme les noix, les graines et les céréales (**Ryan et al., 2007; Lecerf, 2007**). Par conséquent, il est nécessaire de déterminer la teneur et la composition de stérols dans les huiles alimentaires et cosmétiques étudiés.

L'analyse des stérols selon **Zarrouk et al. (Zarrouk et al., 2016b)** a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, a montré que le  $\beta$ -sitostérol a été le principal stérol dans toutes les huiles sauf l'huile d'argan. Le spinastérol et le schottérol sont les composés majoritaires de l'huile d'argan et ils sont présents en quantités très importantes (**Tableau 13**). Cependant, le spinastérol est présent en quantités très importantes dans l'huile d'argan de Barkane, tandis que l'huile d'argan d'Agadir est très riche en schottérol. En plus de ces composés, l'huile d'argan de Berkane contient un niveau élevé en  $\Delta 7$ -stigmastérol,  $\Delta 7$ -campestérol, campestanol comparativement à l'huile d'argan d'Agadir qui est riche en  $\beta$ -amyrine, cycloartenol,  $\Delta 7$ -avenasterol et 24-Méthylène cycloartenol (**Tableau 13**).

**Tableau 13:** Quantité des stérols ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), d'huile d'olive et d'huile de colza

	Huile d'argan			Huile d'olive	Huile de colza
	Alimentaire Agadir	Alimentaire Berkane	Cosmétique Berkane	Settat	France
Cholestérol	ND	ND	ND	ND	28,50 ± 20,10
Brassicastérol	ND	ND	ND	ND	729,00 ± 211,00
24-Méthylènecholestérol	ND	ND	ND	12,40 ± 5,51	19,80 ± 12,30
Campestérol	ND	ND	ND	59,70 ± 15,30	ND
Campestanol	16,40 ± 6,76	15,90 ± 7,11	15,30 ± 5,77	10,40 ± 10,40	30,10 ± 15,90
Stigmastérol	ND	ND	ND	21,40 ± 11,00	29,10 ± 10,50
$\Delta$ 7-Stigmastérol	48,20 ± 18,70	46,60 ± 9,31	44,70 ± 11,50	ND	ND
$\Delta$ 7-Campestérol	37,50 ± 12,70	35,30 ± 28,00	35,00 ± 17,30	ND	ND
Spinastérol	64,40 ± 249,00	567,00 ± 74,60	591,00 ± 83,90	ND	ND
Clerostérol	ND	ND	ND	23,70 ± 28,60	52,50 ± 25,20
$\beta$ -Sitostérol	ND	ND	ND	1,47,00 ± 279,00	3,29 ± 884,00
$\Delta$ 5-Avenastérol	ND	ND	ND	157,00 ± 47,40	291,00 ± 90,60
$\beta$ -amyrine	211,00 ± 130,00	178,00 ± 13,00	192,00 ± 70,00	12,60 ± 11,80	ND
Fucostérol	ND	ND	ND	10,30 ± 15,30	66,30 ± 32,90
Graminastérol	ND	ND	ND	36,70 ± 0,00	42,50 ± 12,70
Schottérol	849,00 ± 402,00	62,50 ± 96,40	776,00 ± 20,80	ND	ND
Cycloartérol	239,00 ± 51,40	218,00 ± 46,80	221,00 ± 98,70	159,00 ± 188,00	94,70 ± 180,00
$\Delta$ 7-avenastérol	85,8 ± 47,10	57,8 ± 3,00	80,3 ± 20,80	5,07 ± 9,02	38,20 ± 424,00
24-Méthylène cycloartenol	51,50 ± 27,00	44,50 ± 22,30	52,30 ± 49,30	668,00 ± 290,00	51,50 ± 19,60
Lupeol	15,60 ± 7,13	22,70 ± 5,77	18,00 ± 55,7	ND	ND
Citrostadienol	132,00 ± 61,60	70,30 ± 14,00	125,00 ± 10,00	155,00 ± 138,00	24,60 ± 10,50
Unkown	133,00 ± 42,50	135,00 ± 204,00	130,00 ± 40,00	30,90 ± 56,80	200,00 ± 81,90

### b. Détermination des tocophérols

Les tocophérols sont des constituants importants dans la fraction des insaponifiables à cause de leurs actions vitaminiques et antioxydantes. Ils jouent un rôle central autant que nutriments liposolubles essentiels, ils fonctionnent comme des antioxydants dans le corps humain.

L'analyse des huiles (argan, olive et colza) par HPLC, a permis de quantifier les teneurs en tocophérols totaux dans les huiles. Selon **Zarrouk *et al.* (Zarrouk *et al.*, 2016b)**, l'huile d'argan alimentaire d'Agadir contient la plus grande quantité en  $\alpha$ -tocophérol avec une valeur moyenne de  $429 \pm 7 \text{ mg kg}^{-1}$ . L'huile alimentaire et cosmétique de Berkane ainsi que l'huile de colza sont riches en  $\gamma$ - tocophérols (**Tableau 14**). L'huile d'olive contient de faible quantité des tocophérols.

**Tableau 14:** Quantité des tocophérols ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), d'huile d'olive et d'huile de colza

	Huile d'argan			Huile d'olive	Huile de colza
	Alimentaire Agadir	Alimentaire Berkane	Cosmétique Berkane	Settat	France
$\alpha$ -Tocophérol	429,00 $\pm$ 7,00	12,00 $\pm$ 1,00	11,00 $\pm$ 1,00	30,00 $\pm$ 2,00	94,00 $\pm$ 9,00
$\gamma$ -Tocophérol	12,00 $\pm$ 1,00	355,00 $\pm$ 19,00	434,00 $\pm$ 7,00	5,00 $\pm$ 1,00	348,00 $\pm$ 41,00
$\delta$ -Tocophérol	12,00 $\pm$ 1,00	18,00 $\pm$ 2,00	12,00 $\pm$ 0,00	0,00	6,00 $\pm$ 1,00

Ces valeurs témoignent la richesse de nos huiles en tocophérols totaux (plus particulièrement  $\alpha$  et  $\gamma$  tocophérols), par rapport aux autres huiles. Les résultats montrent que l'huile d'argan est relativement riche en tocophérols par rapport à l'huile de colza et l'huile d'olive. L'huile d'argan alimentaire d'Agadir était beaucoup plus riche que celle de Berkane. La teneur élevée en  $\alpha$ -tocophérol constitue une spécificité de l'huile d'argan comparativement à d'autres huiles. La richesse de l'huile d'argan alimentaire d'Agadir, nous a incité de l'utiliser dans le traitement des rats *in vivo*.

### c. Détermination des acides gras

L'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse, a permis d'identifier les acides gras présents dans les huiles étudiées (colza, olive et argan) avec des proportions différentes.

L'acide linoléique (C18:2n-6) est un acide gras polyinsaturé le plus abondant dans toutes des huiles. Les résultats ont montré que les huiles utilisées dans cette expérience avaient des teneurs en acide linoléique, avec la plus haute valeur moyenne en huile d'argan. D'un point de vue nutritionnel, l'huile d'argan pourrait être considérée une bonne source d'acides gras essentiels. Un autre acide gras insaturé quantitativement élevé dans les huiles est l'acide oléique (C18:1n-9) avec le plus haut niveau de toute évidence dans de l'huile d'olive et l'huile de colza (664-565  $\text{mg g}^{-1}$  respectivement de lipides totaux) par rapport à l'huile d'argan. L'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0) sont les acide gras saturés le plus abondant dans toutes les huiles, avec un taux plus élevé dans les huiles d'argan par rapport aux autres huiles (**Tableau 15**).

L'huile de colza est l'huile la plus riche en acide linoléique (C18:3n-3) ( $84,00 \pm 1,11$  mg g<sup>-1</sup> de lipides totaux) comparativement aux autres huiles. C18:1 trans est présent dans toutes les huiles, avec des niveaux plus importants dans les huiles d'argan par rapport à l'huile d'olive et l'huile de colza (Tableau 15).

**Tableau 15:** *Quantité d'acide gras (g kg<sup>-1</sup> des lipides totaux) d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), d'huile d'olive et d'huile de colza*

	Huile d'argan			Huile d'olive	Huile de colza
	Alimentaire Agadir	Alimentaire Berkane	Cosmétique Berkane	Settat	France
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	1,47 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,22	0,00	0,58 ± 0,02
C15:0	0,52 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,00	0,00	0,00
C16:0	119,00 ± 0,37 <sup>a</sup>	132,00 ± 4,97 <sup>a</sup>	118,00 ± 1,69	96,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	42,50 ± 1,17 <sup>a</sup>
C16:1 n-7	1,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,04	5,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,00 <sup>a</sup>
C16:1 n-9	0,00	0,00	0,00	2,00 ± 0,00	0,00
C17:0	0,84 ± 0,04	0,97 ± 0,02	0,89 ± 0,08	0,00	0,66 ± 0,01
C18:0	62,60 ± 1,27 <sup>a</sup>	65,00 ± 2,70 <sup>a</sup>	61,80 ± 1,05	30,70 ± 1,53	19,50 ± 2,44 <sup>a</sup>
C18:1 trans	10,90 ± 2,70	10,70 ± 0,40	11,10 ± 0,68	12,70 ± 3,51	7,19 ± 5,11
C18:1n-9	443,00 ± 0,51 <sup>a</sup>	464,00 ± 18,40	437,00 ± 6,14	664,00 ± 4,00 <sup>a</sup>	565,00 ± 7,31 <sup>a</sup>
C18:1 n-7	3,86 ± 0,075 <sup>a</sup>	4,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,041	19,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	34,90 ± 0,07
C18:2 n-6 cis trans	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2 n-6 trans cis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2 n-6	332,00 ± 5,72 <sup>a</sup>	324,00 ± 9,21 <sup>a</sup>	322,00 ± 0,532	129,00 ± 3,00 <sup>a</sup>	181,00 ± 1,50
C20:0	3,23 ± 0,10	3,66 ± 0,09	2,96 ± 0,16	3,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,13
C20:1 n-9	2,95 ± 0,01	3,38 ± 0,06	2,80 ± 0,00	3,00 ± 0,00	12,80 ± 0,07 <sup>a</sup>
C18:3 n-3	1,16 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,01	8,67 ± 0,58	84,00 ± 1,11
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	1,11 ± 0,00	1,34 ± 0,02	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,00	2,58 ± 0,00
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	1,90 ± 0,06
C24:0	0,53 ± 0,02	0,00	0,00	0,00	1,04 ± 0,10
C24:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Conjugated C18:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

#### d. Détermination des polyphénols

L'analyse des huiles (argan, olive et colza) par HPLC a révélé que les huiles d'argan contiennent de très faibles quantités de l'acide protocatéchique et tyrosol. Tous les autres polyphénols sont trouvés en éléments de trace dans l'huile d'argan ainsi que l'huile d'olive et colza (Tableau 16).

**Tableau 16:** *Quantité des polyphénols exprimés en équivalent quercétine mg / 100 g d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), d'huile d'olive et d'huile de colza*

	Huile d'argan			Huile d'olive	Huile de Colza
	Alimentaire Agadir	Alimentaire Berkane	Cosmétique Berkane	Settat	France
Acide Homovanillique	ND	ND	ND	ND	ND
Vanilline	ND	ND	ND	ND	ND
Acid p-Coumarique	ND	ND	ND	0.25	ND
Quercétine-3 $\beta$ -glucoside	ND	ND	ND	ND	ND
Quercétine	ND	ND	ND	ND	ND
Apigénine	ND	ND	ND	ND	ND
Acide 2,6 dihydroxybenzoïque	ND	ND	ND	ND	ND
Acide Chlorogénique	ND	ND	ND	ND	ND
Acide Férulique	ND	ND	ND	0.12	ND
Thymoquinone	ND	ND	ND	ND	ND
Hydroxytyrosol	ND	ND	ND	0.67	ND
Tyrosol	0.07	0.06	ND	0.58	ND
Oleuropeine	ND	ND	ND	0.33	ND
Lutéoline	ND	ND	ND	0.32	ND
Acide Protocatéchique	ND	0.17	0.08	ND	ND
Pics non identifiés	0.07	0.18	0.08	1.97	ND
Pics identifiés à 280 nm	0.54	0.75	0.13	2.80	0.91

En vu d'ensemble, l'huile d'argan est principalement riche en C18:1n-9 (acide oléique)> C18:2n-6 (acide linoléique)> C16:0 (acide palmitique)> C18:0 (acide stéarique), et spinastérol schotténol et  $\alpha$  ou  $\gamma$  tocophérols.

#### e. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles

Afin d'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des différentes huiles étudiées, ainsi que certains de leurs composants (vitE et acide férulique), les globules rouges ont été traités en présence et en absence d'AAPH ( $\alpha,\alpha$ -Azodiisobutyramidine dihydrochloride), utilisé comme générateur des radicaux libres.

Les résultats montrent que l'huile de colza ainsi que les huiles d'argan ont la capacité à augmenter la résistance des cellules à l'hémolyse induite par AAPH (**Tableau 17**). La vitamine E et l'acide férulique ont des activités antioxydantes très importantes. Ces derniers ont la capacité à augmenter la résistance des globules rouges quatre fois par rapport au contrôle (**Tableau 17**).

**Tableau 17 : Capacité anti-oxydante des huiles d'argan (alimentaire et cosmétique), vitamine E et acide férulique**

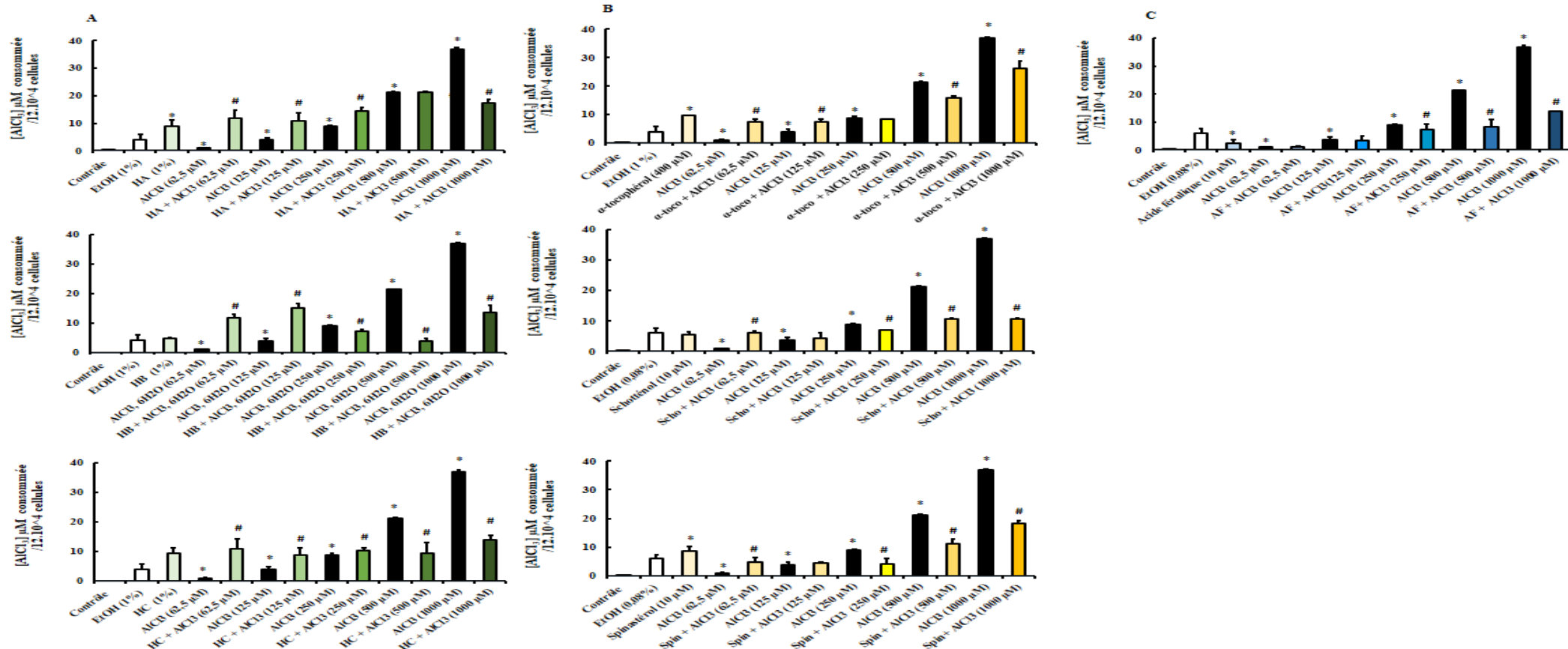
	Hémolyse des globules rouges en demi temps	Equivalent en mmole Trolox/mole d'huile	Equivalent en mmole en acide gallique/mole de l'huile
Contrôle	83.33 ± 4.39	0,00	0,00
Alimentaire Agadir	92.47 ± 1.43	53.45 ± 8.34	20.18 ± 3.15
Huile d'argan Alimentaire Berkane	84.79 ± 1.22	8.57 ± 7.12	3.24 ± 2.69
Cométique Berkane	85.37 ± 1.26	11.98 ± 7.38	4.52 ± 2.79
Vitamine E	226.68 ± 37.26	837,00 ± 218,00	465,00 ± 121,00
Acide férulique	450.08 ± 9.51	2142,00 ± 56,00	1190,00 ± 31,00

### 1. Evaluation de l'accumulation de l'Aluminium cellulaire

L'accumulation de l'Aluminium par les cellules a été évaluée par le Morin hydrate. Le Morin hydrate est un fluorochrome chargé négativement qui se lie à l'aluminium chargé positivement formant un complexe fluorescent Morin-Aluminium (vert), qui peut être quantifié par fluorimétrie. Les cellules 158N sont cultivées en boîtes de Petri de 60 x 15 mm pendant 24 h en absence et ou en présence de différentes concentrations de chlorure d'aluminium (0 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 ; 1000  $\mu\text{M}$ ) associées ou non aux huiles d'argan (1 % : alimentaire et cosmétique), au tocophérol (400  $\mu\text{M}$ ), aux phytostérols (schotténol et spinastérol : 10  $\mu\text{M}$ ), et à l'acide férulique (10  $\mu\text{M}$ ).

L'incubation de cellules 158N avec l' $\text{AlCl}_3$  aux concentrations allant de 62,5 à 1000  $\mu\text{M}$  pendant 48 h et leur analyse par fluorimétrie après coloration au Morin hydrate montre une augmentation significative et dose dépendante des concentrations d' $\text{AlCl}_3$  accumulées par les cellules. Cette accumulation d' $\text{AlCl}_3$  est statistiquement significative à partir du 62,5  $\mu\text{M}$ . En présence des huiles d'argan, alimentaire et ou cosmétique, l'accumulation d' $\text{AlCl}_3$  par les cellules à différentes concentrations est fortement inhibée (**Figure 50 A**). Dans ces mêmes conditions, l'accumulation d' $\text{AlCl}_3$  par les cellules 158N est fortement inhibée, en présence de l' $\alpha$ -tocophérol, spinastérol, schotténol et l'acide férulique (**Figure 50 B-C**).





**Figure 50:** Accumulation du chlorure d'aluminium associé ou non aux huiles d'argan, à l'  $\alpha$ -tocophérol, spinastérol, schotténol et à l'acide férulique dans les oligodendrocytes murins 158N

Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan (A),  $\alpha$ -Toco, Spin, scho (B) et AF (C) est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par les différentes concentrations d'AlCl<sub>3</sub> ou associés aux huiles d'argan,  $\alpha$ -Toco, Spin, schot et AF est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol: EtOH (1 %). **HA** : Huile d'argan alimentaire d'Agadir, **HB** : Huile d'argan alimentaire de Berkane, **HC** : Huile d'argan cosmétique de Berkane, **Spin** : Spinastérol, **Scho** : Schotténol,  **$\alpha$ -Toco** :  $\alpha$ -Tocophérol, **AF** : Acide férulique.

## **2. Effets du 7-cétocholestérol sur la prolifération cellulaire, le dysfonctionnement des organites et la mort cellulaire**

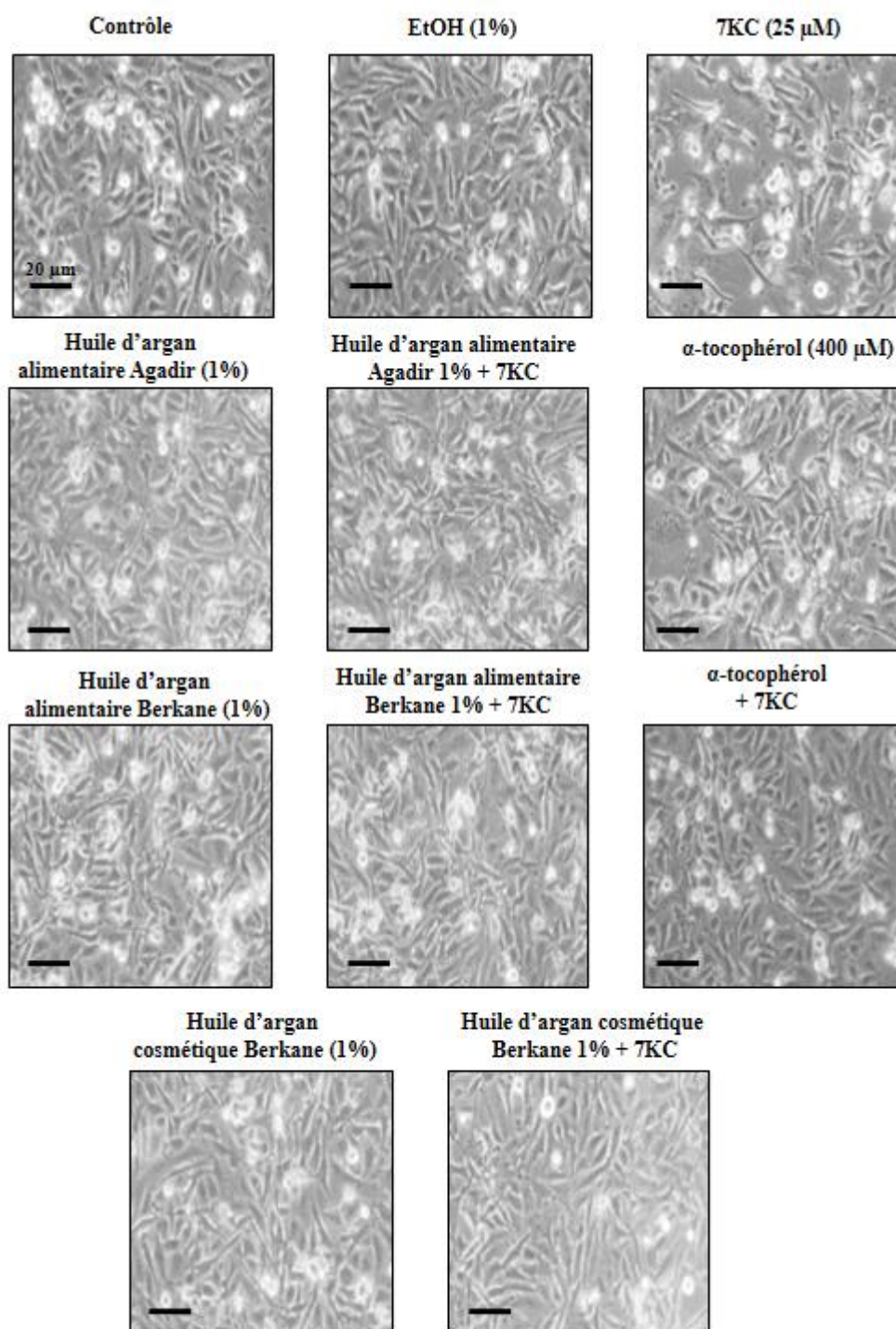
La prolifération et la viabilité cellulaires ont été évaluées par plusieurs méthodes: une estimation de la morphologie des cellules par microscopie en contraste de phase, une numération des cellules viables par coloration au Bleu Trypan et une évaluation de la confluence par coloration au Crystal violet.

### ***2.1 Effet de 7-cétocholestérol sur la prolifération***

#### **a. Evaluation des modifications de la morphologie cellulaire**

Les cellules 158N ont été cultivées dans des plaques de 6 puits pendant 24 h, prétraitées ou non par deux types de l'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1% et de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h. Après 48 h de traitement, les cellules ont été observées en microscopie à contraste de phase et des images ont été prises pour chaque condition de traitement pour évaluer qualitativement l'adhérence et la morphologie des cellules (**Figure 51**).

La présence de cellules non adhérentes (cellules arrondies réfringentes) constitue un critère de toxicité. En présence de 7KC, contrairement au contrôle ou au véhicule (Ethanol), une diminution du nombre des cellules viables. Cette diminution est associée à une augmentation du nombre des cellules rondes qui correspondent aux cellules flottantes et mourrantes ce qui est caractéristique de cytotoxicité. La morphologie des cellules contrôles et des cellules traitées avec le véhicule ne présente pas des changements marqués. En présence de deux types d'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1% et de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M), seules les cellules adhérentes sont détectées. Lorsque les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol sont associés au 7KC peu ou pas de cellules non adhérentes sont observées : l'huile d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol utilisé comme contrôle positif et constitue un composant majoritaire de l'huile d'argan (**Tableau 14**) s'opposent donc au détachement cellulaire induit par le 7KC.



**Figure 51:** Observation des cellules par microscopie en contraste de phase

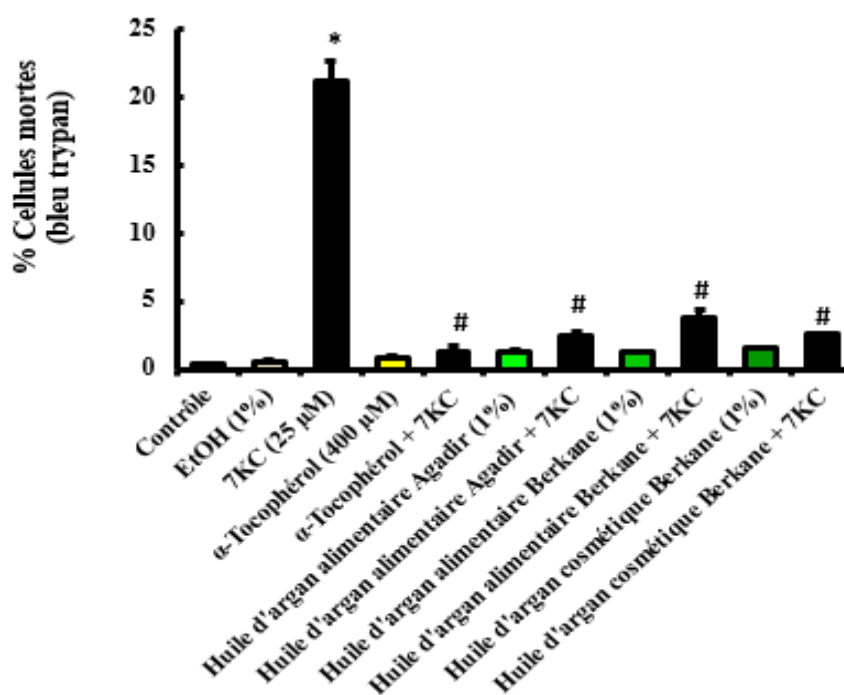
Les cellules 158N sont traitées pendant 24h avec du 7KC (25 µM: 10 µg/mL) en absence et en présence des huiles d'argan ou d'α-tocophérol (400 µM) (2 h de prétraitement). L'observation des cellules 158N a été réalisée par microscopie en contraste de phase.

### **c. Numération cellulaire en présence de bleu trypan**

Le nombre total de cellules 158N viables a été déterminé par coloration au bleu trypan. Ce colorant a tendance à entrer dans toutes les cellules mortes et leur confèrent une couleur bleue alors qu'il est rapidement expulsé par les cellules vivantes qui gardent leur réfringence sous microscope en contraste de phase.

Les cellules ont été prétraitées en présence et en absence de deux types d'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration de 1% de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24h. Après 48h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été collectées, colorées au bleu trypan et un comptage des cellules totales (vivantes et mortes) a été effectué. Une représentation du nombre des cellules viables est montrée dans **Figure 52**.

Dans ces conditions de traitement des cellules 158N, une augmentation significative du pourcentage des cellules mortes a été observée en présence de 7KC (25  $\mu$ M) comparativement aux cellules non traitées (contrôles) (**Figure 52**). Aucune différence n'a été observée entre les cellules non traitées et le véhicule (Ethanol 1%). Le traitement par l'éthanol, est réalisé afin d'évaluer sa toxicité sur le nombre de cellules viables. En présence de deux types d'huiles d'argan alimentaire (Berkane et Agadir) et cosmétiques (Berkane) (1%), ou  $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M), des valeurs similaires à celles du contrôle ont été trouvées. L'effet protecteur des huiles d'argan et  $\alpha$ -tocophérol s'opposent donc à l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par le 7KC.



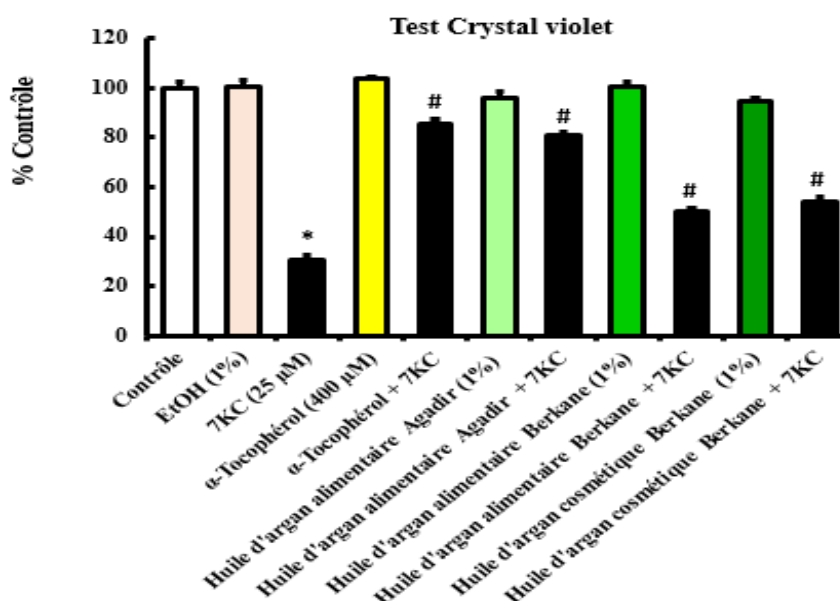
**Figure 52:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur la viabilité cellulaire des oligodendrocytes murins 158N

Le pourcentage de cellules mortes est déterminé par numération au bleu de trypan. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25  $\mu$ M: 10  $\mu$ g/mL) en absence et en présence d'huiles d'argan et / ou d' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) (2 h de prétraitement). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).

#### d. Evaluation de la confluence par coloration au Crystal Violet

L'effet de 7KC sur la confluence et l'adhésion des cellules des 158N a été quantifié par le test au crystal violet. Ce dernier permet d'évaluer l'adhérence ainsi que la prolifération cellulaire. Les cellules 158N ont été cultivées dans des plaques de 6 puits pendant 24 h, prétraitées ou non par deux types de l'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1% et de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M (10  $\mu$ g/mL)) a été ajouté pendant 24 h.

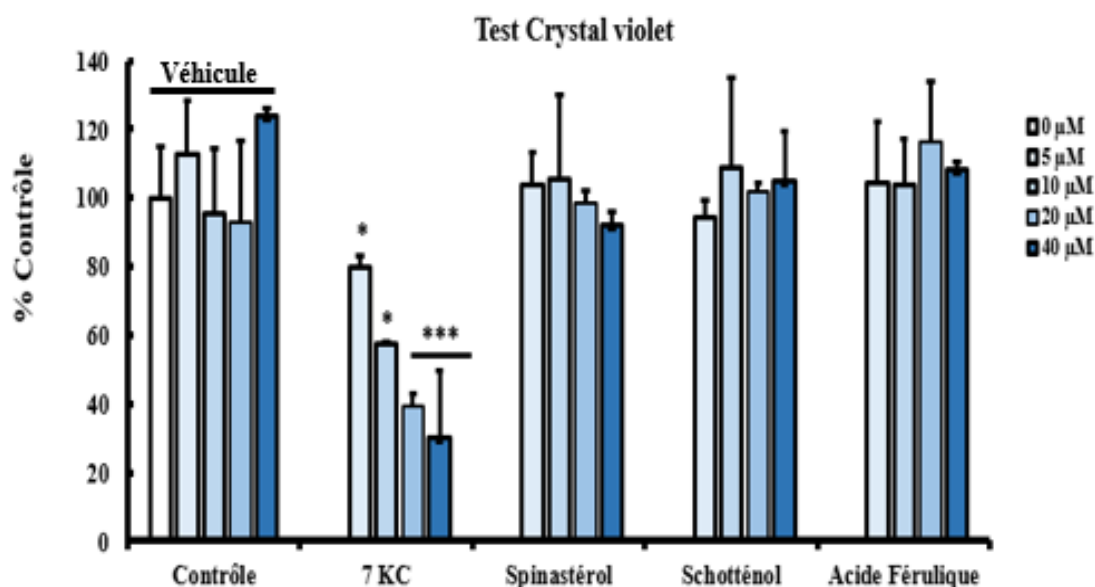
Après 48 h de traitement, une coloration au crystal violet a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures ci dessous. La confluence des cellules 158N diminue significativement suite à leur traitement par 7KC (**Figure 53**). Cette diminution est contrecarrée suite au traitement avec les huiles d'argan ainsi que l' $\alpha$ -tocophérol. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et le véhicule (Ethanol). Les huiles d'argan, lorsqu'elles sont utilisées seules, n'affectent pas l'adhésion ou la prolifération cellulaire par rapport au contrôle. Il en est de même pour l' $\alpha$ -tocophérol. Toutefois, les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol corrigent en partie les effets du 7KC (perte d'adhésion et/ou inhibition de la prolifération cellulaire) (**Figure 53**).



**Figure 53:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan ou et à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'adhérence cellulaire des oligodendrocytes murins 158N

Les effets sur l'adhérence cellulaire sont quantifiés par coloration au crystal violet. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25 µM: 10 µg/mL) en absence et en présence d'huiles d'argan et / ou d' $\alpha$ -tocophérol (400 µM) (2 h de prétraitement). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).

Les cellules 158N sont cultivées dans des plaques de 12 puits pendant 24 h en présence de différentes concentrations de phytostérols (schotténol, spinastérol) et d'acide férulique (5, 10, 20, et 40  $\mu\text{M}$ ) et en présence de 7KC (5, 10, 20, et 40  $\mu\text{g/mL}$  : 12,5; 25; 50 et 100  $\mu\text{M}$ ) (Badreddine *et al.*, 2015). En présence des différentes concentrations de schotténol, spinastérol et acide férulique (5, 10, 20 et 40  $\mu\text{M}$ ) et aussi du 7KC (12,5; 25; 50 et 100  $\mu\text{M}$ ), utilisé comme témoin positif, les résultats montrent qu'aucune différence significative a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et le véhicule (Ethanol) (Figure 54). En présence de 7KC, une inhibition significative de la croissance cellulaire a été observée. Les phytostérols (spinastérol et schotténol) et l'acide férulique ne provoquent pas une inhibition de la croissance cellulaire (Figure 54) (Badreddine *et al.*, 2015)

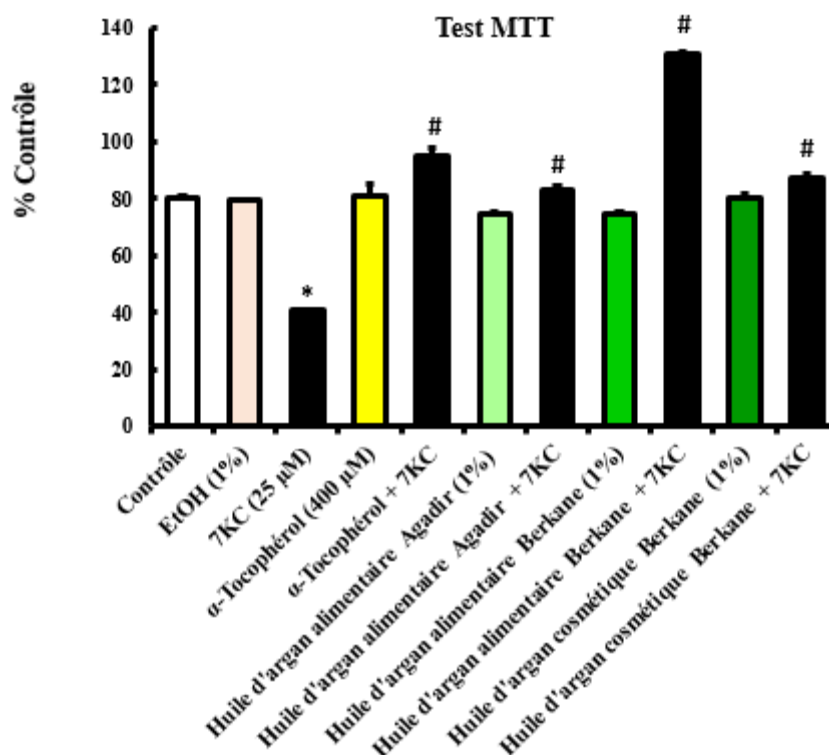


**Figure 54:** Effets de spinastérol, schotténol et acide férulique sur la croissance cellulaire

Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h avec 7KC (utilisé comme témoin positif pour l'induction de la mort cellulaire et les dysfonctionnements mitochondriaux), spinastérol, schotténol et acide férulique (5 ; 10 ; 20 et 40  $\mu\text{M}$ ). La croissance cellulaire a été mesurée par le test au crystal violet. Les valeurs ont été exprimées en % par rapport au contrôle (cellules non traitées). Chaque concentration de ces produits correspond à une concentration du véhicule (0 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,04 et 0,08 d'éthanol absolu pour les concentrations 0 ; 5 ; 10 ; 20 et 40  $\mu\text{M}$ , respectivement). Les résultats obtenus sont analysés par le test ANOVA : \* $P \leq 0,05$  ; \*\* $P \leq 0,01$  ; \*\*\* $P \leq 0,001$  (Badreddine *et al.*, 2015).

Afin d'étudier la cytotoxicité du 7KC, le test MTT a été réalisé sur des oligodendrocytes murins 158N. Ce test donne une indication sur l'activité mitochondriale et la densité cellulaire. Les cellules sont prétraitées en présence et en absence de deux types d'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1%, et d' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M :10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h. Les résultats de ce test montrent qu'en présence de 7KC, une diminution marquée du pourcentage des cellules MTT positives a été observée (**Figure 55**). Ce pourcentage reflète la proportion des cellules capables de réduire le MTT en formazan (couleur bleu) sous l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Les effets secondaires de 7KC ont été atténués par les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol (**Figure 55**). Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle et le véhicule (Ethanol 1%).



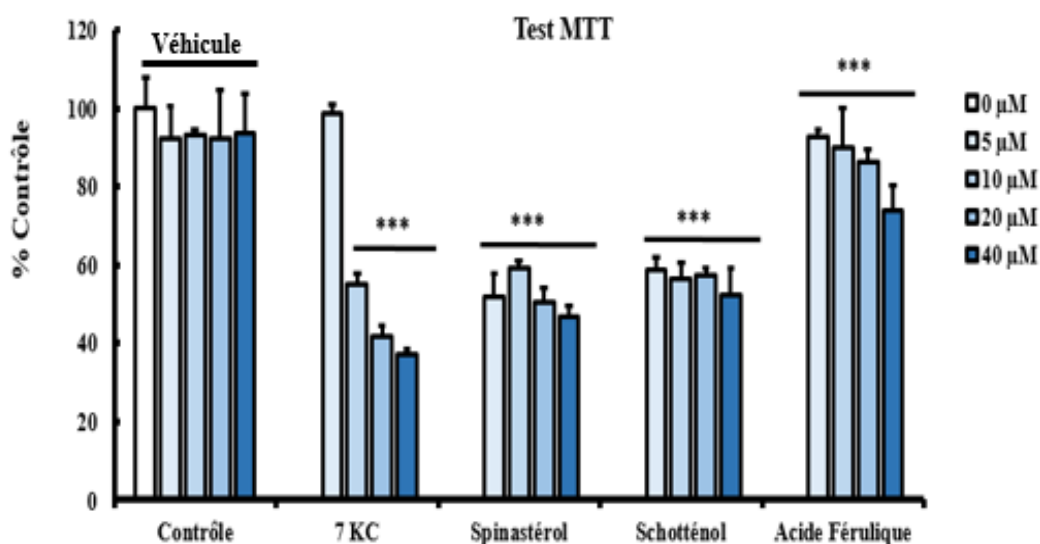


**Figure 55:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan

et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'activité mitochondriale des oligodendrocytes murins 158N. L'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale et ou la croissance cellulaire est déterminée par le test MTT. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25  $\mu$ M: 10  $\mu$ g/mL) en absence et en présence d'huiles d'argan et / ou d' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) (2 h de prétraitement). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).

Pour évaluer l'effet du spinastérol, schotténol et d'acide férulique sur l'activité mitochondriale. Les cellules 158N sont cultivées dans des plaques de 12 puits pendant 24 h en présence de différentes concentrations de phytostérols (schotténol, spinastérol) et d'acide férulique (5, 10, 20, et 40  $\mu$ M) et en présence de 7KC (5, 10, 20, et 40  $\mu$ g/mL : 12,5; 25; 50 et 100  $\mu$ M) (Badreddine *et al.*, 2015). Les résultats montrent qu'en présence des différentes concentrations de schotténol, spinastérol et acide férulique utilisés (5; 10; 20 et 40  $\mu$ M) et aussi du 7KC (12,5; 25; 50 et 100  $\mu$ M), utilisé comme témoin positif, connu pour inhiber la

croissance des cellules et induire des dysfonctionnements mitochondriaux à des concentrations élevées, on note une diminution significative du pourcentage des cellules MTT positives (**Figure 56**). Ce pourcentage reflète la proportion des cellules capables de réduire le MTT en formazan (couleur bleu) sous l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Ces résultats indiquent que ces phytostérols pourraient moduler l'activité mitochondriale (**Badreddine et al., 2015**).



**Figure 56:** Effets du spinastérol, schotténol et d'acide férulique sur l'activité mitochondriale

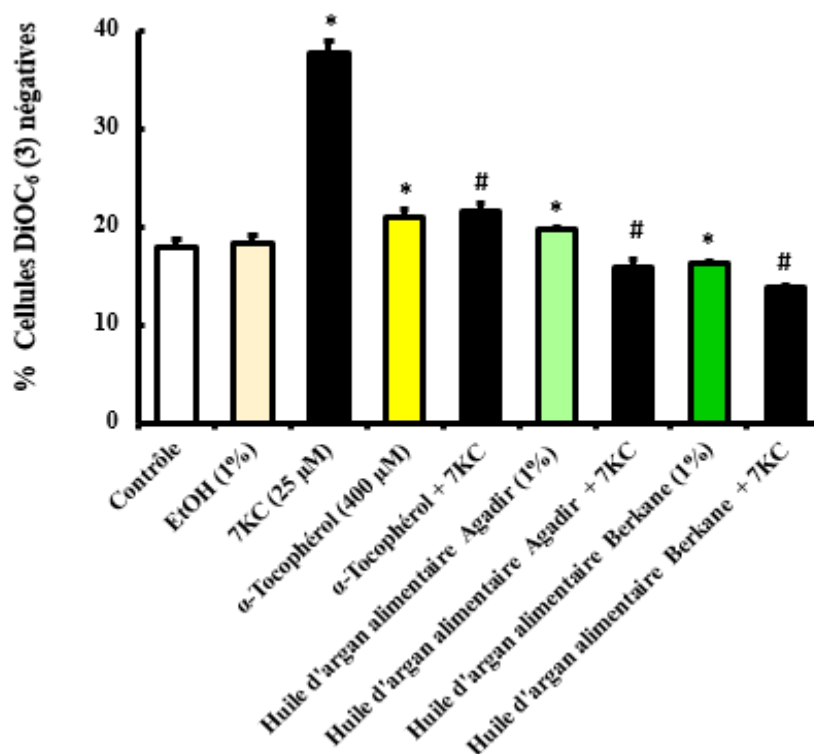
Les cellules 158N ont été traitées pendant 24 h avec 7KC (utilisé comme témoin positif pour l'induction de la mort cellulaire et les dysfonctionnements mitochondriaux), spinastérol, schotténol et acide férulique (5, 10, 20 et 40 µM). L'activité mitochondriale été mesurée par le test MTT. Les valeurs ont été exprimées en % par rapport au contrôle (cellules non traitées). Chaque concentration de produit correspond à une concentration du véhicule (0 ; 0,01 ; 0,02, 0,04 et 0,08 d'éthanol absolu pour les concentrations 0 ; 5 ; 10 ; 20 et 40 µM, respectivement). Les résultats obtenus sont analysés par le test ANOVA : \*\* $P \leq 0,01$  ; \*\*\* $P \leq 0,001$  (**Badreddine et al., 2015**).

Ces résultats montrent un impact des huiles d'argan ou de certains de leurs composés (schotténol, spinastérol) sur la capacité à agir au niveau de l'activité mitochondriale (**Badreddine et al., 2015**).

### 3.2 Effet sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

La mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) est utilisée pour caractériser un désordre de l'activité métabolique mitochondriale et la mort cellulaire à un stade précoce. Le  $\Delta\Psi_m$  a été mesuré par coloration au DiOC<sub>6</sub>(3). L'accumulation de ce fluorochrome dans la mitochondrie dépend du  $\Delta\Psi_m$  ; l'intensité de fluorescence est donc fonction de  $\Delta\Psi_m$ . La perte de la capacité des mitochondries à accumuler cette sonde cationique témoigne de la chute de potentiel membranaire mitochondriale.

Les cellules sont prétraitées en présence et en absence de deux types d'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) à la concentration 1%, et de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h. Après 48 h de traitement, l'analyse des 158N par cytométrie en flux après coloration avec le DiOC<sub>6</sub>(3) a abouti en présence de 7KC à une augmentation significative du pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées ayant un  $\Delta\Psi_m$  diminué (7KC:  $37 \pm 3\%$ , témoin:  $17 \pm 2\%$ ). Lorsqu'ils sont associés à 7KC, les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol diminuent la perte de  $\Delta\Psi_m$  (suggérant une meilleure fonction de la chaîne respiratoire): dans ces conditions, le pourcentage de cellules avec les mitochondries dépolarisées était dans la même gamme que dans le véhicule de contrôle et (Etahnol 1 %) - cellules traitées (**Figure 57**). Aucune différence significative des pourcentages de cellules avec mitochondries dépolarisées n'a été observée entre le contrôle et le véhicule (Ethanol) (**Figure 57**). Les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol, lorsqu'ils sont utilisés seuls, provoquent des modifications légères du pourcentage de cellules avec mitochondries dépolarisées par rapport au contrôle. Les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol ont donc un impact sur la dépolarisation de la mitochondrie.



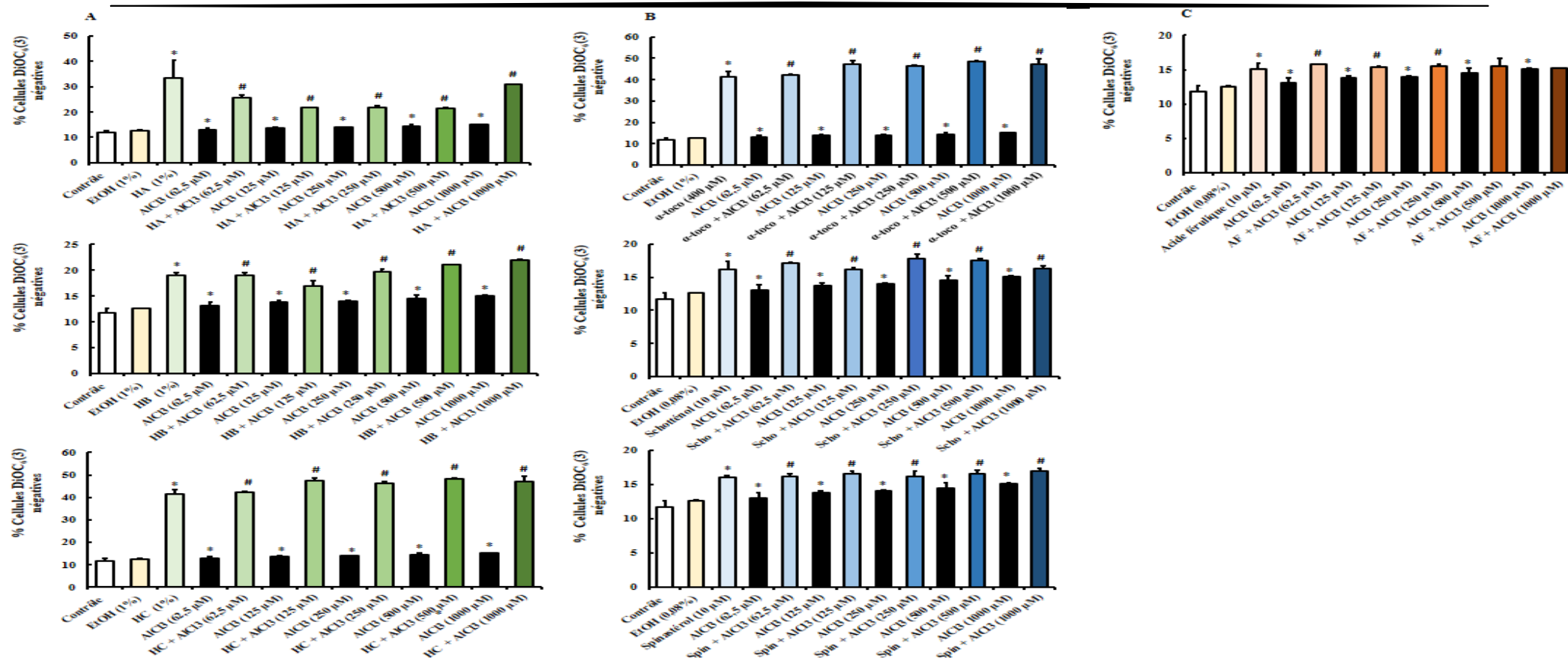
**Figure 57:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol

*sur le potentiel transmembranaire mitochondriale des oligodendrocytes murins 158N*

*Le potentiel transmembranaire mitochondrial est mesuré par DiOC<sub>6</sub>(3) et au cytométrie en flux. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25 µM: 10 µg/mL) en absence et en présence d'huiles d'argan et / ou d' $\alpha$ -tocophérol (400 µM) (2 h de prétraitement). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).*

Pour étudier les effets d' $\text{AlCl}_3$  sur le potentiel transmembranaire mitochondrial, les cellules 158N sont cultivées en boîtes de Petri de 60 x 15 mm pendant 24 h en absence ou en présence de différentes concentrations de chlorure d'aluminium (0; 62,5; 125; 250; 500 et 1000 µM) associées ou non aux phytostérols (schotténol et spinastérol : 10 µM), acide férulique (10 µM),  $\alpha$ -tocophérol (400 µM) et aux huiles d'argan (1 % alimentaire et cosmétique).

L'incubation des cellules 158N avec l' $\text{AlCl}_3$  aux concentrations allant de 62,5 à 1000  $\mu\text{M}$  pendant 48 h et leur analyse par cytométrie en flux après coloration avec le DiOC<sub>6</sub>(3) a montré une augmentation significative et dose dépendante du pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées ayant un  $\Delta\Psi\text{m}$  diminué par rapport au contrôle. Cette dépolarisation est inhibée en présence des huiles d'argan (HA, HB, HC) (**Figure 58**), de l' $\alpha$ -tocophérol, des phytostérols (schotténol et spinastérol), ainsi que de l'acide férulique (**Figure 58**). Aucune différence significative de pourcentages de cellules avec mitochondries dépolarisées n'a été observée entre le contrôle et le véhicule (Ethanol). Lorsque les huiles d'argan, l' $\alpha$ -tocophérol, les phytostérols (schotténol et spinastérol), ainsi que de l'acide férulique sont utilisés seuls, ils provoquent une augmentation significative du pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées par rapport au contrôle.



**Figure 58:** Effet de chlorure d'aluminium associé ou non aux huiles d'argan, à l'α-tocophérol, spinastérol, schotténol et à l'acide férulique sur le potentiel transmembranaire mitochondriale des oligodendrocytes murins 158N

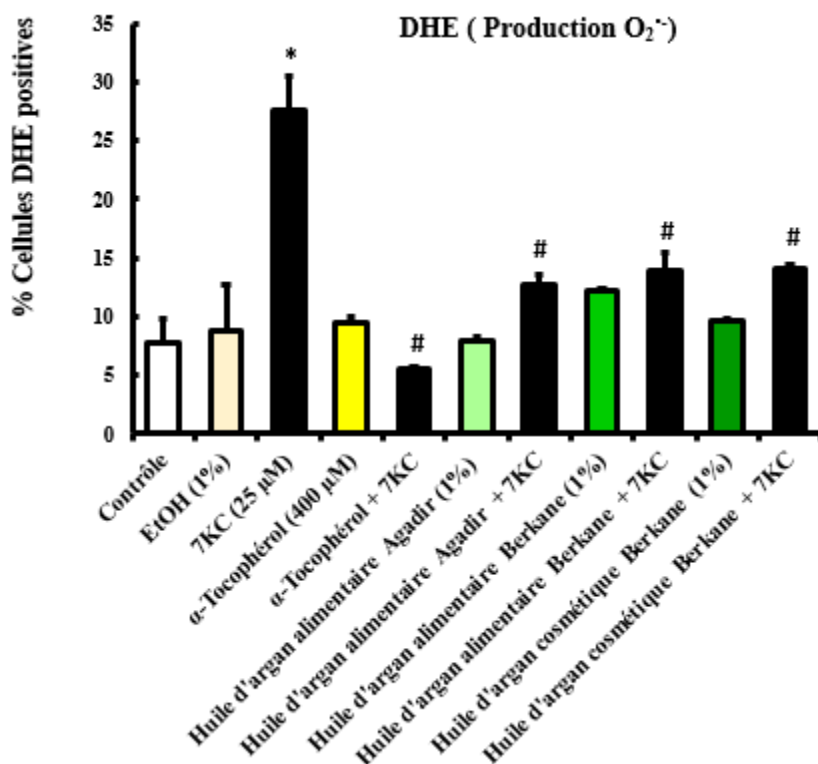
Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan (A), α-Toco, Spin, scho (B) et AF (C) est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par les différentes concentrations d'AlCl<sub>3</sub> ou associés aux huiles d'argan, α-Toco, Spin, schot et AF est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol: EtOH (1 %). HA : Huile d'argan alimentaire d'Agadir, HB : Huile d'argan alimentaire de Berkane, HC : Huile d'argan cosmétique de Berkane, Spin : Spinastérol, Scho : Schotténol, α-Toco : α-Tocophérol, AF : Acide férulique.

#### **4. Effets du 7-cétocholestérol et du chlorure d'aluminium sur le stress oxydant**

##### **a. Evaluation de la production d'anions superoxydes intracellulaires et mitochondriaux**

Les anions superoxydes produits par les cellules 158N traitées ou non par le 7KC ont été mesurés au niveau intracellulaire après coloration respective avec la DHE. La DHE est un composé non-fluorescent qui après sa diffusion à travers la membrane cytoplasmique est oxydé en un composé fluorescent sous l'action d' $O_2^-$ , le composé fluorescent généré permet de quantifier le pourcentage de cellules fluorescentes par analyse au cytomètre en flux. Les cellules 158N ont été cultivées dans des plaques de 6 puits pendant 24 h, prétraitées ou non par deux types de l'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1% et de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M :10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h.

Après 48 h de traitement, une coloration DHE a été réalisée sur les cellules 158N, et analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 59**. Les résultats montrent une augmentation significative du pourcentage des cellules DHE positives après traitement avec 7KC (environ 30%), ce qui reflète une surproduction intracellulaire des anions  $O_2^-$  (**Figure 59**). Aucune différence significative n'est observée entre les cellules contrôles et le véhicule. Le pourcentage des cellules DHE positives est réduit de 50% en présence des huiles d'argan ainsi que l' $\alpha$ -tocophérol (**Figure 59**). Lorsque les huiles d'argan ainsi que l' $\alpha$ -tocophérol sont associés au 7KC, la production intracellulaire des anions  $O_2^-$  est fortement diminuée.



**Figure 59:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur la production des ions superoxydes des oligodendrocytes murins 158N

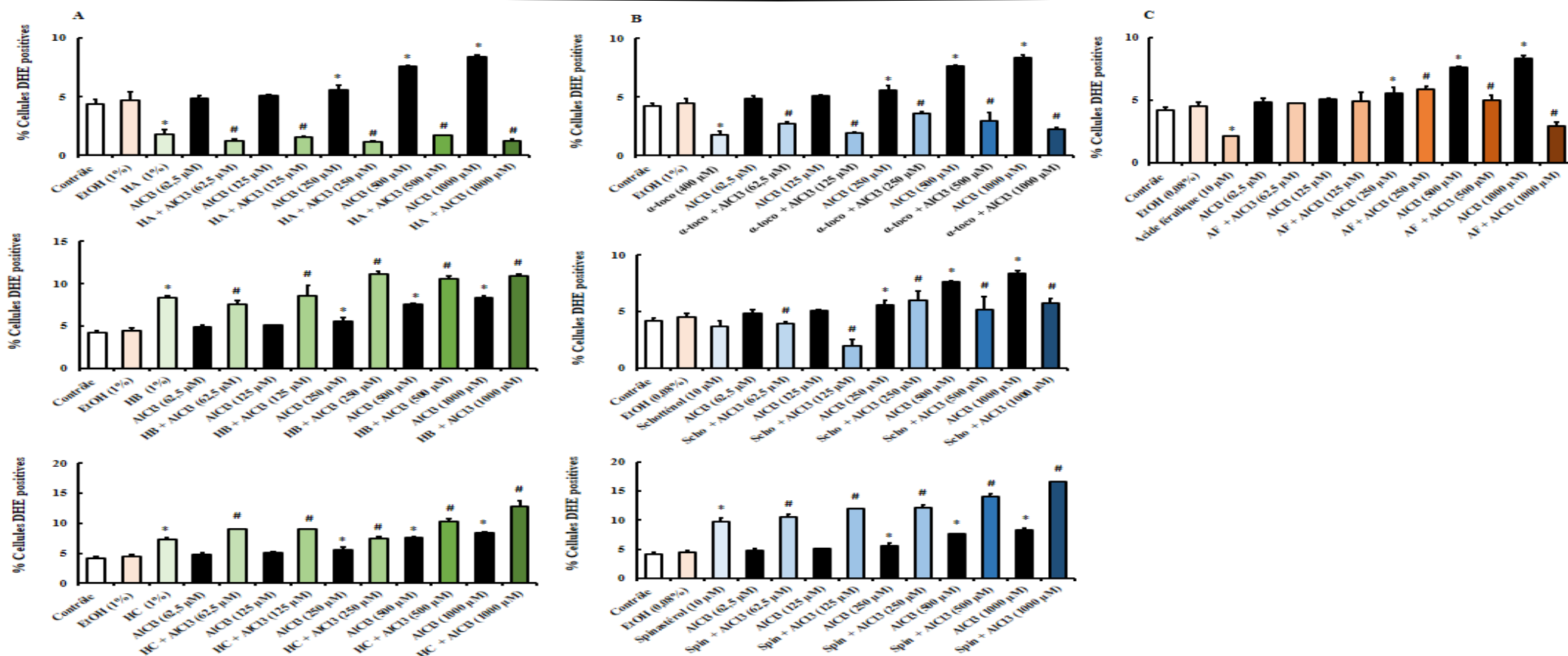
Le pourcentage de cellules produisant les espèces réactives d'oxygène (ERO) est déterminé par la sonde DHE, par cytométrie en flux. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) en absence et en présence d'huiles d'argan et / ou d' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) (2 h de prétraitement). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).

Afin d'étudier les effets d' $\text{AlCl}_3$  sur la production des ERO, les cellules 158N sont cultivées en boîtes de Petri de 60 x 15 mm pendant 24 h en absence ou en présence de différentes concentrations de chlorure d'aluminium (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000  $\mu$ M) associées ou non aux phytostérols (schotténol et spinastérol : 10  $\mu$ M), à l'acide férulique (10  $\mu$ M), à l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) et aux huiles d'argan (1 % alimentaire et cosmétique).



L'incubation de cellules 158N avec l' $\text{AlCl}_3$  aux concentrations allant de 62,5 à 1000  $\mu\text{M}$  pendant 48 h et leur analyse par cytométrie en flux après coloration au DHE montre une augmentation significative et dose dépendante du pourcentage des cellules DHE positives à partir de 250  $\mu\text{M}$  d' $\text{AlCl}_3$  par rapport au contrôle. Cette augmentation est fortement inhibée en présence des huiles d'argan, alimentaire ou cosmétique. Les résultats montrent que l'huile d'argan alimentaire ou cosmétique affecte la production intracellulaire des anions  $\text{O}_2^-$ , ce qui reflète une diminution marquée des cellules DHE positives en présence de l'huile d'argan alimentaire Agadir (HA) et une augmentation significative des cellules DHE positives en présence de l'huile d'argan alimentaire et cosmétique Berkane (HB, HC) comparativement au contrôle (**Figure 60**). Aucune différence significative de pourcentages de cellules DHE positives n'a été observée entre le contrôle et véhicule (Ethanol).

Comme pour les huiles d'argan, les résultats trouvés montrent que certains composants de l'huile d'argan comme l' $\alpha$ -tocophérol, spinastérol, schotténol et l'acide férulique sont capables de s'opposer aux effets de l' $\text{AlCl}_3$ . Cependant, lorsque l' $\alpha$ -tocophérol, spinastérol, schotténol et l'acide férulique sont utilisés seuls, ils affectent la production intracellulaire des anions  $\text{O}_2^-$  ce qui se traduit pas une augmentation des cellules DHE positives par rapport au contrôle (**Figure 60 B-C**). Aucune différence significative de pourcentage de cellules DHE positives n'a été observée entre le contrôle et véhicule (Ethanol).



**Figure 60:** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non aux huiles d'argan, à l'α-tocophérol, schotténol, spinastérol et à l'acide férulique sur la production des ions superoxydes des oligodendrocytes murins 158N

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan (A), α-Toco, Spin, scho (B) et AF (C) est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par les différentes concentrations d'AlCl<sub>3</sub> ou associés aux huiles d'argan, α-Toco, Spin, schot et AF est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol: EtOH (1 %). **HA** : Huile d'argan alimentaire d'Agadir, **HB** : Huile d'argan alimentaire de Berkane, **HC** : Huile d'argan cosmétique de Berkane, **Spin** : Spinastérol, **Scho** : Schotténol, **α-Toco** : α-Tocophérol, **AF** : Acide férulique.

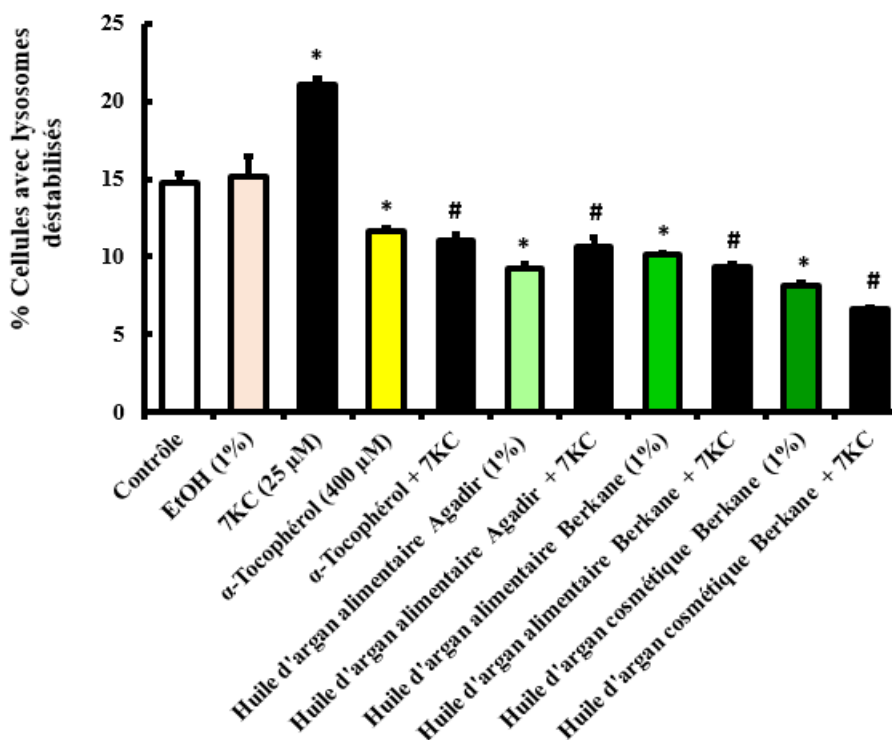
## 5. Evaluation des effets de 7-cétocholestérol sur l'intégrité des lysosomes

L'acridine orange a été utilisée afin d'évaluer l'intégrité des lysosomes dans des conditions de traitement avec 7KC. L'acridine orange est une sonde lysosomotropique, ce qui signifie qu'elle permet de mettre en évidence les vésicules acides telles que les lysosomes en émettant une fluorescence orange/rouge dans ces derniers qui ont un pH acide alors que la sonde aura plutôt une fluorescence verte dans le cytoplasme qui a un pH neutre. La quantité de fluorescence orange/rouge est donc proportionnelle au volume et à la quantité de compartiments acides dans la cellule. La perméabilisation de la membrane lysosomale et/ou la diminution de l'activité des pompes à protons se caractérise par une diminution de cette fluorescence du fait de la libération du contenu lysosomal dans le cytoplasme.

Les cellules 158N ont été cultivées dans des plaques de 6 puits pendant 24 h, prétraitées ou non par deux types de l'huile d'argan alimentaire (Agadir et Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1% de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h. Après 48 h de traitement, une coloration à l'acridine orange a été réalisée sur les cellules 158N, et analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 61**.

L'analyse par cytométrie a révélé aucune différence significative entre le contrôle et le véhicule. Par contre, une déstabilisation significative des lysosomes des cellules 158N traitées par le 7KC a été observée avec des intensités de fluorescence orange / rouge plus faibles comparativement au contrôle : les cellules avec des intensités de fluorescence orange / rouge plus faibles sont considérées comme des cellules avec lysosomales déstabilisées (**Olsson *et al.*, 1989; Yuan *et al.*, 2000**).

Dans ces conditions, en présence du 7KC, une augmentation légère mais significative des cellules avec des lysosomes déstabilisés a été observée (cellules contrôles et véhicule : 14-15% versus cellules traitées avec 7KC :  $22 \pm 1\%$ ). Aucune différence significative entre le contrôle et le véhicule a été observée. Les huiles d'argan, lorsqu'elles sont utilisées seules, on note une diminution légère mais significative du pourcentage des cellules avec des lysosomes déstabilisés comparativement au contrôle. Des effets similaires ont été observés avec l' $\alpha$ -tocophérol. Lorsque le 7KC est associé aux huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol, le pourcentage des cellules avec lysosomes déstabilisés ont une valeur proche de celle du contrôle (7KC + huiles argan ou 7KC +  $\alpha$ -tocophérol). On note également que les huiles d'argan ainsi que l' $\alpha$ -tocophérol s'opposent à la déstabilisation des lysosomes (**Figure 61**).



**Figure 61:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l'α-tocophérol sur l'activité des lysosomes des oligodendrocytes murins 158N

La formation des vésicules acides est déterminée par l'acridine orange et ~~est~~ cytométrie en flux. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25 µM : 10 µg/mL) en absence et en présence d'huiles d'argan et / ou d'α-tocophérol (400 µM) (2 h de prétraitement). Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l'α-tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l'α-tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol

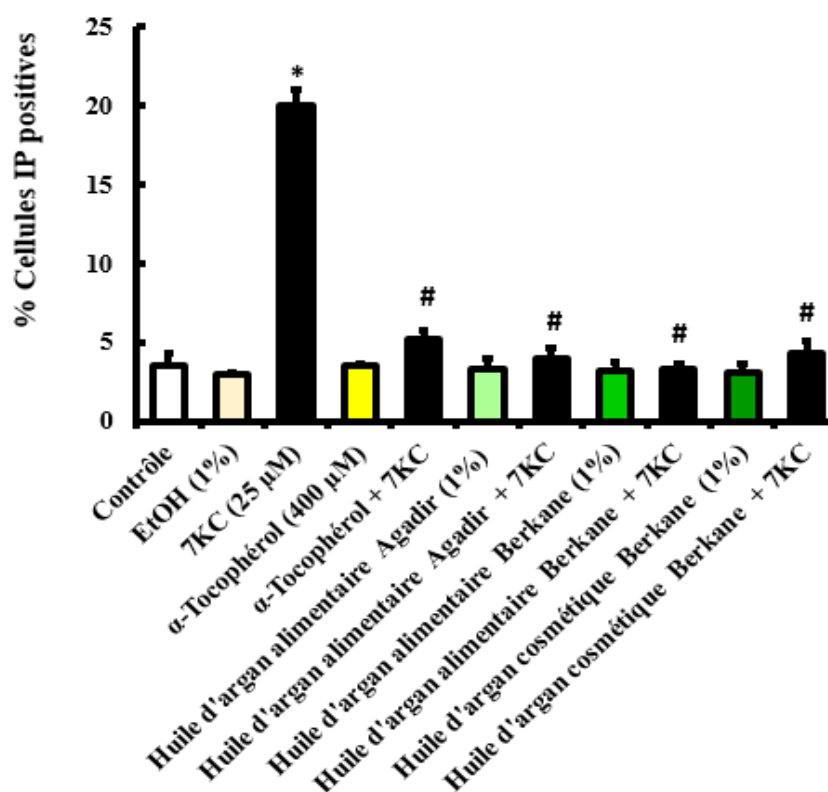
## 6. Caractérisation de la mort cellulaire induite par le 7-cétocholestérol et le chlorure d'aluminium

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

L'iodure de propidium (IP) est un colorant qui ne pénètre que dans les cellules ayant des membranes altérées. L'IP permet d'évaluer les effets d'un traitement sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique. Seules les cellules mortes sont colorées par l'IP. La perméabilisation de la membrane cytoplasmique se caractérise par une augmentation de la

fluorescence émise par les cellules qui ont accumulé l'IP. Les cellules 158N ont été cultivées dans des plaques de 6 puits pendant 24 h, prétraitées ou non par deux types de l'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1% et de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M: 10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h. Ensuite, une coloration à l'IP a été réalisée sur les cellules mises en suspension et les cellules ont été analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 62**.

L'incubation des cellules 158N pendant 48 h avec 7KC a induit une augmentation du pourcentage de cellules mortes (**Figure 62**). Les résultats montrent le même profil que celui obtenu avec le crystal violet. Les résultats montrent qu'il n'y a aucune significativité observée entre les cellules contrôles et le véhicule. Les huiles d'argan ainsi que l' $\alpha$ -tocophérol s'opposent à la mort cellulaire induite par 7KC.

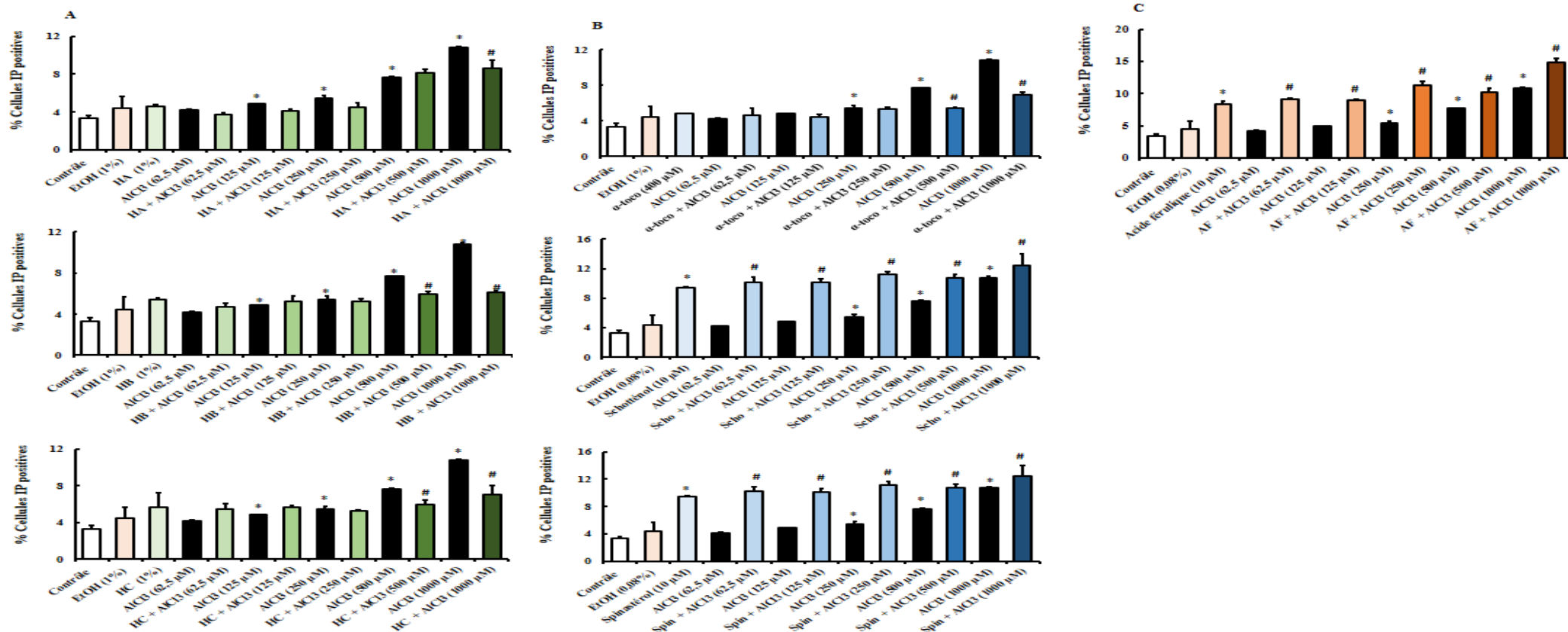


**Figure 62:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes murins 158N. Le pourcentage de cellules viables est déterminé par coloration d'iodure de propidium et au cytométrie en flux. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) en absence et en présence d'huiles d'argan et / ou d' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) (2 h de prétraitement). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).

Pour étudier les effets d' $\text{AlCl}_3$  sur la mort cellulaire, les cellules 158N sont cultivées en boîtes de Petri de 60 x 15 mm pendant 24 h en absence ou en présence de différentes concentrations de chlorure d'aluminium (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000  $\mu$ M) associées ou non aux phytostérols (schotténol et spinastérol : 10  $\mu$ M), acide férulique (10  $\mu$ M),  $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) et aux huiles d'argan (1 % alimentaire et cosmétique).

L'incubation de cellules 158N avec l' $\text{AlCl}_3$  aux concentrations allant de 62,5 à 1000  $\mu\text{M}$  pendant 48 h et leur analyse par cytométrie en flux après coloration à l'IP a montré une augmentation significative des cellules IP positives à partir de 125  $\mu\text{M}$  de traitement avec l' $\text{AlCl}_3$ . Cette augmentation est inhibée en présence de l'huile d'argan alimentaire Agadir (HA), l'huile d'argan alimentaire Berkane (HB) et l'huile d'argan cosmétique Berkane (HC) (**Figure 63 A**). Aucune différence significative de pourcentages de cellules IP positives n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôles) et véhicule (Ethanol).

Dans ces mêmes conditions, l'augmentation des cellules IP positives est fortement atténuée en présence d' $\alpha$ -tocophérol, spinastérol, schotténol et d'acide férulique. Les résultats montrent que lorsque le spinastérol, schotténol et l'acide férulique sont utilisés seuls, ils provoquent aussi, une augmentation significative du pourcentage des cellules IP positives (**Figure 63 B-C**).



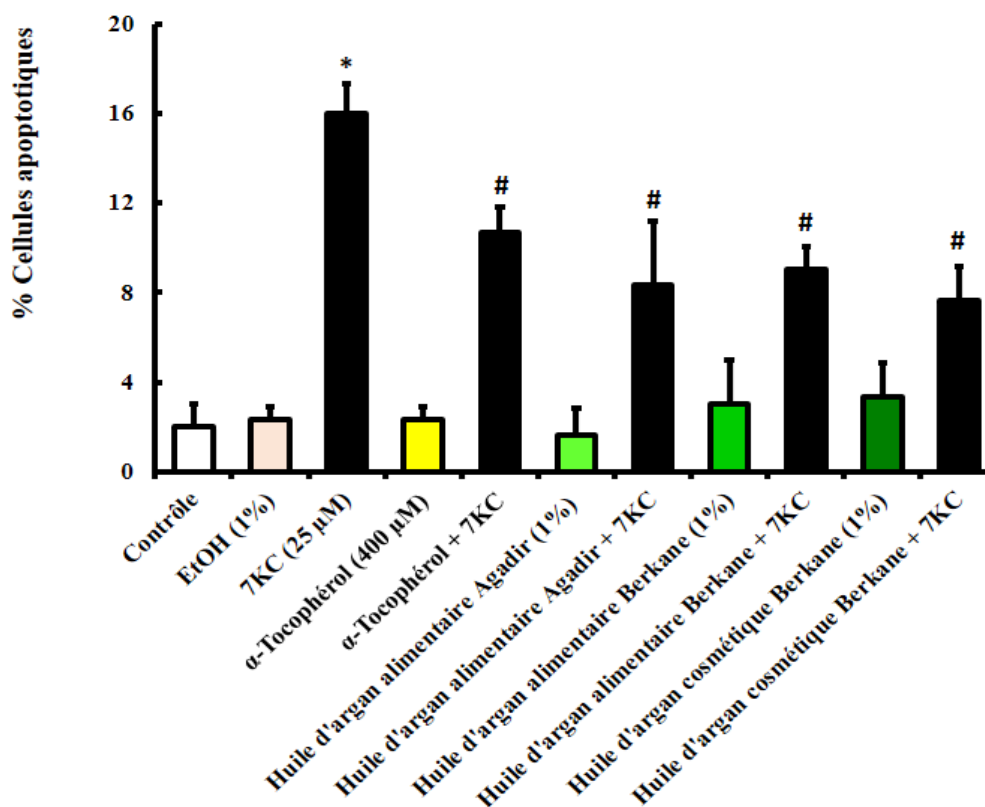
**Figure 63:** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non avec les huiles d'argan, à l'α-tocophérol, schottérol, spinastérol et à l'acide férulique sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes murins 158N

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan (A), α-Toco, Spin, scho (B) et AF (C) est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par les différentes concentrations d'AlCl<sub>3</sub> ou associés aux huiles d'argan, α-Toco, Spin, schot et AF est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol: EtOH (1 %). **HA** : Huile d'argan alimentaire d'Agadir, **HB** : Huile d'argan alimentaire de Berkane, **HC** : Huile d'argan cosmétique de Berkane, **Spin** :Spinastérol, **Scho** : Schottérol, **α-Toco** : α-Tocophérol, **AF** : Acide férulique.



### 6.2 Effet du 7-cétocholestérol sur la fragmentation nucléaire

L'apoptose se caractérise par certains changements morphologiques, comme la diminution du volume cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation des noyaux et l'apparition de vésicules intracellulaires nommées corps apoptotiques. Afin de déterminer le type de mort, les cellules ont été cultivées dans des plaques de 6 puits pendant 24 h, prétraitées ou non par deux types de l'huile d'argan alimentaire (Agadir et Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1%, d' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h; puis le 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h. Ensuite, une coloration au Hoechst 33342 a été réalisée et les noyaux ont été observés au microscope à fluorescence. Les images des noyaux de cellules traitées avec les huiles d'argan ainsi que l' $\alpha$ -tocophérol ne montrent aucune modification comparativement aux cellules contrôles et au véhicule. Les noyaux gardent leur forme ronde, circulaire et ne présentent, ni condensation de la chromatine, ni fragmentation caractéristiques de l'apoptose. À l'opposé, en présence de 7KC, quelques cellules apoptotiques sont observées et se caractérisent par une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire. Toutefois, la **figure 64** montre qu'en présence du 7KC, une augmentation légère mais significative de cellules apoptotiques caractérisées par des noyaux condensés et / ou fragmentés sont observées (contrôle et véhicule : 3-4 % ; cellules traitées avec 7KC :  $16 \pm 2$ ). Aucune différence entre les cellules témoins et le véhicule n'a été détecté (**Figure 64**). En présence d'huiles d'argan alimentaires ou l' $\alpha$ -tocophérol, une diminution significative du pourcentage de cellules apoptotiques a été observée. Ainsi, les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol ont été capables de s'opposer aux changements morphologiques nucléaires induits par le 7KC (condensation et / ou la fragmentation des noyaux) qui sont des critères apoptotiques.



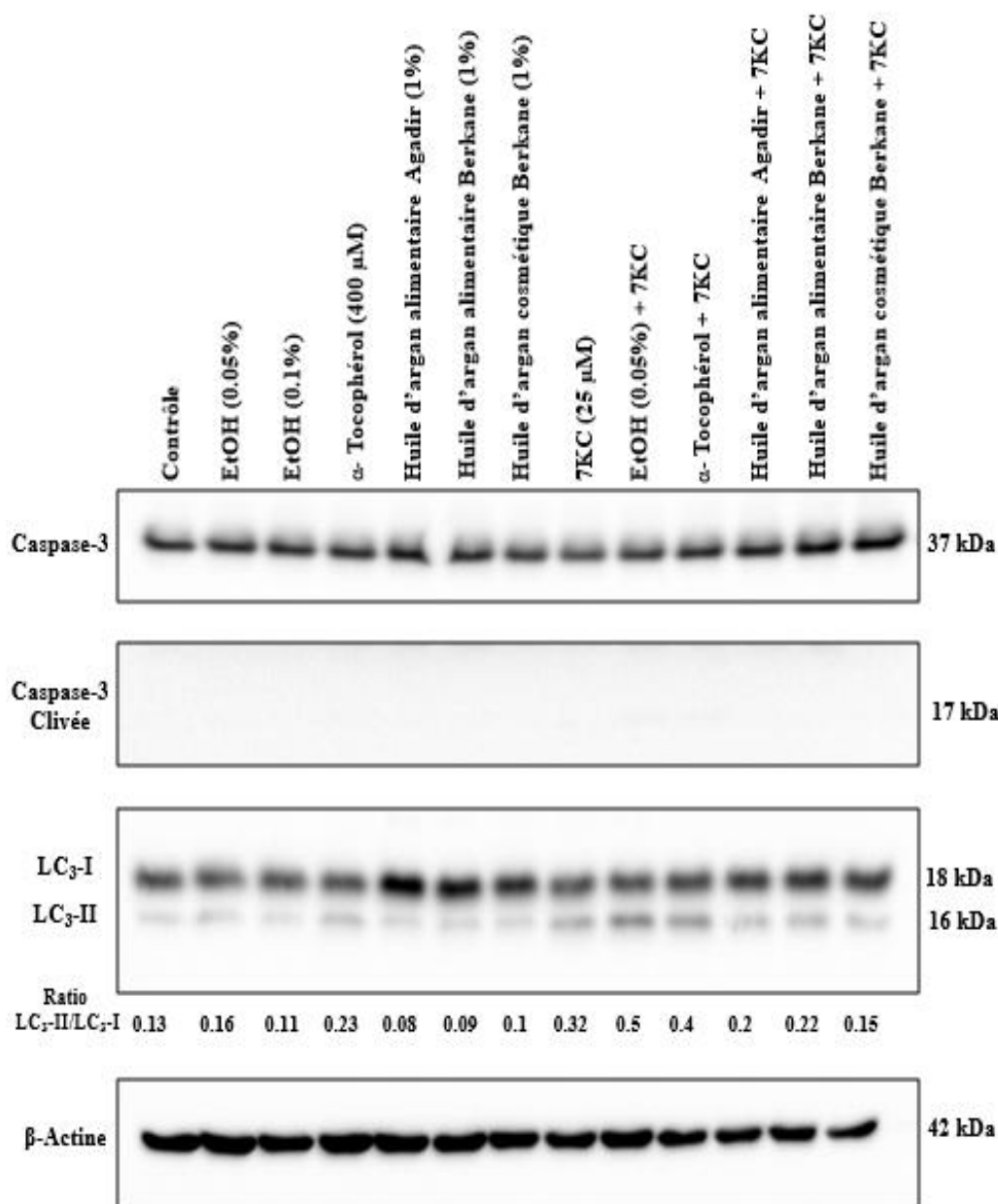
**Figure 64:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur la fragmentation nucléaire induite sur les oligodendrocytes murins 158N. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) en absence et en présence d'huiles d'argan et / ou d' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) (2 h de prétraitement). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences différentes. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).

### 6.3 Effets du 7-cétocholestérol sur l'apoptose et l'autophagie

Deux types de mort cellulaire ont été étudiés par western blot : l'apoptose et l'autophagie. En ce qui concerne l'apoptose, les caspases jouent un rôle clé dans les phases d'initiation et d'exécution de l'apoptose. La caspase-3 a été étudiée et notamment le clivage de la caspase-3. La caspase-3 est une protéine effectrice dont le clivage est induit lors du processus apoptotique. Lorsque la caspase-3 est activée, elle forme des tétramères qui vont cliver certaines protéines de la cellule et conduire à la mort cellulaire programmée. Pour ce qui est de l'autophagie, c'est la protéine LC3 qui est mise en évidence par western blot. En

effet, la protéine LC3 est impliquée dans le processus d'autophagie au niveau de la formation des autophagosomes. On trouve la forme LC3-I dans le cytoplasme (18 kDa) qui est activée en LC3-II (16 kDa) pendant le processus d'autophagie.

Les cellules 158N ont été cultivées pendant 24 h, prétraitées ou non par deux types de l'huile d'argan alimentaire (Agadir – Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1% de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h. Ensuite, selon les conditions de western blot, la caspase-3 non clivée donne une bande de 35 kDa et la forme clivée donne une bande de 17 kDa. Les résultats sont présentés dans la **Figure 65**. Après 48 h de traitement, les résultats des western blots montrent qu' en présence du 7KC (25  $\mu$ M), aucune induction d'apoptose caractérisé par la présence de caspase-3 a été observée comparativement au contrôle et au véhicule (éthanol : 0,05 et 0,1%). En outre, aucun effet pro-apoptotique des huiles d'argan ont été observés : absence de caspase-3 (**Figure 65**). Ainsi le calcul du ratio LC3-II / LC3-I permet de déterminer si de l'autophagie se déclenche dans les cellules ou non. En présence du 7KC (25  $\mu$ M) une induction d'autophagie a été révélée par augmentation du rapport [LC3-II / LC3-I] comparativement aux cellules contrôles (**Figure 65**). Cependant, avec l' $\alpha$ -tocophérol une légère augmentation du ratio [LC3-II / LC3-I] a été détectée (**Figure 65**). Quand 7KC est associé à l' $\alpha$ -tocophérol, le rapport [LC3-II / LC3-I] est légèrement supérieure à celui du 7KC. A l'opposé, lorsque 7KC est associé aux huiles d'argan (alimentaire et ou cosmétique), le rapport LC3-II / LC3-I a été légèrement inférieur à 7KC (**Figure 65**). Aucun effet pro-autophagiques des huiles d'argan a également été observé.



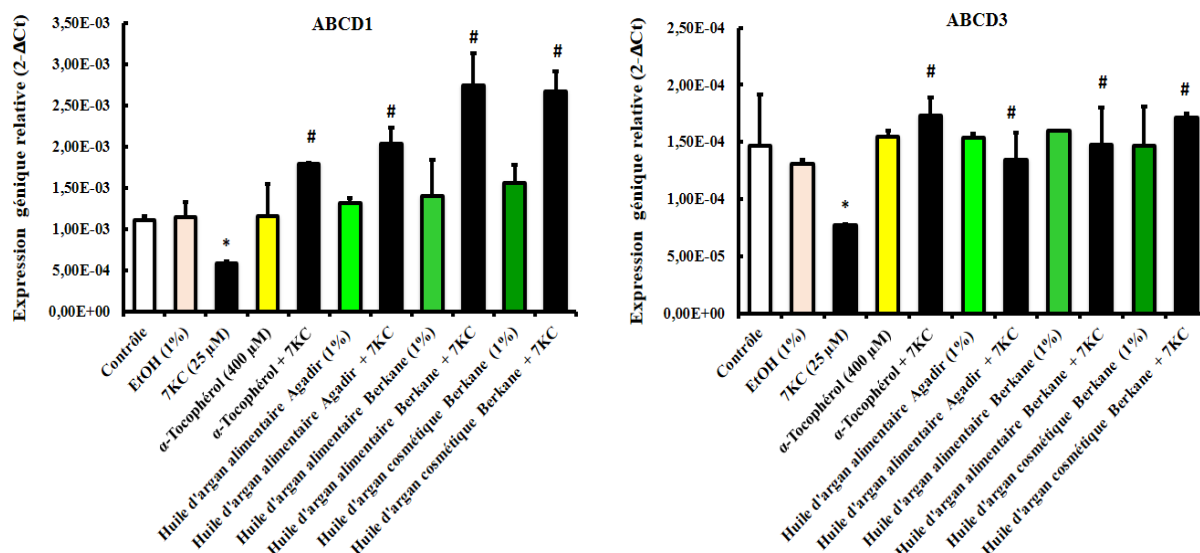
**Figure 65:** Effet de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou de l'α-tocophérol sur l'apoptose et l'autophagie induite sur les oligodendrocytes murins 158N. Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25 μM : 10 μg/mL absence et ou en présence d'huiles d'argan ou de l'α-tocophérol (400 μM) (2 h de prétraitement). L'apoptose et l'autophagie sont caractérisées par western blotting. L'apoptose est évaluée par le clivage de la caspase-3 (bande à 17 kDa) et l'autophagie est évaluée par la conversion de LC<sub>3</sub>-I en LC<sub>3</sub>-II. Le véhicule est l'éthanol 1% (véhicule des huiles d'argan et l'α-tocophérol), et 0,05% (véhicule 7KC). Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type de trois expériences différentes.

### **7. Impact du 7-cétocholestérol sur le niveau d'expression de gène peroxysomale : ABCD1, ABCD3, ACOX1, MFP2 et PPAR $\alpha$**

Les transporteurs Abcd de type (ABCD1 et ABCD3), l'enzyme Acyl-CoA oxydase1 (ACOX1), et la protéine-2 multifonctionnelle (MFP2), également connu sous le nom de protéine D-bifonctionnelle, sont des protéines peroxysomales. ABCD1 et ABCD3 sont impliqués dans le transport des AGTLC du cytosol vers le peroxysomes pour leur dégradation par la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale en faisant appel aux oxydases centrales ACOX1 et MFP2. Les PPAR $\alpha$  sont des activateurs des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de certaines enzymes de la voie de  $\beta$ -oxydation peroxysomale et mitochondriale. Parmi ces gènes cibles, l'Acyl-CoA oxydase (ACOX1) qui est la cible directe de la PPAR $\alpha$ .

Les cellules 158N ont été cultivées dans des boîtes de Petri (100 x 20 mm), pendant 24 h, prétraitées ou non par deux types de l'huile d'argan alimentaire (Agadir et Berkane) et cosmétique (Berkane) à la concentration 1% et de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) pendant 2 h, puis le 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) a été ajouté pendant 24 h. Après 48 h de traitement, le taux d'expression d'ARNm des protéines peroxysomales (ABCD1, ABCD3, ACOX1, MFP2 et PPAR $\alpha$ ) a été déterminé par RT-qPCR.

Les résultats montrent que le taux d'expression d'ARNm des transporteurs peroxysomaux (ABCD1, ABCD3), est nettement plus faible dans les cellules traitées avec 7KC (25  $\mu$ M), comparativement aux cellules non traitées (contrôles) (**Figure 66**). En présence des huiles d'argan et d' $\alpha$ -tocophérol, la diminution du taux d'expression d'ARNm d'ABCD1 et ABCD3 est fortement atténuée quel que soit l'huile considérée. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules contrôles et le véhicule (Ethanol) (**Figure 66**).



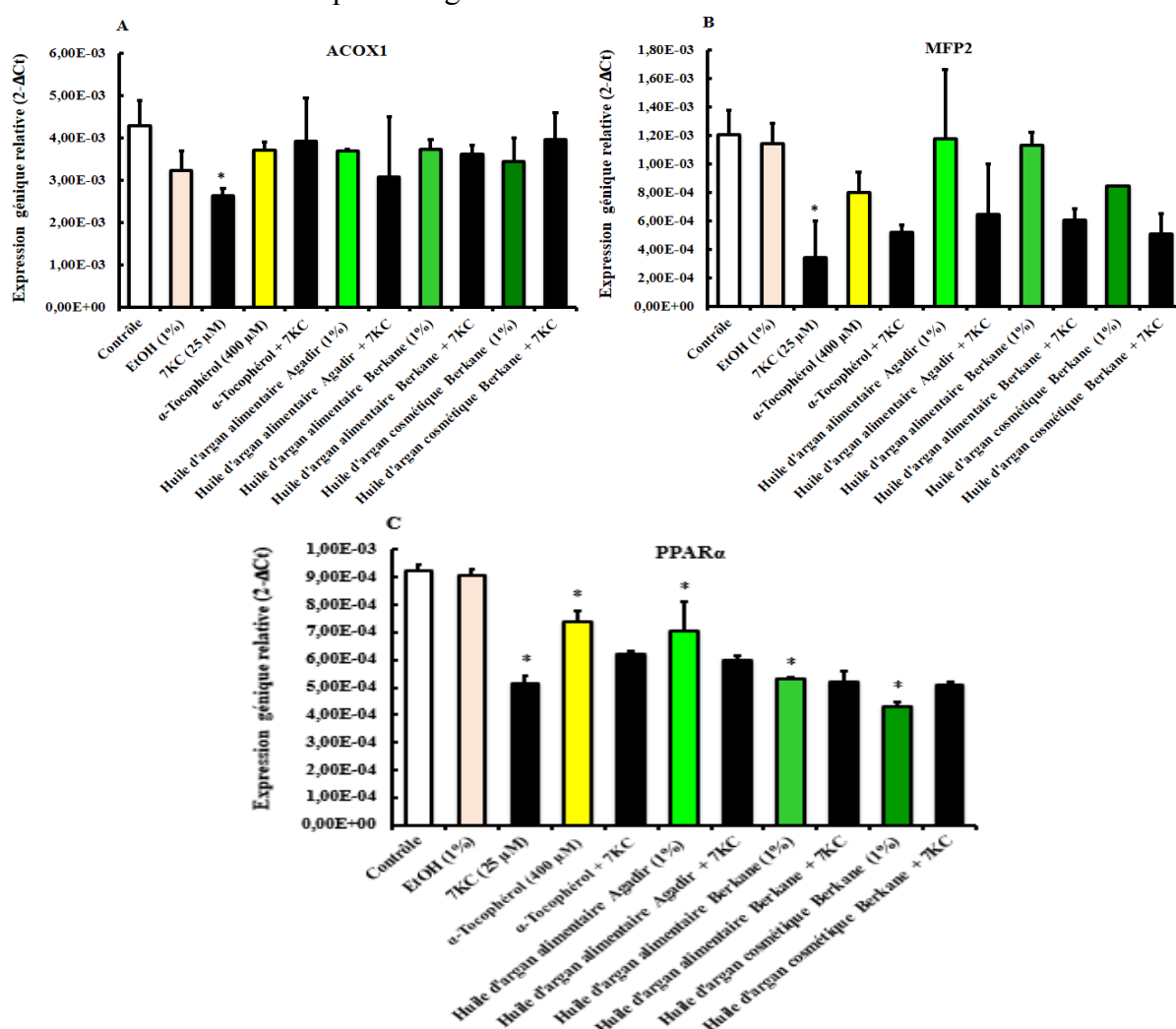
**Figure 66:** Incidence du 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'expression des ARNm des gènes ABCD1, ABCD3 sur les oligodendrocytes murins 158N

Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) en absence et ou en présence d'huiles d'argan ou de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) (2 h de prétraitement). Les ARNm des transporteurs peroxysomals (ABCD1 et ABCD3) ont été quantifiés par RT-qPCR. À cette fin, 36B4 a été utilisé comme gène de référence. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).

L'acyl-CoA oxydase (ACOX) est l'enzyme clé de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale. Elle catalyse la première réaction dans le cycle de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, qui est considérée être la principale étape enzymatique qui contrôle le flux des acides gras à travers cette voie (Poirier *et al.*, 2006). Cette étape sera suivie d'une deuxième réaction catalysée par une protéine-2 multifonctionnelle (MFP2). Notons que l'ACOX1 est codée par un gène cible directe du facteur de transcription PPAR $\alpha$  (Pyper *et al.*, 2010).

L'évaluation des taux d'expression relatif des ARNm de l'ACOX1 et MFP2 a montré que le traitement des cellules avec 7KC induit une diminution significative par rapport aux cellules non traitées (contrôles). En présence des huiles d'argan et d' $\alpha$ -tocophérol, aucune différence significative n'a été observée. Il est à noter que la composition de l'huile d'argan affecte d'une manière différentielle les expressions d'ARNm PPAR $\alpha$  (Figure 67). Cette

donnée montre que les traitements avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol indiquent des variations des expressions au niveau des ARNm PPAR $\alpha$ , mais elle ne nous renseigne pas sur les niveaux de la transcription du gène codant de l'ACOX1 au niveau des cellules 158N.



**Figure 67:** Incidence de 7-cétocholestérol associé ou non aux huiles d'argan et ou à l' $\alpha$ -tocophérol sur l'expression des ARNm des gènes PPAR $\alpha$ , ACOX1 et MFP2 sur les oligodendrocytes murins 158N

Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25  $\mu$ M : 10  $\mu$ g/mL) en absence et ou en présence d'huiles d'argan ou de l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) (2 h de prétraitement). Les ARNm des enzymes peroxysomales : ACOX1(A) et MFP2) (B) ainsi que la PPAR- $\alpha$  (C) ont été quantifiés par RT-qPCR. À cette fin, 36B4 a été utilisé comme gène de référence. La significativité entre le véhicule et les cellules traitées avec les huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par le 7KC seul ou associé avec huiles d'argan et l' $\alpha$ -tocophérol est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Pas de différence significative entre le contrôle et l'éthanol (EtOH 1 %).

### III. In vivo

Cette étude a pour but d'évaluer les conséquences d'une exposition des rats qui ont reçu pendant 42 jours, une nourriture enrichie de 6 % d'huile d'argan, huile d'olive, huile de colza et de la poudre d'amande d'arganier. Ces rats ont reçu en parallèle une concentration de chlorure d'aluminium de 100 mg/kg poids corporel. L'âge étant un facteur qui peut influencer les fonctions cognitives et les réponses au stress oxydant, les rats ~~on été âgés en moyenne de~~ utilisés avaient en moyenne un âge de deux ans.

#### 1. Accumulation de chlorure d'aluminium dans l'hippocampe, cortex et foie

Afin de déterminer si notre traitement avec le chlorure d'aluminium à la dose journalière (100 mg/kg) pendant 42 jours est capable d'induire une accumulation d'AlCl<sub>3</sub>, un dosage de l'aluminium dans les organes cibles était envisageable par spectroscopie d'émission atomique par plasma à coulage inductif (ICP-AES), et les valeurs obtenues sont représentées dans le **tableau 18**. Les résultats montrent que les rats traités avec l'AlCl<sub>3</sub> sont capables d'accumuler cet élément, dans le foie et dans deux zones du cerveau (hippocampe et cortex). L'accumulation d'AlCl<sub>3</sub> dans le foie est beaucoup plus faible comparativement aux autres zones du cerveau

**Tableau 18:** Concentration en aluminium en (µg/kg de tissu frais) dans l'hippocampe, cortex et foie

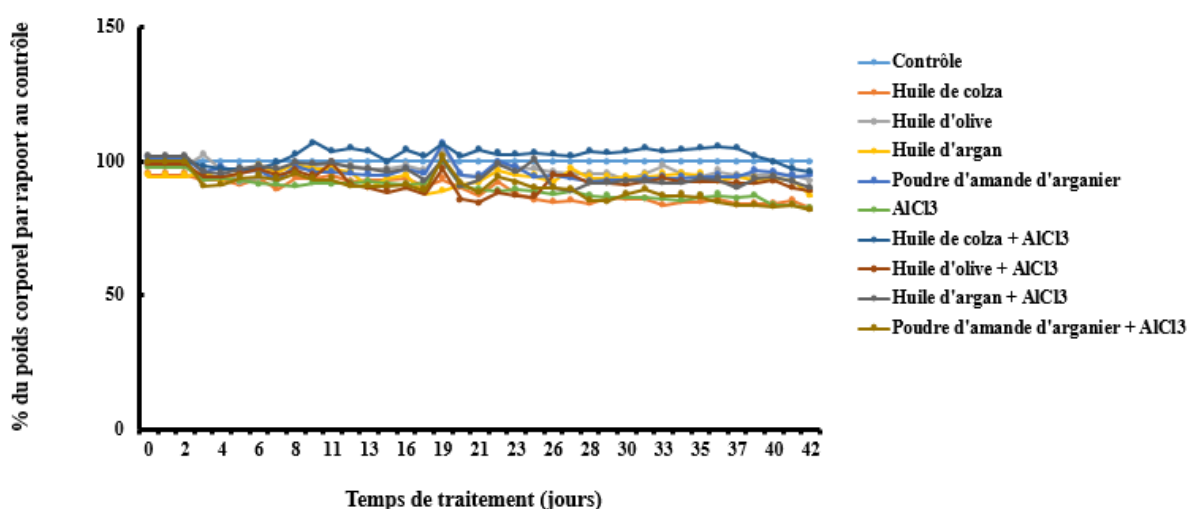
<b>µg/kg tissu frais</b> <b>Tissus étudiés</b>	<b>Rats contrôles</b>	<b>Rats traités au AlCl<sub>3</sub></b> <b>(100 mg/kg)</b>
Hippocampe	780,25	2307,05 *
Cortex	2832,20	3587,9 *
Foie	134,62	424,95 *

Les rats ont reçu AlCl<sub>3</sub> par gavage à une dose de (100 mg/kg) pendant 42 jours. Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type sur les animaux de chaque lot (n=4). La significativité entre les rats contrôles et les rats traités avec le chlorure d'aluminium est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ .



## 1. Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur l'évolution du poids corporel

Avant chaque traitement, les rats ont été pesés. Le poids de chaque rat est consigné et son évolution en fonction du traitement est observée pendant 42 jours. Les quatre régimes utilisés dans cette étude (huile d'argan, colza, olive et poudre d'amande d'arganier), ont été bien tolérés et la consommation journalière de nourriture a été similaire dans chaque groupe. Après six semaines de traitement avec le chlorure de l'aluminium, une perte du poids corporel a été observée entre les 10 groupes (**Figure 78**).



**Figure 68:** Influence du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et à la poudre d'amande d'arganier sur la variation du poids corporel

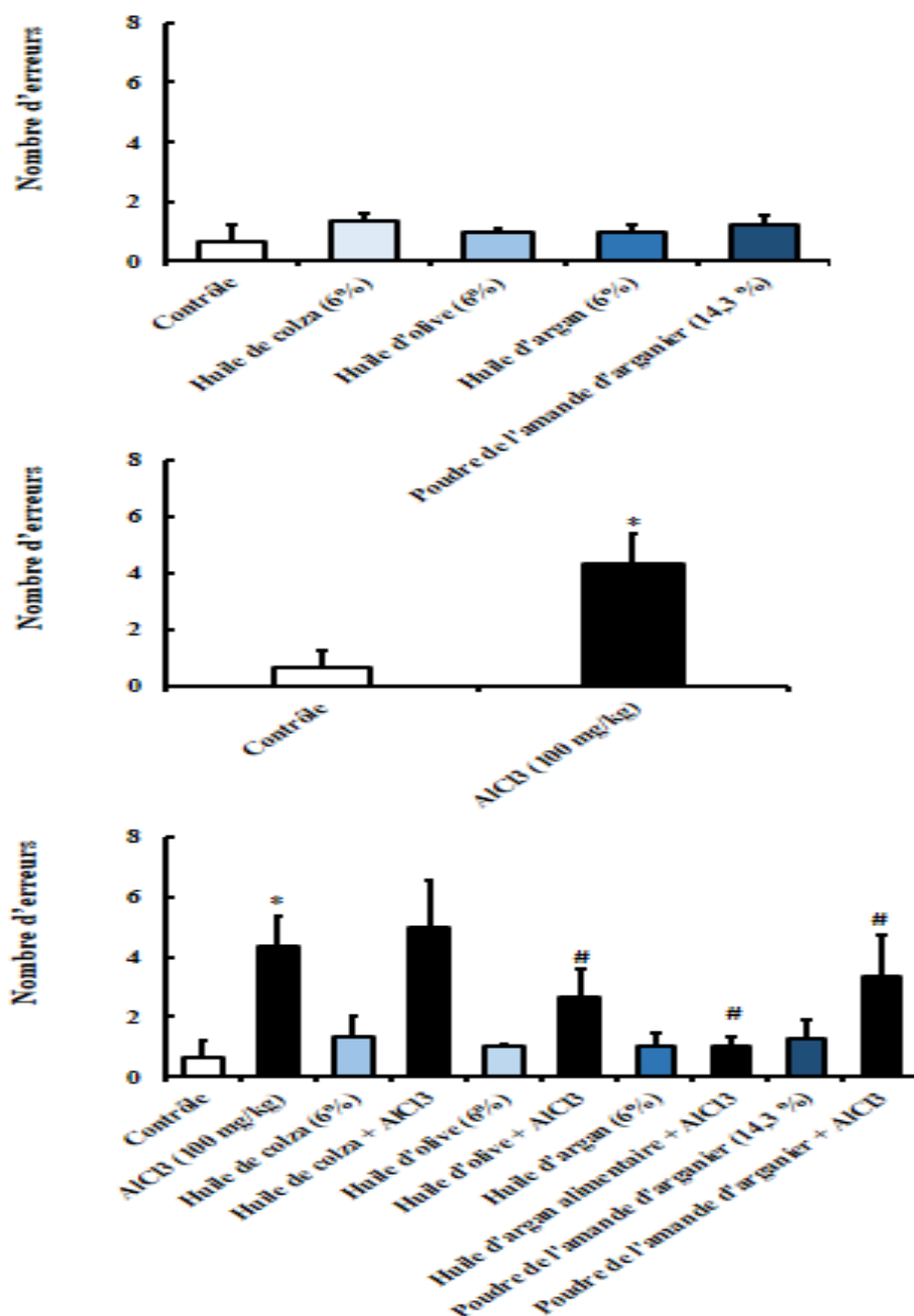
A partir de J<sub>0</sub>, les animaux ont reçu quotidiennement par gavage une dose de chlorure d'aluminium (100 mg/kg), parallèlement à une alimentation supplémentée de 6% d'huile de colza, d'huile d'olive, d'huile d'argan et de 14,3% de poudre d'amande d'arganier, pendant une période de 42 jours. Les pesées ont été journalières.

## 2. Effet de l'huile d'argan et le chlorure d'aluminium sur le comportement

Les tests de comportement (labyrinthe de Morris et labyrinthe 8 bras) ont été réalisés en moitié et à la fin de traitement, suite à une exposition journalière au chlorure d'aluminium (100 mg/kg) pendant 42 jours (**voir la Figure 41-42 de la partie Matériels et Méthodes**). Les effets de l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier sur la capacité mémorative des rats suite à une exposition d'une dose de 100 mg/kg d'AlCl<sub>3</sub> a été bien étudiée.

### *2.1 Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur la capacité mémorative au cours du labyrinthe radial à 8 bras*

La **Figure 69** rapporte le nombre d'erreur enregistré au cours du test de labyrinthe 8 bras. L'analyse des données comportementales confirme l'existence d'un déficit de mémoire de référence et de travail chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium par rapport aux témoins. En présence de 6% de l'huile d'argan, 6% d'huile d'olive et 14,3% de la poudre d'amande d'arganier, on note une amélioration significative des capacités mémoratives qui se manifestent par une diminution du nombre d'erreurs par rapport aux rats contrôles. Néanmoins, l'huile de colza n'a pas pu corriger la perte de mémoire engendrée par le traitement avec le chlorure d'aluminium (100 mg/kg). Le traitement a engendré une perturbation des deux mémoires ; mémoire de référence, révélée par le fait que l'animal rentre à nouveau dans un bras parmi ceux qui ne sont jamais garnis et mémoire de travail qui se manifeste par des erreurs qui sont celles où l'animal entre à nouveau dans un bras parmi ceux qui dont la nourriture a déjà été consommée. Dans ce cas, l'animal semble se souvenir de la tâche mais oublie lequel des quatre il a déjà visité.



**Figure 69:** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur le nombre d'entrée erronée des rats aux bras de labyrinthe radial

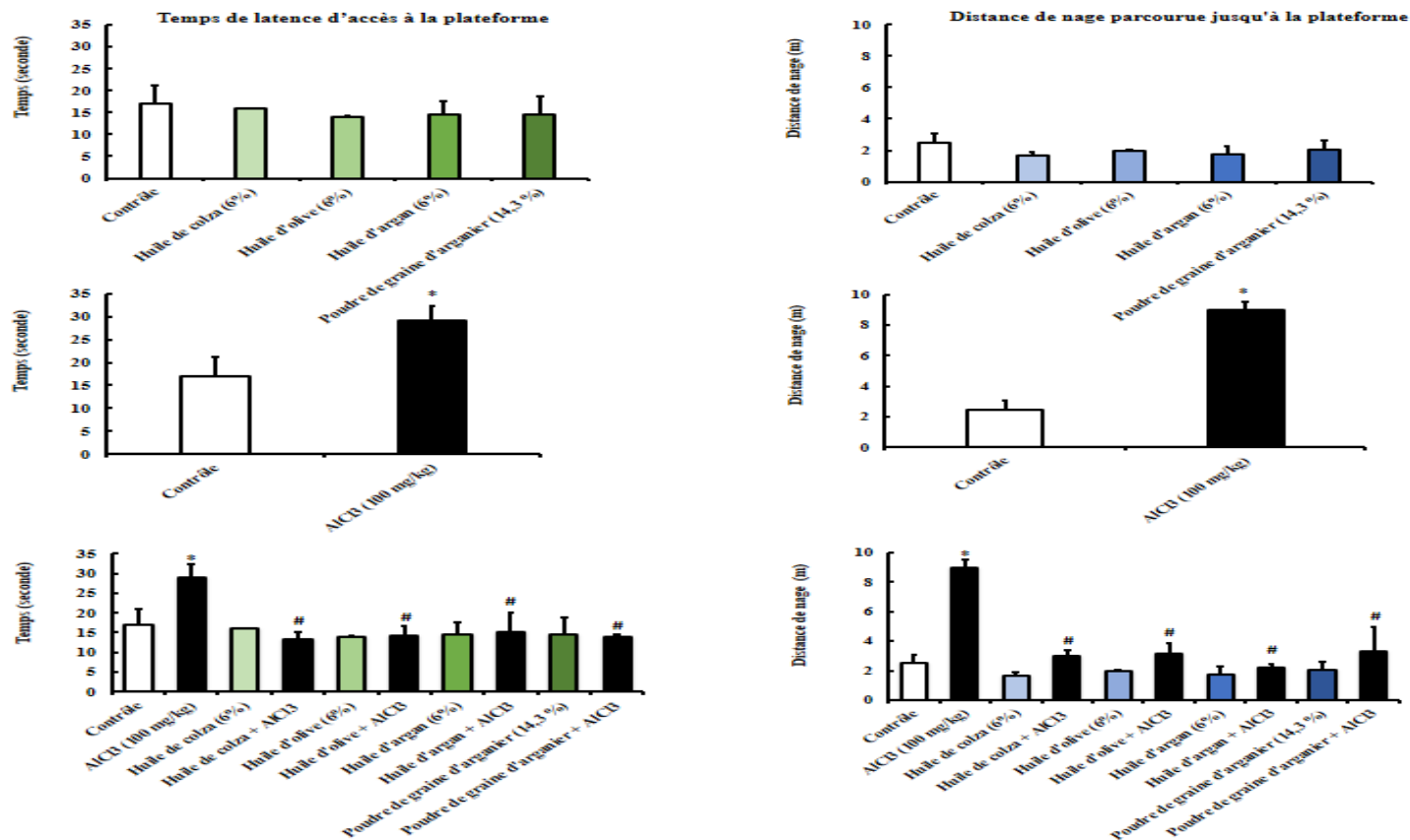
Les rats ont reçu une concentration d'AlCl<sub>3</sub> (100 mg/kg) par gavage, parallèlement à une alimentation enrichie de l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier pendant 42 jours. Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type sur les animaux de chaque lot (n=4). La significativité entre le rat contrôle et les rats traités avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les rats traités avec l'AlCl<sub>3</sub> et l'AlCl<sub>3</sub> avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) #  $p \leq 0,05$ .

## *2.2 Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur la capacité mémorative au cours du labyrinthe de Morris*

### **a. Tâche de mémoire de référence**

La **Figure 70** rapporte le suivi des paramètres du test de labyrinthe de Morris. Plus précisément, le temps de latence et la distance parcourue pour retrouver la plateforme pour les dix groupes des animaux. Dans la tâche de mémoire de référence, la plate-forme invisible est localisée au centre du quadrant Ouest (=quadrant cible). Les rats sont déposés dans le bassin à partir de 4 points de lâcher différents, chacun des 4 points de lâcher étant utilisé respectivement au cours du test. Les performances sont analysées en terme de moyenne des 4 essais.

L'analyse des données comportementales confirme l'existence d'un déficit de mémoire de références chez les rats traités par l' $\text{AlCl}_3$  (100 mg/kg) par rapport aux témoins, le traitement engendre une perturbation de l'acquisition. Chez les groupes traités avec 6% des huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de la poudre de graine d'arganier, nous avons noté une amélioration des capacités mémoratives qui se manifestent par une réduction de la distance parcourue pour trouver la plateforme (**Figure 70**) et la réduction du temps de latence (**Figure 70**). En effet, au début du traitement, l'analyse du comportement des rats traités par l' $\text{AlCl}_3$  ne révèle aucun effet significatif sur la mémoire de référence (résultats non présentés).



**Figure 70:** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur la latence et la distance parcourue par les rats pour rejoindre la plateforme du labyrinthe aquatique Morris

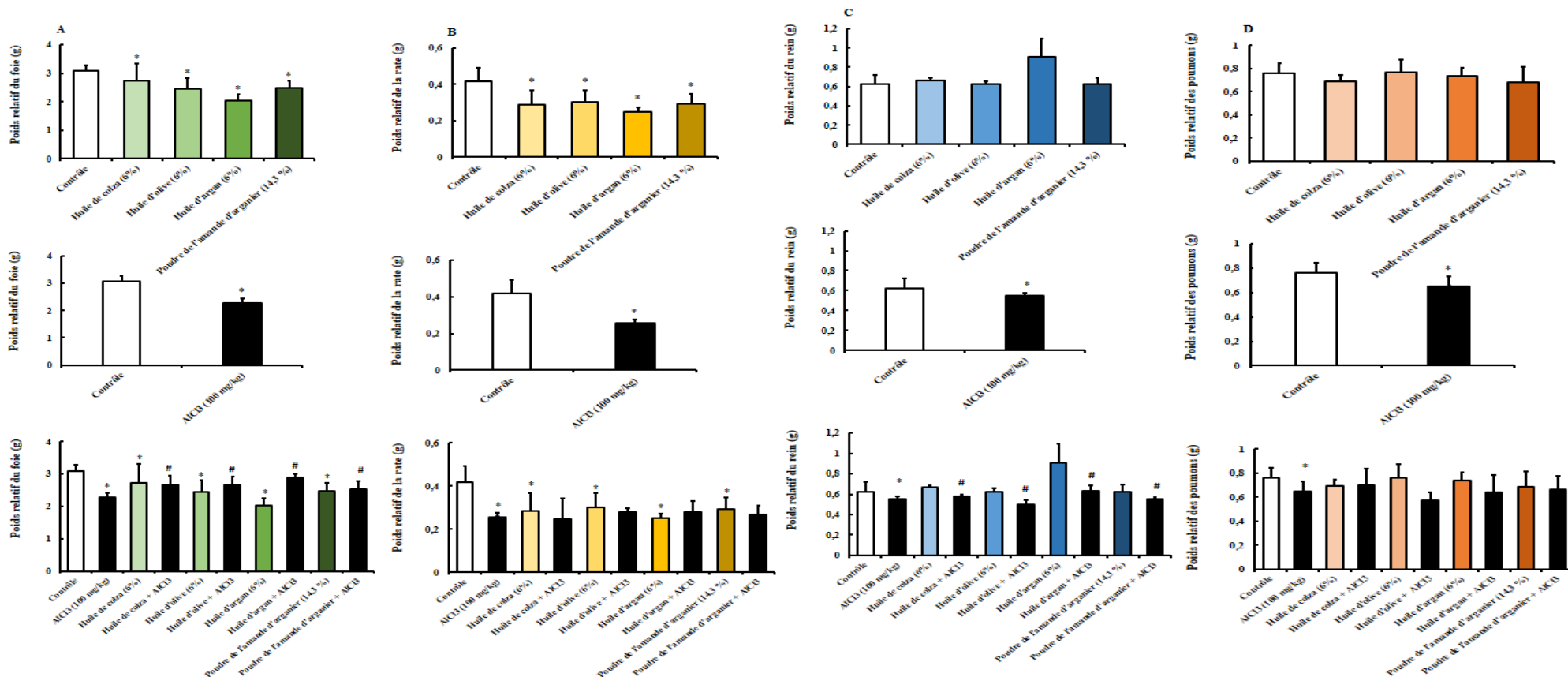
Les rats ont reçu une concentration d'AlCl<sub>3</sub> (100 mg/kg) par gavage, parallèlement à une alimentation enrichie de l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier pendant 42 jours. Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type sur les animaux de chaque lot (n=4). La significativité entre le rat contrôle et les rats traités avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \* p ≤ 0,05. La significativité entre les rats traités avec l'AlCl<sub>3</sub> et l'AlCl<sub>3</sub> avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) # p ≤ 0,05.

### 3. Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur la masse relative des organes

#### 3.1 Variation de la masse relative du foie, rein, rate et poumons

Les rats ont reçu quotidiennement par gavage une dose de chlorure d'aluminium (100 mg/kg), parallèlement à une alimentation supplémentée de 6% d'huile d'argan, d'huile de colza, d'huile d'olive et de 14,3% de poudre d'amande d'arganier, pendant une période de 42 jours. Lorsque les 42 jours sont achevés, les rats ont été sacrifiés et les organes ont été prélevés afin de peser leurs masses. En présence des huiles seules (huile d'argan, de colza, d'olive) et de la poudre d'amande d'arganier, une diminution significative de la masse relative du foie et de la rate a été observée comparativement au contrôle (**Figure 71 A**). Cependant, l'administration du chlorure d'aluminium (100 mg/kg) aux rats induit une diminution significative de la masse relative du foie et de la rate (**Figure 71 A-B**). En vu d'ensemble et d'après les résultats, l'huile d'argan, de colza, d'olive et la poudre d'amande d'arganier ont un impact sur la variation de la masse relative du foie et de la rate.

Les résultats montrent aussi qu'il n'y a aucun effet significatif des huiles (colza, olive, argan) et la poudre d'amande d'arganier sur la masse relative des poumons et des reins par rapport au contrôle. Néanmoins, on note une diminution significative de la masse relative des reins (**Figure 71 C**) et des poumons (**Figure 71 D**) et en présence de chlorure d'aluminium. En somme, nous constatons que le traitement combiné ( $\text{AlCl}_3$  + huile d'argan), ( $\text{AlCl}_3$  + huile de colza), ( $\text{AlCl}_3$  + huile d'olive) et ( $\text{AlCl}_3$  + poudre de l'amande d'arganier) semble rétablir relativement la masse relative des poumons ou du moins évolue dans le sens de la réparation.



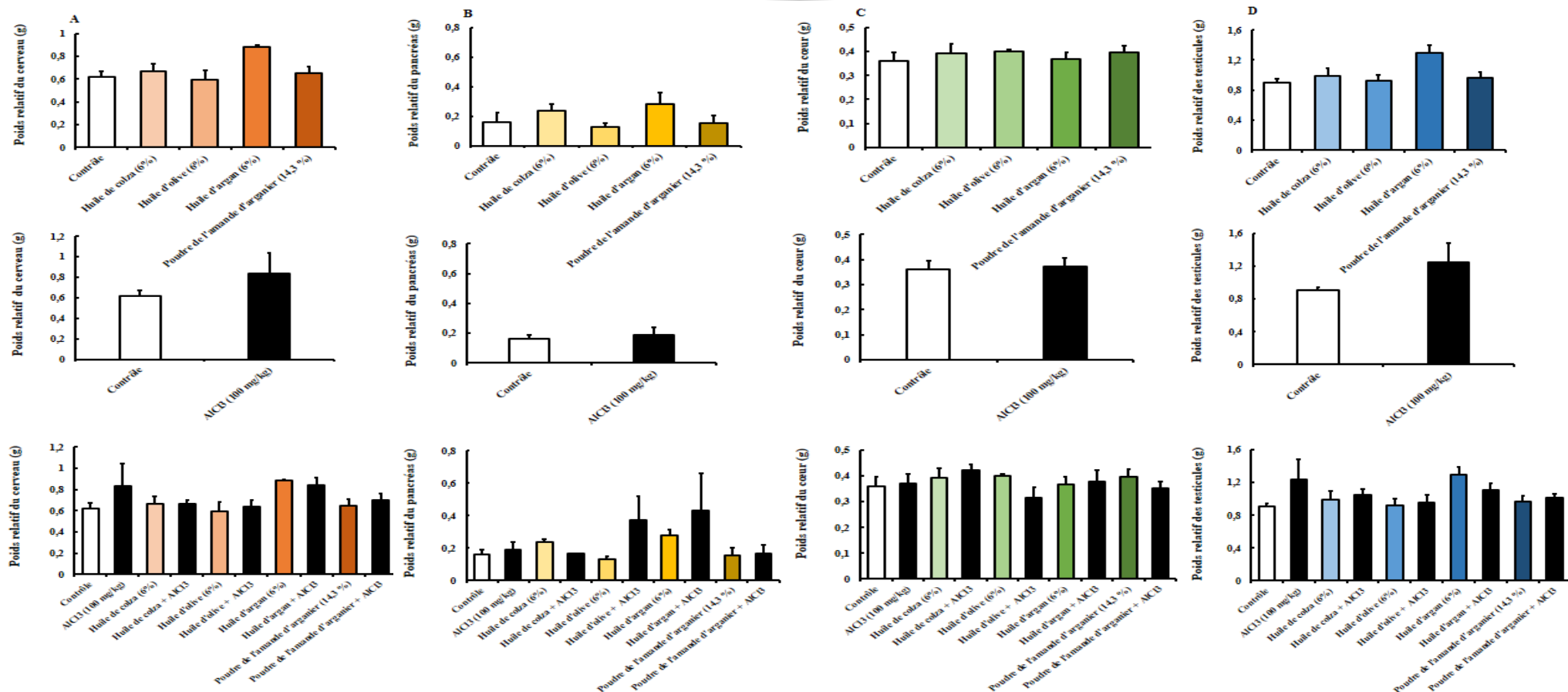
**Figure 71 :** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier n sur la masse relative du foie, reins, rate et poumons

Les rats ont reçu une concentration d' $AlCl_3$  par gavage, parallèlement à une alimentation enrichie de l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier pendant 42 jours sur les animaux de chaque lot ( $n=4$ ). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type. La significativité entre le rat contrôle et les rats traités avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons);  $* p \leq 0,05$ . La significativité entre les rats traités avec l' $AlCl_3$  et l' $AlCl_3$  avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons);  $\# p \leq 0,05$ . Groupe (A) : masse relative du foie, (B) : masse relative du rein, (C) : masse relative de la rate ; (B) : masse relative du rein. (D) : masse relative des poumons.

### *3.2 Variation de la masse relative du cerveau, testicules, coeur et pancréas*

Dans les mêmes conditions précédemment citées, aucune variation de la masse relative du cerveau (**Figure 72 A**), testicules, (**Figure 72 B**), pancréas (**Figure 72 C**), cœur (**Figure 72 D**) n'a été constatée.





**Figure 72:** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur la masse relative du cerveau, pancréas, cœur et testicules

Les rats ont reçu une concentration d' $AlCl_3$  par gavage, parallèlement à une à une alimentation enrichie de l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier pendant 42 jours sur les animaux de chaque lot ( $n=4$ ). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type. La significativité entre le rat contrôle et les rats traitées avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les rats traités avec l' $AlCl_3$  et l' $AlCl_3$  avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ . Groupe (A) : masse relative du cerveau, (B) : masse relative du pancréas, (C) : masse relative du cœur, (D) : masse relative des testicules.

#### **4. Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur les paramètres plasmatiques**

##### *4.1 Effet sur le cholestérol total et les triglycérides*

La mesure du taux du cholestérol effectuée sur les rats traités avec l' $\text{AlCl}_3$  (100 mg/kg) montre une augmentation significative du taux de cholestérol comparativement aux rats contrôles (**Tableau 19**). Aucune variation du taux du cholestérol en présence de 6% des huiles (argan, olive, colza) et 14,3% de poudre de graine d'arganier a été observée. Toutefois, les résultats des rats traités avec chlorure d'aluminium en association avec les huiles montrent que les différentes huiles et la poudre d'amande d'arganier sont capables d'améliorer le taux de cholestérol plasmatique par rapport au contrôle (**Tableau 19**). En effet, les rats traités avec du chlorure d'aluminium n'ont pas d'effet sur le taux de triglycéride, contrairement aux rats traités avec les huiles seules (colza, olive, argan) et la poudre d'amande d'arganier, le taux de triglycéride a été augmenté significativement par rapport au contrôle. Il en est de même pour le groupe des rats traités en association des huiles et le chlorure d'aluminium (**Tableau 19**).

##### *4.2 Effet sur la glycémie*

Les études sériques effectuées sur les rats traités avec l' $\text{AlCl}_3$  (100 mg/kg) montrent une diminution significative du taux de glycémie par rapport au contrôle (**Tableau 19**). Aucune variation du taux de glycémie en présence de 6% des huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de poudre de graine d'arganier a été observée. Lorsque les rats sont traités avec du chlorure d'aluminium en association avec les huiles (colza, olive, argan) et la poudre d'amande d'arganier, le taux de glycémie a été bien amélioré (**Tableau 19**).

##### *4.3 Effet sur les transaminases et l'urée*

Les résultats montrent qu'aucune variation significative des concentrations de l'urée n'a été observée dans le plasma des rats traités avec l' $\text{AlCl}_3$  (100 mg/kg) et ceux traités avec 6% des huiles (colza, olive et argan) ainsi que 14,3% de poudre d'amande d'arganier. Les résultats de dosage des concentrations plasmatiques des transaminases montrent que le chlorure d'aluminium ne provoque aucune variation de l'ALAT (Alanine Amino Transférase), et l'ASAT (Aspartate Amino Transférase) dans le plasma des rats traités avec le chlorure d'aluminium (**Tableau 19**).

**Tableau 19:** Effet de chlorure d'aluminium associé ou non associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur les paramètres lipidiques, rénaux, glycémiques et hépatiques

	Contrôle	AlCl <sub>3</sub> (100 mg/kg)	Huile de colza (6%)	Huile de colza + AlCl <sub>3</sub>	Huile d'olive (6%)	Huile d'olive + AlCl <sub>3</sub>	Huile d'argan (6%)	Huile d'argan + AlCl <sub>3</sub>	Poudre de l'amande d'arganier (14,3%)	Poudre de l'amande d'arganier + AlCl <sub>3</sub>
<b>Cholestérol</b> (g/L)	0,56 ± 0,12	1,15 ± 0,03 *	0,75 ± 0,03	0,87 ± 0,00	0,81 ± 0,12	0,81 ± 0,25 #	0,61 ± 0,06	0,84 ± 0,08 #	0,80 ± 0,09	1,05 ± 0,24
<b>Triglycérides</b> (g/L)	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,05	0,2 ± 0,05 *	0,28 ± 0,00	0,24 ± 0,01 *	0,19 ± 0,00 #	0,23 ± 0,08 *	0,28 ± 0,13 #	0,25 ± 0,12 *	0,31 ± 0,01 #
<b>Glucose</b> (g/L)	1,56 ± 0,40	0,80 ± 1,00 *	1,09 ± 0,04	1,66 ± 0,00 #	1,77 ± 0,11	1,34 ± 0,04 #	0,96 ± 0,04	1,53 ± 0,18 #	1,07 ± 0,05	1,73 ± 0,2 #
<b>Urée</b> (g/L)	0,436 ± 0,09	0,33 ± 0,07	0,49 ± 0,19	0,38 ± 0,17	0,39 ± 0,06	0,38 ± 0,16	0,46 ± 0,04	0,51 ± 0,05	0,37 ± 0,12	0,33 ± 0,04
<b>ALAT</b> (g/L)	50,53 ± 12,15	50,62 ± 0,21	43,03 ± 2,78	61,59 ± 8,44	49,76 ± 0,33	66,84 ± 0,08	57,67 ± 11,61	63,93 ± 6,19	47,99 ± 8,4	51,95 ± 2,99
<b>ASAT</b> (g/L)	212,74 ± 17,72	196,12 ± 49,12	227,53 ± 3,76	233,66 ± 14,12	234,89 ± 0,155	233,83 ± 1,65	228,20 ± 39,4	252,09 ± 2,79	223,50 ± 25,07	240,23 ± 10,03

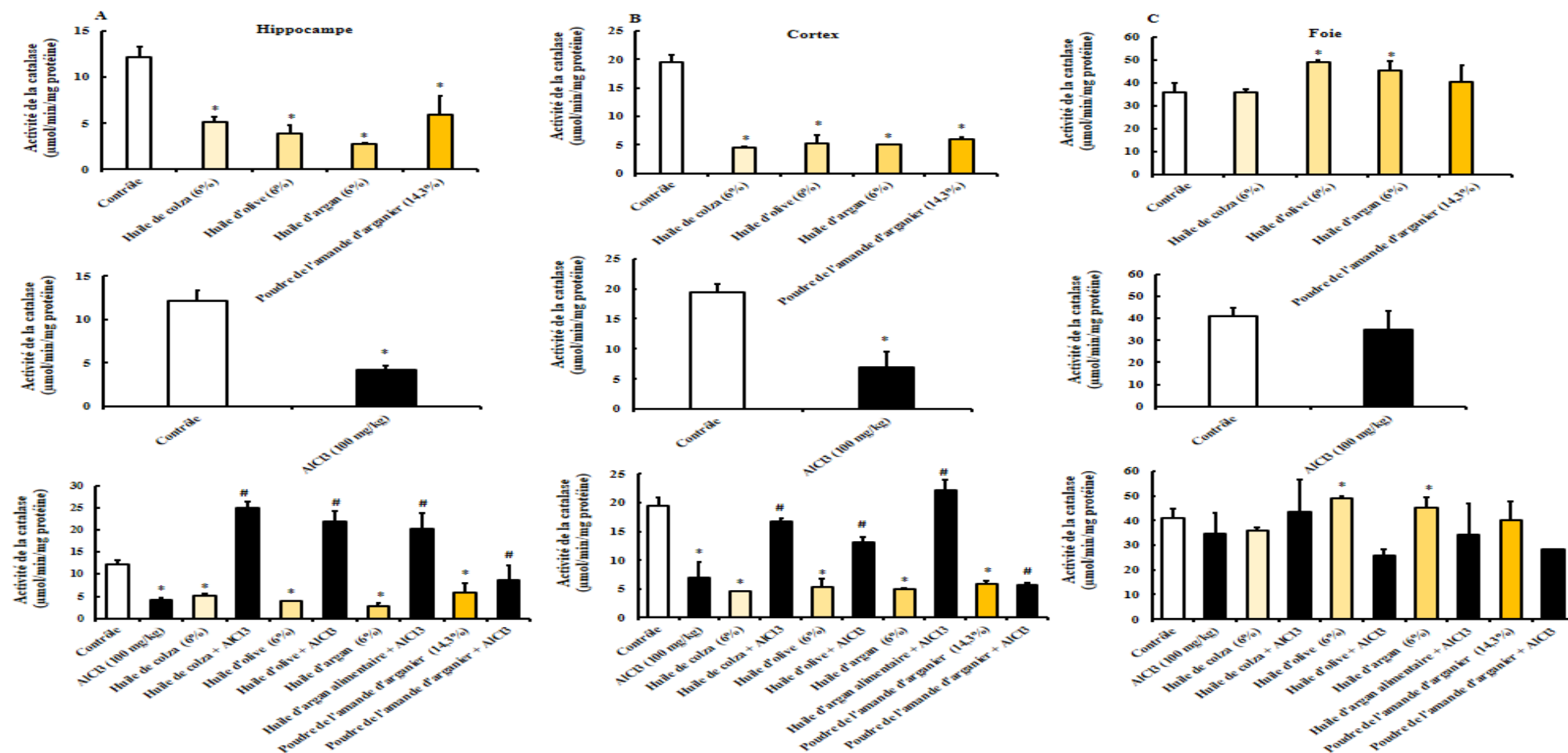
Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type sur les animaux de chaque lot (n=4). La significativité entre le rat contrôle et les rats traités avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par l'AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub> avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); #  $p \leq 0,05$ . **ALAT** : Alanine Amino Transférase, **ASAT** : Aspartate Amino Transférase.

## **5. Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur l'activité des enzymes du stress oxydatif**

Puisque le stress oxydatif est considéré comme un événement impliqué dans le déclenchement de la MA, un dosage de l'activité enzymatique des marqueurs du stress oxydatif a été réalisé sur l'homogénat des rats traités avec 6% des huiles (colza, olive, argan), 14,3 % de la poudre d'amande d'arganier et 100 mg/kg d' $\text{AlCl}_3$ .

### ***5.1 Incidence sur l'activité enzymatique de la catalase***

La catalase est la principale enzyme qui assure le rôle de détoxification du corps. Elle est responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en eau et en oxygène moléculaire. L'activité enzymatique de la catalase au niveau de l'hippocampe, cortex et foie a été respectivement étudiée. Les résultats obtenus sont présentés dans les **Figures 73**. Les résultats montrent qu'au niveau de l'hippocampe et le cortex, l'activité enzymatique de la catalase a été diminuée significativement chez les rats traités avec 6% des huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de la poudre d'amande d'arganier par rapport au contrôle (**Figure 73 A-B**). Elle en est de même chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium (**Figure 73 A-B**). Au niveau du foie, les rats traités avec les huiles (colza, olive, argan) et la poudre d'amande d'arganier, l'activité enzymatique de la catalase a augmenté significativement seulement en présence de l'huile d'olive et l'huile d'argan alors qu'il n'y a aucune variation de cette activité en présence de chlorure d'aluminium (**Figure 73 C**).

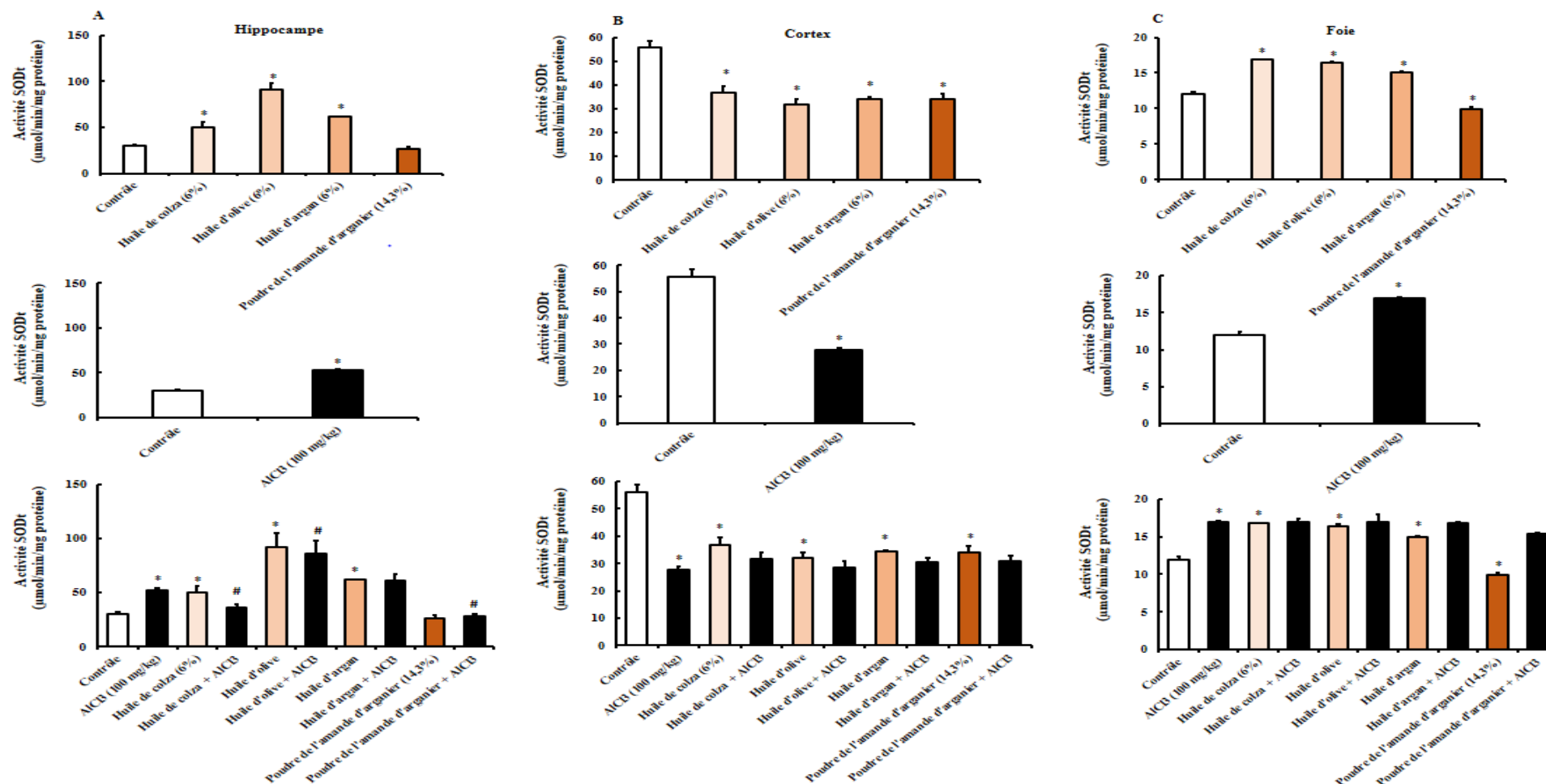


**Figure 73:** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur l'activité enzymatique de la catalase (µmol/min/mg protéine) de l'hippocampe, cortex et foie

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type. La significativité entre le rat contrôle et les rats traités avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par l'AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub> avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); #  $p \leq 0,05$ .

### **5.2 Incidence sur l'activité enzymatique de superoxyde dismutase totale**

La superoxyde dismutase est capable de dismuter l'anion superoxide en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et en oxygène moléculaire, qui pourrait être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Les résultats montrent qu'au niveau de l'hippocampe, l'activité de la SOD a été augmentée seulement chez les rats traités avec 6% des huiles (colza, olive et argan) (**Figure 74 A**), alors qu'au niveau du foie, l'activité de la SOD a été augmentée chez les rats traités avec 6% des huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de la poudre d'amande d'arganier par rapport au contrôle (**Figure 74 C**). Cependant, au niveau du cortex, cette activité a été diminuée chez les rats traités avec 6% des huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de la poudre d'amande d'arganier par rapport au contrôle (**Figure 74 B**). Toutefois, une augmentation marquée de l'activité de la SOD a été observée au niveau de l'hippocampe et du foie chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium (**Figure 74 A-C**). Cette activité a diminué d'une manière significative dans le cortex chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium (**Figure 74 B**). Chez les rats traités avec les huiles (colza, olive, argan) et la poudre d'amande d'arganier, associés au chlorure d'aluminium, seulement la poudre d'amande d'arganier s'oppose à l'augmentation de l'activité de la SOD induite par le chlorure de l'aluminium au niveau de l'hippocampe, tandis qu'aucune variation de cette activité n'a été observée au niveau du cortex et foie comparativement avec les rats contrôles.



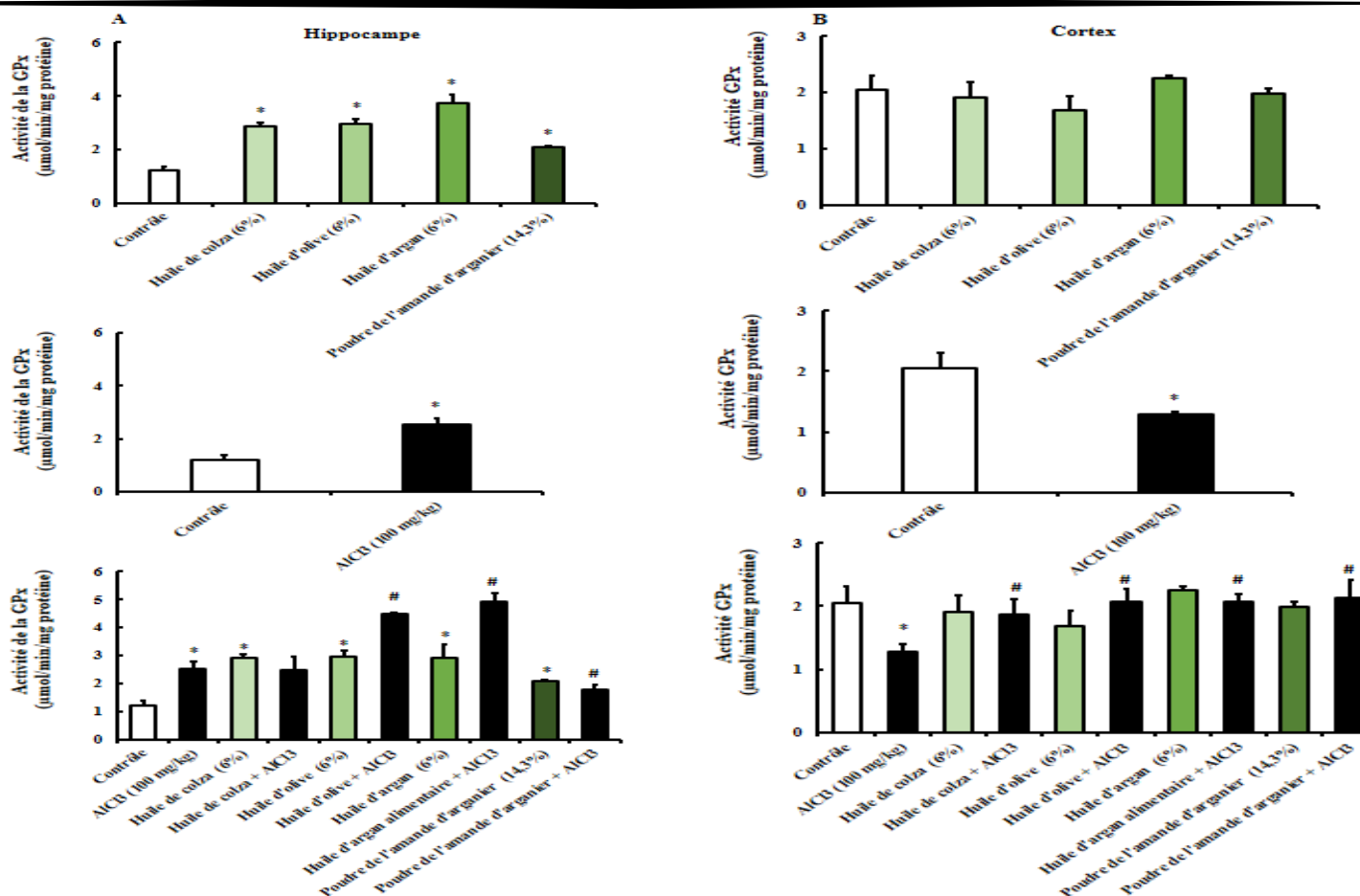
**Figure 74:** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan ou à la poudre d'amande d'arganier sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) de l'hippocampe, cortex et foie

Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type. La significativité entre le rat contrôle et les rats traités avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par l' $\text{AlCl}_3$  et  $\text{AlCl}_3$  avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ .

### ***5.3 Incidence sur l'activité enzymatique du glutathion peroxydase***

La GPx fait partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce système prend aussi en charge des lipids peroxydés. La GPx est l'enzyme clés du système et nécessite la présence de GSH comme donneur d'électron. Les résultats montrent qu'au niveau de l'hippocampe, une augmentation significative de l'activité de la GPx a été observée chez les rats traités avec 6% des huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de la poudre d'amande d'arganier par rapport au contrôle (**Figure 75 A**). Elle en est de même pour les rats traités avec le chlorure d'aluminium (**Figure 75 A**). Toutefois, au niveau du cortex, une diminution marquée de l'activité de la GPx a été observée chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium (**Figure 75 B**). Cette diminution de l'activité de la GPx a été atténuée en présence des huiles (colza, olive, argan) et la poudre d'amande d'arganier (**Figure 75 B**).



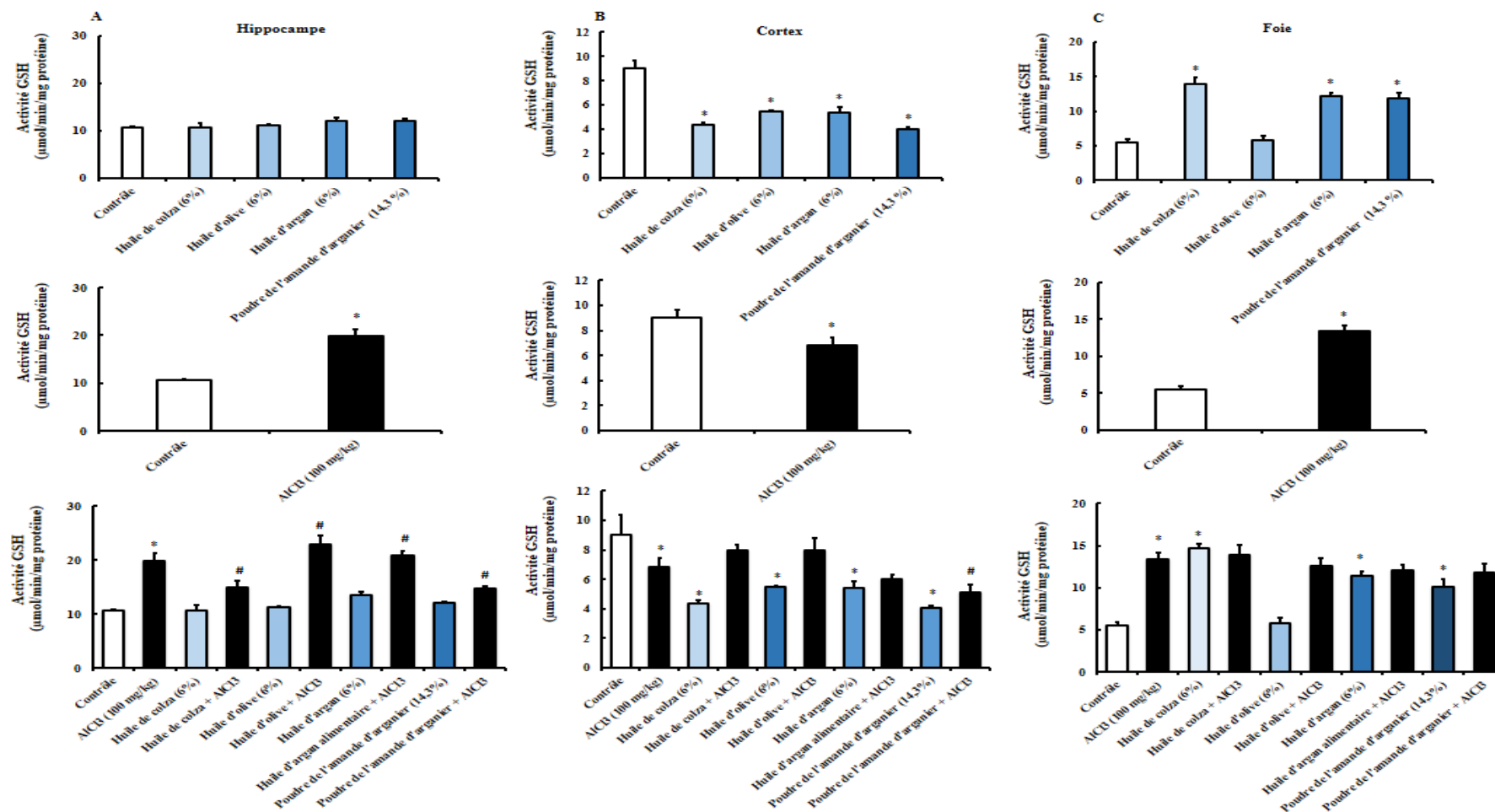


**Figure 75:** Effet du chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur l'activité enzymatique du glutathion peroxydase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protéine) de l'hippocampe et le cortex

Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  écart type. La significativité entre le rat contrôle et les rats traités avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par l' $\text{AlCl}_3$  et  $\text{AICl}_3$  avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); #  $p \leq 0,05$ .

#### **5.4 Quantification du glutathion réduit**

D'après la **figure 80**, une augmentation significative de l'activité GSH a été constatée chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium au niveau de l'hippocampe. L'augmentation de cette activité a été atténuée chez les rats traités seulement avec 6% de l'huile de colza et 14,3% de la poudre d'amande associés au chlorure d'aluminium (100 mg/kg) (**Figure 76 A**). Au niveau du cortex une diminution significative de l'activité du GSH a été observée chez les rats traités avec 6% des huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de la poudre d'amande d'arganier par rapport au contrôle. Il en est de même chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium (**Figure 76 B**). Concernant le foie, une augmentation de l'activité GSH a été observée chez les rats traités avec 6% des huiles (colza, argan) et 14,3% de poudre d'amande d'arganier par rapport au contrôle. Elle en est de même chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium (**Figure 76 C**).



**Figure 76:** Effet de chlorure d'aluminium associé ou non à l'huile d'argan et ou à la poudre d'amande d'arganier sur l'activité du glutathion réduit (µmol/min/mg protéine) de l'hippocampe, cortex et foie

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type. La significativité entre le rat contrôle et les rats traités avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); \*  $p \leq 0,05$ . La significativité entre les cellules traitées par l' $AlCl_3$  et  $AlCl_3$  avec l'huile d'argan, de colza, d'olive et de la poudre d'amande d'arganier est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) ; #  $p \leq 0,05$ .

## **6. Fragmentation d'ADN**

L'analyse de la fragmentation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose de certaines régions du cerveau de rats (hippocampe et cortex), n'a entraîné aucune fragmentation d'ADN au niveau de ces zones, suite à une exposition au chlorure d'aluminium à la concentration (100 mg/kg) pendant 42 jours.

## **7. Histologie**

Après observation au microscope à fluorescence, des lames des différents organes (Foie, hippocampe et cortex), il s'est avéré qu'aucun de ces organes ne présentait de dommages (résultats non présentés). Ceci peut-être expliqué par le fait que, la concentration de chlorure d'aluminium utilisée, bien qu'elle ait provoquée une légère accumulation au sein de ces organes, n'était pas suffisamment élevée pour causer des dégâts.

# **Discussion**

---

## Discussion

### I. Chapitre : Evaluation des paramètres chimiques d'*Argania spinosa* et de l'huile d'argan et évaluation de leur potentiel anti-oxydant

L'étude des paramètres chimiques de différentes parties d'arganier à savoir l'amande, la coque, la pulpe et les feuilles a pour but de caractériser la plante en terme de teneur d'eau, de matière minérale, de lipides, de protéines et de sucres, ainsi que de faire une comparaison entre les deux régions étudiées Berkane (Oujda, Nord-Est du Maroc) et Targa (Agadir, Sud-Ouest du Maroc). Nous nous sommes aussi intéressés à déterminer la teneur en composés phénoliques des extraits d'arganier ainsi que d'évaluer leur pouvoir antioxydants.

#### 1. Détermination de la teneur des polyphénols des extraits d'arganier

Les polyphénols ont reçu une attention particulière ces derniers temps (Marfil *et al.*, 2011 ; Cayuela *et al.*, 2008). Se sont des produits naturels de grande valeur (Balasundram *et al.*, 2006) et dotés de nombreuses propriétés physiologiques qui les rends capables de protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres (Zheng *et al.*, 2010 ; Sies, 2010 ; El Monfalouti *et al.*, 2010). Les polyphénols peuvent aussi prévenir les maladies dégénératives (Del Rio *et al.*, 2010) et ils sont dotés des autres propriétés antioxydantes (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006 ; Muanda *et al.*, 2011). Les polyphénols de l'huile d'argan sont connus posséder des propriétés intéressantes thérapeutiques (Khallouki *et al.*, 2003). Plusieurs études phytochimiques sur les parties de l'arbre de l'arganier ou sous-produits ont déjà été réalisées avec une attention particulière aux polyphénols (Rojas *et al.*, 2005 ; Charrouf and Guillaume, 2007).

Afin de quantifier la teneur en polyphénols totaux de l'amande et les sous-produits de l'arganier des deux régions Berkane et Agadir, il semble particulièrement intéressant d'étudier la nature des polyphénols totaux de cette plante et éventuellement de tenter de les valoriser. En effet, nous nous sommes intéressés à analyser ces résultats, en mettant l'accent sur la composition en terme de polyphénols des différentes parties de la plantes de ces deux régions. La teneur en composés phénoliques des différentes parties de l'arganier de la région de Berkane et celle d'Agadir a été évaluée par la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu. Les résultats montrent que la région de Berkane contient légèrement plus de polyphénols par rapport à la région d'Agadir. Cela a été démontré via la différence de grandeurs trouvées dans les différentes parties de la plante de ces deux régions.

En revanche, l'amande d'arganier contient peu de polyphénols quelle que soit la région considérée, ce qui reflète la faible teneur en polyphénols trouvée dans l'huile d'argan (**El Monfalouti et al., 2010 ; Rojas et al., 2005**). Davantage, si on compare nos résultats par rapport aux travaux antérieurs, la quantité de polyphénols présente dans la pulpe et l'amande reste beaucoup plus faible par rapport à **El Monfalouti et al. (El Monfalouti et al., 2010)**. Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à l'autre et cette différence des teneurs en polyphénols des différentes parties de l'arganier de la région de Berkane et d'Agadir peut être attribuée à plusieurs facteurs :

- facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, type de sol (aride ou semi-aride), agressions et maladies, altitude, température, pluie, salinité et l'exposition solaire.
- le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas et al., 2004**).
- la méthode de quantification peut également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et al., 2003**).

## **2. Détermination de la teneur de flavonoïdes des extraits d'arganier**

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes, appartiennent au vaste groupe des polyphénols qui sont biologiquement et chimiquement très diversifiés. Plusieurs études ont déjà démontré le rôle indéniable que jouent les flavonoïdes autant qu'antioxydants. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes (**Lhuillier, 2007**). La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (**Gomez-Caravaca et al., 2006**). Les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses (**Milane, 2004**). Cependant la qualité nutritionnelle et les effets systémiques des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif. La quercétine est régulièrement consommée par l'homme car c'est le flavonoïde principal trouvé dans le régime alimentaire (**Tieppo et al., 2007**). Leur ingestion diététique est tout à fait haute, comparée à d'autres antioxydants diététiques comme les vitamines C et E (**Fiorentino et al., 2007**).

Les résultats obtenus montrent que la pulpe des deux régions Berkane et Agadir est la partie la plus riche en flavonoïdes. A l'opposé, l'amande contient que des quantités minimales en flavonoïdes par rapport à d'autres parties de l'arganier. Tout comme pour les polyphénols, la région de Berkane contient plus de flavonoïdes par rapport à la région d'Agadir. La différence des teneurs en flavonoïdes pourrait être due aux différents facteurs précités auparavant (paragraphe polyphénols). En effet, ces flavonoïdes jouent un rôle important dans la protection des plantes vis-à-vis des différentes agressions de l'environnement (**Fahmi et al., 2013**).

En conclusion, les différences des teneurs en polyphénols et flavonoïdes obtenues dans les différentes parties d'arganier (amande, coque, pulpe, feuilles, rameaux) dans deux régions Berkane (Nord-Est du Maroc) et Agadir (Sud-Ouest du Maroc) sont dues en grande partie aux facteurs environnementaux précités. La richesse des différentes parties de la région Berkane en polyphénols et flavonoïdes pourrait s'expliquer en moins en partie en raison de l'adaptation de l'arganier aux conditions climatiques arides et semi-arides, qui augmentent la synthèse des composés phénoliques pour s'adapter au climat de la région de Berkane ce qui explique la grande teneur en polyphénols dans cette région. Il a été montré que les plantes répondent aux stimuli environnementaux en synthétisant les composés phénoliques qui peuvent les protéger contre différentes agressions (**Fahmi et al., 2013 ; Misirli et al., 2000**).

### **3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits d'arganier par piégeage du radical libre DPPH et réduction du fer**

L'activité antioxydante des différents extraits d'arganier a été évaluée par deux méthodes : la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (**Rice-Evans et al., 1995**). De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Brand-Williams et al., 1995**). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH à la couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.



La deuxième méthode utilisée pour mesurer la puissance de nos extraits à réduire le  $Fe^{+3}$  en fer ferreux  $Fe^{+2}$  est la méthode de FRAP. Les résultats de ces deux méthodes ont montré que certains extraits possèdent un pouvoir antioxydant puissant alors que d'autres ne l'en possèdent pas. Ces extraits appartiennent à la région de Berkane. Notons qu'avec la méthode de FRAP, nous avons évalué que peu d'extraits qui ont le pouvoir réducteur de fer.

Ainsi, la plante *Argania spinosa* qui contient une quantité considérable de polyphénols et de flavonoïdes peut jouer un rôle majeur dans l'inhibition antioxydante. Les résultats obtenus en DPPH et FRAP ont indiqué que cette plante peut être utilisée comme source naturelle d'antioxydants facilement accessible.

#### **4. Composition de l'huile d'argan**

L'huile d'argan est caractérisée par des niveaux élevés d'acides linoléiques et oléiques et elle est riche en polyphénols et en tocophérols, qui présentent une activité antioxydante importante (Yaghmur *et al.*, 2001; Cabrera-Vique *et al.*, 2012). En outre, la présence de composés mineurs, tels que les stérols, contribuent à sa valeur nutritionnelle, ses caractéristiques diététiques et organoleptiques, ainsi que ses propriétés de conservation (Khallouki *et al.*, 2003 ; Cherki *et al.*, 2006 ; Yaghmur *et al.*, 2001 ; Marfil *et al.*, 2008). Les profils des acides gras dans l'huile d'argan sont proches et conformément aux données précédemment rapportées (Khallouki *et al.*, 2003 ; Charrouf and Guillaume, 2008), qui ont indiqué que l'acide oléique (C18:1n-9) est le principal acide gras insaturé trouvé dans l'huile d'argan, suivi de près de l'acide linoléique (C18: 2n-6), de l'acide palmitique (C16:0) et de l'acide stéarique (C18:0). Toutefois, le principal tocophérol rapporté dans l'huile d'argan d'Agadir est l' $\alpha$ -tocophérol, ce qui n'est pas en corcordance avec la littérature. Nos résultats montrent que l' $\gamma$ -tocophérol est le tocophérol prédominant dans l'huile d'argan de Berkane. Ceci est en accord avec les données précédemment rapportées (Khallouki *et al.*, 2003 ; Charrouf and Guillaume, 2008). Par conséquent, le principal stérol détecté dans l'huile d'argan de Berkane est spinastérol et dans l'huile d'argan d'Agadir est le schotténol. Notons que nos huiles d'argan contiennent de très faibles traces de polyphénols par rapport à la littérature. Ces variations de la composition des huiles d'argan peuvent être attribuées en grande partie à des facteurs génotypiques environnementaux, en particulier le climat et l'altitude, mais aussi le processus d'extraction de l'huile, le type de sol (aride ou semi-aride), la température, la pluie, la sécheresse, la maturité des fruits et l'année de récolte (Hillali *et al.*, 2005 ; Ferradous *et al.*, 1996).

## **II. Chapitre : Evaluation des effets protecteurs de l'huile d'argan sur la toxicité induite par le 7-cétocholestérol et le chlorure d'aluminium**

De nombreuses études nutritionnelles et épidémiologiques montrent que des antioxydants naturels peuvent prévenir sinon soulager certaines formes de ces maladies. Des études, actuellement en cours, aussi bien que des futures recherches, apporteront des éléments supplémentaires sur le rôle spécifique des antioxydants naturels dans la prévention contre les maladies neurodégénératives. Actuellement, l'intérêt pour l'huile d'argan et pour ses effets physiologiques s'est considérablement développé, ce qui a eu pour résultat, de faire passer le statu de cette huile d'un produit alimentaire diététique à celui d'un produit très prisé pour ses qualités anti-oxydantes et nutritionnelles. L'huile d'argan, une des ressources naturelles du Maroc, se caractérise par une composition particulière divisée en deux fractions. La fraction insaponifiable représente 1% de l'huile d'argan, composée par les polyphénols, les stérols et les tocophérols (**Khallouki et al., 2003**), et la fraction saponifiable triglycéridique qui représente 99% de l'huile d'argan. L'analyse des acides gras de la fraction triglycéridique montre que l'huile d'argan est riche en acide oléique et en acide linoléique qui lui confère une composition en acide gras unique parmi les huiles végétales, représentant tous les deux près de 80%, ayant la particularité d'être présents en proportions équilibrées dans l'huile d'argan par rapport aux autres huiles naturelles (**Cherki et al., 2005**). L'huile d'argan possède des propriétés hypolipémiantes et antioxydantes qui pourraient s'avérer bénéfiques dans la prévention des maladies cardiovasculaires (**Cherki et al., 2005 ; Drissi et al., 2004**). Par contre, son rôle potentiel dans les fonctions neurologiques n'est pas encore connu. L'objectif des travaux présentés dans ce manuscrit est de déterminer les effets d'une consommation d'huile d'argan sur certains aspects neurologiques *in vivo* et *in vitro*.

Afin de préciser la part prise par le 7KC et l'AlCl<sub>3</sub> dans la neurodégénérescence et particulièrement dans la MA, l'huile d'argan ou certains de ses composants s'opposent, entre autre, aux effets délétères induits par 7KC et l'AlCl<sub>3</sub>. Des études ont été réalisées *in vitro* sur des cellules d'oligodendrocytes murins 158N et *in vivo* sur des rats Wistar afin de caractériser cette toxicité.

## 1. Evaluation des effets protecteurs de l'huile d'argan sur la cytotoxicité induite par le 7-cétocholestérol: effets sur les organites cellulaires (mitochondries, peroxyosomes et lysosomes) et sur l'activation de la mort cellulaire

Dans le cadre des maladies neurodégénératives et en particulier la MA, les modifications cellulaires associées à la neurodégénérescence s'accompagnent d'une altération des mitochondries et d'un stress oxydant pouvant conduire à la mort cellulaire ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, l'atrophie cérébrale chez les malades Alzheimer. Pour aborder la part prise par le 7-cétocholestérol et l' $\text{AlCl}_3$  dans ces modifications importantes survenant au niveau du système nerveux central, des oligodendrocytes murins 158N ont été mises en présence du 7KC et d' $\text{AlCl}_3$  identifiés en quantité augmentée chez les patients Alzheimer.

Dans ces conditions, sur les cellules 158N traitées par 7KC, les modifications suivantes ont été identifiées : inhibition de la croissance cellulaire, perte d'adhésion, modification des caractéristiques fonctionnelles de la mitochondrie (chute de potentiel transmembranaire mitochondrial  $\Delta\Psi_m$ ), rupture de l'équilibre RedOx (surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène), augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'iodure de propidium, induction d'apoptose et d'autophagie, diminution de la prolifération et dysfonctions du lysosome. Cette lipotoxicité sur les cellules 158N affecte l'expression des marqueurs peroxysoaux (ABCD1, ABCD2, ABCD3, ACOX1) ainsi que l'expression de facteur de transcription PPAR $\alpha$  au niveau cellulaire. Cependant, le traitement des cellules 158N en présence d'une gamme de concentration d' $\text{AlCl}_3$  (62,5-1000  $\mu\text{M}$ ) a montré une accumulation de ce métal par les cellules 158N, une surproduction des ERO accompagnée de mort cellulaire.

### *1.1 Effets du chlorure d'aluminium : accumulation, stress oxydatif et mort cellulaire*

La plupart des études supportant l'association du Morin avec les métaux ont attiré l'attention sur l'instruction de la stœchiométrie de ce complexe et la détermination des sites possibles de liaison (Gutierrez and Gehlen, 2002). En effet, l'accumulation du chlorure d'aluminium par les cellules a été évaluée par le Morin hydrate, un fluorochrome qui forme un complexe fluorescent en vert quand il se lie à l' $\text{AlCl}_3$  : Morin –  $\text{AlCl}_3$ . Le traitement des cellules 158N avec l' $\text{AlCl}_3$  aux concentrations allant de 62,5 à 1000  $\mu\text{M}$  montre une augmentation significative et dose dépendante des concentrations d' $\text{AlCl}_3$  accumulées par les cellules. Cette accumulation d' $\text{AlCl}_3$  a été statistiquement significative à partir de la plus faible concentration de la gamme (62,5  $\mu\text{M}$ ). L'accumulation du l' $\text{AlCl}_3$  dans le milieu

DMEM contenant le sérum pourrait être expliquée au moins en partie que l'accumulation de l' $\text{AlCl}_3$  se fait par sa liaison aux récepteurs de la protéine sérique, la transferrine, ce qui conduit son internalisation et donc son accumulation à l'intérieur des endosomes par endocytose qui sont les cibles potentielles de l'Al qui reste à confirmer (**Morris et al., 1987 ; Levesque et al., 2000**). L'Al accumulé dans le cerveau peut traverser la barrière hématoencéphalique par endocytose médiée par le récepteur transferrine (**Exley et al., 1996**). Notons aussi que l'Al peut déplacer l'équilibre de fixation de  $\text{Fe}^{3+}$  en faveur de  $\text{Al}^{3+}$  sur la transferrine (**Martin et al., 1987; Van Landeghem et al., 1997 ; Tang et al., 1995**).

En accord avec les résultats obtenus sur les oligodendrocytes murins 158N, l'accumulation de l' $\text{AlCl}_3$  a été bien démontrée sur les cellules neuronales et astrocytaires. Cette étude a montré que l'accumulation de l'aluminium dépend de sa spéciation neuronale par rapport aux cellules gliales : le ciblage préférentiel de l'aluminium pour les neurones est compatible avec les concentrations cérébrales en aluminium trouvées chez des patients hémodialysés qui étaient quatre fois plus dans la matière grise que dans la substance blanche (**Burwen et al., 1995**). L' $\text{AlCl}_3$  est préférentiellement absorbé par les astrocytes, supportant en outre l'idée que la nature du ligand d'aluminium peut avoir un impact sur la vitesse apparente de l'accumulation d'aluminium dans les cellules neuronales et non neuronales *in vivo*. Dans la présente étude, il apparaît que l'aluminium est capable de pénétrer dans les oligodendrocytes murins 158N par un mécanisme qui est encore indéterminé. Cette accumulation a été atténuée par deux types d'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), ainsi que ses composants majoritaires ( $\alpha$ -tocophérol, schotténol, spinastérol et acide férulique). Notons que l'huile d'argan se caractérise par sa richesse en  $\alpha$ -tocophérol, schotténol, spinastérol et acide férulique (**Khallouki et al., 2003**) qui lui confère des propriétés particulières, ce qui explique ses effets protecteurs contre les maladies neurodégénératives. En revanche, cette composition particulière, donne à l'huile d'argan la capacité d'avoir un potentiel protecteur mais qui reste à démontrer sur le plan moléculaire. Les résultats obtenus pourraient être dus, en moins en partie, au potentiel chélateur de l' $\alpha$ -tocophérol, des phytostérols et des polyphénols à piéger les radicaux libres. **Abubakar et al., (2004)** ont montré que l' $\alpha$ -tocophérol est capable de chélater les ERO, ce qui peut préserver la fonction de la membrane cellulaire, y compris le transport d'ions et la fluidité de la membrane. L' $\alpha$ -tocophérol peut potentiellement diminuer le taux de peroxydation des lipides, et également empêcher la libération des ions  $\text{Fe}^{2+}$  qui provoquent la fragilité de la membrane et l'épuisement des antioxydants. De même, les phytostérols (schotténol et spinastérol) ont été démontrés

d'avoir des effets protecteurs contre la production des ERO (**Fuhrman et al., 2007; Summanen et al., 2003**). **Aquilano et al., (2008)** ont montré que les polyphénols, comme l'acide férulique, sont caractérisés par leur capacité à pénétrer la barrière hématoencéphalique et de piéger les ERO, ainsi de chélater les ions métalliques. Plusieurs résultats suggèrent que les phytostérols, sont responsables, au moins en partie, des effets préventifs des maladies dues à la production des ERO (**Vivacons and Moreno, 2005**). L'huile d'argan contient une quantité importante de squalène, allant jusqu'à 321 mg/100 g (**Khallouki et al., 2003**), elle agit aussi comme puissant piègeur de radicaux d'oxygène réactifs à la surface de la peau humaine (**Kohno et al., 1995**).

### *1.2 Effet du 7-cétocholestérol et du chlorure d'aluminium sur la mitochondrie et l'activation de la mort cellulaire*

Les mitochondries sont particulièrement importantes dans le système nerveux et nécessitent environ 20% de consommation totale d'oxygène pour le soutien de l'énergie neuronale (**Shulman et al., 2004**). Les fonctions des mitochondries incluent la phosphorylation oxydative nécessaire pour la production de l'ATP, mais elles jouent aussi des rôles importants dans l'homéostasie ionique, dans plusieurs voies métaboliques, dans l'apoptose et la mort cellulaire en général et dans la production et la dégradation des ERO (**Beal, 2007 ; Brinton, 2008**). Les dysfonctionnements mitochondriaux ont été impliqués dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives, y compris la maladie alzheimer, qui sont caractérisées par un hypométabolisme cérébral et une homéostasie altérée dans le statu redox. Une diminution de l'activité mitochondriale, y compris la phosphorylation oxydative, le niveau des protéines et l'activité des complexes impliqués dans la chaîne des transport d'électron, peuvent être observés avec l'âge (**Grimm et al., 2016 ; Leuner et al., 2012**). Il est très important de maintenir la fonction normale mitochondriale dans les neurones. Les modifications de la structure et la fonction mitochondriale diminuent le niveau d'énergie dans les neurones et conduisent donc à une série d'événements dans la cellule tels que la dépolarisation des membranes cellulaire (**Niu et al., 2005**).

Nos résultats obtenus sur les oligodendrocytes murins 158N, montrent que le 7KC (25  $\mu$ M) induit une diminution de la prolifération cellulaire visualisée par microscopie à contraste de phase et comptage en présence de bleu trypan. Ces effets sur la croissance cellulaire ont été confirmés par coloration au crystal violet qui permet d'évaluer l'état de confluence en colorant le noyau des cellules.

La diminution de l'activité succinate deshydrogénase par l'intermédiaire du MTT a conduit à envisager des altérations mitochondriales sous l'effet du 7KC. Ces résultats sont en concordance avec la littérature (**Zarrouk et al., 2016c ; Nury et al., 2015**). Les effets neurotoxiques du 7KC, via la diminution de l'activité mitochondriale, ont été confirmés avec l'utilisation du DiOC<sub>6</sub>(3), une sonde fluorescente permettant de mesurer le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) afin de caractériser un désordre de l'activité métabolique mitochondriale et la mort cellulaire à un stade précoce. En utilisant cette sonde, le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées augmente de 50% par rapport aux cellules contrôles démontrant un impact significatif du 7KC sur l'activité mitochondriale dont la diminution peut contribuer au déclenchement de la mort cellulaire. Des altérations du potentiel mitochondrial sous l'effet du 7KC à différentes concentrations (12,5 ; 25 et 50  $\mu$ M), ont aussi été démontrées sur des cellules gliales BV-2 (**El kharrassi et al., 2014**), et des cellules  $\beta$ -pancréatiques murines (MIN-6) (**Boumhras et al., 2012**). Cet impact du 7KC sur la mitochondrie s'avère avoir un effet néfaste quelque soit le type et l'origine des cellules considérées. De plus, la dépolarisation mitochondriale induite par le 7KC pourrait être impliquée dans des voies métaboliques PDK1 / PKB (Akt) (**Ragot et al., 2011; Ragot et al., 2013**) qui sont souvent perturbées avec l'âge (**Petit-Paitel, 2010**).

Tout comme le 7KC, la caractérisation du désordre de l'activité métabolique mitochondriale causée par le chlorure d'aluminium, a été étudiée sur les cellules 158N via la mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en utilisant la sonde DiOC<sub>6</sub>(3). Les résultats obtenus, montrent que l'AlCl<sub>3</sub> induit une augmentation significative et dose dépendante du pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées. Des altérations du potentiel mitochondrial sous l'effet du l'AlCl<sub>3</sub> à différentes concentrations allant de 62,5 à 1000  $\mu$ M ont aussi été démontrées sur des cellules neuronales (**Niu et al., 2005**), sur les cellules d'astrocytome humain (**Lemire et al., 2009**), cellules phéochromocytomes de rat (PC12), modèle qui présente des propriétés analogues aux neurones. L'Al modifie les propriétés membranaires de ces cellules neuronales, et représente donc une cible plausible pour la neurotoxicité à l'Al. Les modifications du potentiel de membrane peuvent avoir un impact dramatique sur la communication cellulaire en particulier dans les neurones et peuvent être un mécanisme important dans la neurotoxicité à l'Al (**Johnson et al., 2005**). l'Al peut également provoquer des dommages structuraux de la mitochondrie sur les cellules NT2 (**Griffioen et al., 2004 ; Dewitt et al., 2006**).

La chute du potentiel transmembranaire mitochondrial peut contribuer au déclenchement des trois grands types de mort cellulaire qui sont connus : apoptose (mort cellulaire de type I), autophagie (mort cellulaire de type II), et nécrose (mort cellulaire de type III) (**Kroemer *et al.*, 2009**). Globalement, la mort cellulaire est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire, au développement et à la différenciation cellulaire. Elle est donc indispensable à la cellule pour s'adapter à un certains mécanismes. En accord avec les résultats obtenus par **Zarrouk *et al.* (Zarrouk *et al.*, 2016c)** sur les oligodendrocytes murins 158N, une augmentation du nombre de cellules avec des noyaux condensés et/ou fragmentés révélés par coloration au Hoechst 33342 pourrait être considérée comme un indice d'apoptose. Toutefois, l'augmentation de la perméabilité à l'iodure de propidium, observée dans les cellules traitées avec le 7KC a montré à plusieurs reprises que certains oxystérols sont des inducteurs de mort cellulaire (**Nury *et al.*, 2015 ; Zarrouk *et al.*, 2016c**). Le 7KC induit, dans de nombreux types cellulaires, la mort par apoptose dépendante ou indépendante de la caspase 3 (**Prunet *et al.*, 2005**). De plus, 7KC induit à la fois un stress oxydant et de l'apoptose accompagnée d'autophagie sur les cellules U937 pour lequel le terme 'oxiaptophagy' a été proposé (**Monier *et al.*, 2003**).

De même, l'utilisation de l'iodure de propidium permet de distinguer les cellules viables des cellules non viables. Les cellules vivantes excluent l'iodure de propidium, tandis que les cellules mortes le sont perméables. L'augmentation marquée de la perméabilité cellulaire à l'iodure de propidium des cellules 158N a été observée à partir de la concentration 125  $\mu\text{M}$ , dans les cellules traitées avec l' $\text{AlCl}_3$ . Plusieurs études ont reporté que la mort cellulaire pourrait être en partie due au surproduction des ERO. La mort cellulaire sous l'effet d' $\text{AlCl}_3$  a été bien démontrée sur des cellules neuronales à la concentration de 500  $\mu\text{M}$  (**Niu *et al.*, 2005**), sur des neurones et des cellules gliales (**Suarez-Fernandez *et al.*, 1999**), sur des cellules corticales des rats (**Zhang *et al.*, 2008**), et sur des cellules neuroblastoma (SH-SY5Y) traitées avec l' $\text{AlCl}_3$  pendant 24 h et qui a montré la mort par une combinaison de l'apoptose et la nécrose. L'Al peut également provoquer l'apoptose des astrocytes. Dans la mesure où les astrocytes sont essentiels au maintien de la santé neuronale, toute perte de fonction des astrocytes peut se révéler toxique pour les neurones (**Aremu and Meshitsuka, 2005**). l'Al induit l'apoptose comme le montre la fragmentation nucléaire et de la condensation de la chromatine, les dommages à l'ADN et libération du cytochrome c. Il a été démontré que l'Al maltolate induit l'apoptose dans les cellules PC-12 (**Ohyashiki *et al.*, 2002 ; Tsubouchi *et al.*, 2001**), les neurones corticaux (**Fu *et al.*, 2003**) et les cellules Neuro-2a (**Johnson *et al.*,**

2005). Auparavant, l'Al a été largement utilisé en tant qu'un agent induisant la mort pour induire une dégénérescence cellulaire, en particulier dans la MA (**Savory et al., 2006 ; Kawahara, 2005 ; Gupta et al., 2005**). En outre, il a été suggéré que l'Al induit l'apoptose, stress oxydatif et la perturbation du transport axonal. Ces événements sont liés d'une manière à favoriser la neurodégénérescence (**Bharathi et al., 2006 ; Suarez-Fernandez et al., 1999**). Ce dysfonctionnement mitochondrial pourrait être expliqué, au moins en partie, en raison d'un excès de production des ERO, qui à leur tour favorisent l'altération des principales enzymes impliquées dans l'oxydation de phosphorylation (**Galea et al., 2012**), et contribuent par conséquent à une carbonylation des protéines de la chaîne respiratoire, une altération du métabolisme mitochondrial et à l'échec bioénergétique qui est au cœur de plusieurs maladies liées à l'âge.

### ***1.3 Effet du 7-cétocholestérol sur les lysosomes et l'activation de la mort cellulaire***

La perturbation mitochondriale, ainsi que la production du stress oxydatif, peuvent également être liées à la perturbation d'autres organites tels que les lysosomes. La perturbation lysosomiale peut être révélée par l'altération de la membrane. Il a été bien signalé que la perte de l'intégrité de la membrane lysosomiale peut être à l'origine de l'apoptose ou d'autres types de la mort cellulaire (**Guicciardi et al., 2004 ; Erdal et al., 2005**). Plusieurs stimuli peuvent provoquer la rupture de la membrane lysosomiale, en conduisant ainsi à la libération des médiateurs qui peuvent interagir avec la mitochondrie pour activer le processus apoptotique (**Zhao et al., 2003; Fehrenbacher and Jaattela, 2005**). La membrane lysosomiale est perturbée par les oxystérols. En revanche le 7KC est capable de provoquer chez les macrophages la déstabilisation lysosomiale et l'induction de l'apoptose (**Yuan et al., 2000**). Plusieurs travaux ont montré qu'il y a une insertion des oxydes du cholestérol dans les bicouches phospholipidiques des membranes, ce qui a conduit à des modifications structurales pouvant expliquer l'activité cytotoxique de ces molécules (**Massey, 2000 ; Massey and Pownal 2006**).

En raison de l'identification des vésicules acides révélées par coloration à l'acridine orange au niveau des cellules 158N traitées avec le 7KC (25 µM), une implication des lysosomes pourrait être supposée dans la mort cellulaire compte tenu des résultats analogues obtenus sur les oligodendrocytes murins 158N (**Nury et al., 2013**). Ces changements se produisent aux temps précoces des traitements par le 7KC (14 et 18 heures). Ils pourraient indiquer la formation de vésicules acides du type vésicules d'autophagie (**Benzina et al.,**



2008). Par ailleurs, des vésicules du même type ont été mises en évidence par un marquage à la monodansylcadavérine sur les cellules U937 (Miguet-Alfonsi *et al.*, 2002). En revanche, notre temps plus long de traitement (24 h) a conduit à une déstabilisation des lysosomes. Cela peut engendrer la libération de leur contenu enzymatique dans le cytoplasme et être un déclencheur de la mort cellulaire (Malvitte *et al.*, 2008). Les résultats des westerns blot montrent que le 7KC induit la mort cellulaire par autophagie via le clivage de la protéine LC3. En revanche, sur de nombreux types de mort cellulaire, le 7KC est connu pour induire une mort cellulaire par apoptose au delà de la concentration de 25  $\mu$ M. En effet, des études réalisées sur des cellules monocytaires et musculaires lisses d'athérome montrent que le 7KC est également un inducteur d'autophagie (He *et al.*, 2013). L'autophagie correspond à des mécanismes de dégradation de composants intracellulaires de différentes natures dans les lysosomes. L'ensemble ainsi formé est appelé autophagosome et permet de "digérer" le matériel cellulaire. L'autophagosome va ensuite fusionner avec un lysosome pour former un autolysosome (Levine and Klionsky, 2004). Il a été démontré que cette fusion peut être inhibée par des agents lysosomotropiques qui perturbent les membranes lysosomiales, et les cellules accumulent donc un grand nombre de vacuoles autophagiques contenant des composants cellulaires, ce qui en résulte un arrêt d'autophagie (Boya *et al.*, 2005). Il est donc intéressant de déterminer si les vacuoles contenant des structures myéliniques suite aux traitements avec le 7KC, correspondent effectivement à celles qui sont à l'origine de l'inhibition de l'autophagie.

#### *1.4 Effet du 7-cétocholestérol et du chlorure d'aluminium sur le stress oxydatif*

Le cerveau est le siège de production accrue des ERO (Schaffer *et al* 2006). Chez les patients atteints de la MA, une augmentation du stress oxydant ainsi qu'une diminution des défenses anti-oxydantes totales ont été enregistrées. Il a été prouvé que l'augmentation du stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives telles que la MA et la maladie de Parkinson (Esposito *et.*, al 2002 ; Vaya and Schipper, 2007 ; Baarine *et al.*, 2009). Dans des études antérieures, il a été démontré que l'accumulation du 7KC induit une surproduction de radicaux libres dans les oligodendrocytes (Nury *et al.*, 2015). Toutefois, la mesure de la surproduction d'anions superoxydes totaux au niveau intracellulaire effectuée à la dihydroéthidine, a révélé qu'en présence du 7KC (25  $\mu$ M), une augmentation des cellules DHE positives par rapport aux contrôles a été observée. Ces résultats sont en accord avec les travaux ayant montré que le 7KC est capable d'induire

un stress oxydant sur les oligodendrocytes murins 158N (Zarrouk *et al.*, 2016c ; Nury *et al.*, 2015), sur les cellules endothéliales (Vejux *et al.*, 2009), sur les cellules gliales BV2 (Nury *et al.*, 2015) et sur les cellules Caco-2 (Incani *et al.*, 2016). Ce stress oxydant causé par le 7KC est généralement dû à l'activation de la NADPH oxydase (Guina *et al.*, 2015 ; Pedruzzi *et al.*, 2004). D'autres études menées dans différents types de cellules ont montré que le 7KC peut provoquer la formation des ERO et la diminution du glutathion, induisant la mort cellulaire (Incani *et al.*, 2016 ; Han *et al.*, 2007; O'Callaghan *et al.*, 2002). La production de radicaux libres a également conduit à la peroxydation des lipides dans les cellules U937 (Miguet-Alfonsi *et al.*, 2002), dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Tang *et al.*, 2005) et dans les cellules endothéliales (Wu and Huang, 2006).

La neurotoxicité des métaux a été très bien rapportée dans la littérature (Leonard *et al.*, 2004). L'un des mécanismes majeurs derrière cette toxicité a été attribué au stress oxydatif, qui est un processus biochimique issu de la génération des ERO dans la chaîne de transport d'électrons (Kumar and Dip Gill, 2014). L'Al provoque une augmentation de la production des ERO (Bondy *et al.*, 1998 ; Strong *et al.*, 1996 ; Prakash and Rao, 1995) et plusieurs chercheurs ont indiqué l'implication possible des ERO et le stress oxydatif dans l'apparition de la neurotoxicité à l'Al (Ohyashiki *et al.*, 1998 ; Savory *et al.*, 1995 ; Kumar *et al.*, 2008). Les ERO sont constamment formés dans le corps humain et enlevés par défenses antioxydantes. Les ERO comprennent l'anion superoxyde, un groupe hydroxyl, le peroxyde d'hydrogène, etc., ils attaquent d'abord les mitochondries comme l'organite cible et modifient sa structure et sa fonction, enfin, les cellules neurales meurent (Niu *et al.*, 2005).

En effet, les oligodendrocytes 158N ont été traitées avec différentes concentrations de chlorure d'aluminium allant de 62,5 à 1000  $\mu\text{M}$  afin de mesurer la surproduction d'anions superoxydes totaux au niveau intracellulaire en utilisant la dihydroéthidine. Les résultats ont révélé, qu'en présence de différentes concentrations de chlorure d'aluminium, une augmentation des cellules DHE positives a été observée à partir de 250  $\mu\text{M}$  d' $\text{AlCl}_3$  par rapport aux contrôles. Cela pourrait être expliqué au moins en partie que la myéline est une cible privilégiée d'Al; ce qui conduit aux dommages oxydatifs qui peuvent être attribués au contenu lipidique élevé de myéline (Verstraeten *et al.*, 1997). Notons que la myéline, synthétisée par les oligodendrocytes, est un complexe lipoprotéique composé de 70% de lipides et 30% de protéines. Ces résultats sont en accord avec les travaux ayant montré que l' $\text{AlCl}_3$  est capable d'induire un stress oxydatif dans des cellules neuronales du rats (Niu *et al.*, 2005), dans des cellules hippocampiques du rats (Brenner, 2001), dans des cellules de

neuroblastome humaines SH-SY5Y (**Zhang et al., 2009**). Certains auteurs ont rapporté que les différentes formes d'Al peuvent conduire au stress oxydant. Il a été démontré qu'une surcharge en Al est associée à une altération de l'homéostasie du fer, et par conséquent une augmentation des niveaux d'accumulation de fer dans les tissus (**Ward et al., 2001**). Il est possible que ces effets sur l'homéostasie du fer peuvent, en partie, médier les effets cytotoxiques de l'Al. L'augmentation observée dans la production des ERO peut impliquer des interactions entre l'Al et le Fe cellulaire endogène. **Xie and Yokel, (1996)** ont rapporté que l'Al facilite la peroxydation lipidique médiée par le Fe dans plusieurs fractions de cerveau des bovins. Le Fe est un inducteur connu des ERO (**Pratico et al., 1999**). Il a été également montré que l'Al peut interférer en présence de Fe dans les cellules d'érythroleucémie K562 (**Perez et al., 2001**). En outre, l'Al a été montré pour inhiber l'activité aconitase (**Zatta et al., 2000**). Cette enzyme nécessite le Fe pour sa fonction, et l'action d'Al sur l'aconitase peut entraîner la perte de Fe conduisant ainsi à une augmentation de son activité redox intracellulaire et donc à une production des ERO. **Yang et al., (1999)** ont montré que l'Al est capable de stabiliser le Fe dans l'état  $Fe^{2+}$  par la génération de radicaux hydroxyles dans la réaction de Fenton. Les cellules de neuroblastome murines (Neuro-2a) sont également sensibles au traitement à l'Al ce qui conduit à l'expression accrue et l'accumulation de la protéine de dégénérescence neurofibrillaire (**Abreo et al., 1999**). Cet effet a été associé à une augmentation de l'absorption du Fe dans les cellules, éventuellement contribué au stress oxydatif et la neurotoxicité induite par l'Al. Il a été rapporté que d'autres formes d'aluminium provoquent aussi une surproduction des ERO. En effet, **Campbell et al., (2001)** ont observé que l'Al sulfate a produit une importante augmentation de la production de radicaux libres et une diminution de la teneur en GSH dans les cellules de glioma. Cependant, la même concentration du sel d'Al n'a pas conduit à des changements significatifs dans les cellules de neuroblastome. L'Al peut entrer dans les cellules de gliome beaucoup plus facilement que les cellules de neuroblastome, ce qui indique que les cellules de gliome sont beaucoup plus sensibles à la production des ERO induite par l'Al que les cellules de neuroblastome (**Campbell et al., 1999**). En revanche, **Amador et al., (1999)** ont observé que l'ajout d'Al à des synaptosomes isolés du cerveau du rat augmente l'accumulation et la formation de l'acide thiobarbiturique (TBARS), suggérant que l'accumulation d'Al lors des lésions cérébrales oxydatives pourrait contribuer à la neurotoxicité d'Al et donc la dégénérescence des cellules neuronales. Le complexe d'Al-maltolate dans les cellules PC12D induit une rupture de brin d'ADN par la génération des ERO, conduisant à l'apoptose dans les cellules PC12D

(Tsubouchi *et al.*, 2001). L'Al citrate augmente la vulnérabilité des cellules SH-SY5Y au stress oxydatif sans effet direct sur le contenu GSH comme indiqué par Nagasawa *et al.* (Nagasawa *et al.*, 2006).

### *1.5 Effet du 7-cétocholestérol sur l'expression de marqueurs peroxysomaux*

Les peroxysomes sont des organites essentiels pour de nombreuses fonctions cellulaires impliquées dans le métabolisme des lipides, tel que  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\omega$ -oxydation des acides gras à longue chaîne (AGLC), acides gras très longue chaîne et / ou acides gras ramifiés (Wanders, 2004 ; Sanders *et al.*, 2008), la synthèse du cholestérol (Faust and Kovacs, 2014), et le catabolisme des leucotriènes (Mayatepek *et al.*, 1996). Ils sont également impliqués dans le catabolisme des acides aminés, des polyamines, des purines, et des plasmalogènes (Brites *et al.*, 2004 ; Braverman and Moser, 2012). En outre, comme de nombreuses enzymes peroxysomales catalysent les réactions redox, ces organites sont également des régulateurs importants du stress oxydatif (Del Río 2011 ; Nordgren and Fransen, 2014). Chez l'homme, les déficiences liées à la biogenèse et les fonctions des peroxysomes peuvent causer plusieurs dommages et contribuer à l'élaboration des maladies neurodégénératives graves (Aubourg and Wanders, 2013 ; Munter, 2015). Le dysfonctionnement du peroxysome a montré qu'il est associé au vieillissement cellulaire ainsi que des maladies dégénératives liées à l'âge (Titorenko and Terlecky, 2011).

L'analyse des acides gras de la fraction triglycéridique montre que l'huile d'argan est riche en acide oléique et en acide linoléique, représentant tous les deux près de 80%, ayant la particularité d'être présents en proportions équilibrées dans l'huile d'argan par rapport aux autres huiles naturelles (Cherki *et al.*, 2005). Les acides gras sont des molécules biologiques ubiquitaires, ils jouent un rôle très important comme substances énergétiques pour la croissance et le développement de l'organisme. Afin d'évaluer le métabolisme du peroxysome en présence du 7KC, une évaluation de l'expression de certains marqueurs peroxysomaux a été réalisée : l'expression génique des transporteurs ABCD1 et ABCD3, impliqués dans le transport des AGLC du cytosol vers le peroxysome pour leur dégradation par la voie de  $\beta$ -oxydation peroxysomale et l'expression génique des enzymes peroxysomales ACOX1 et MFP2 (Wanders and Waterham, 2006 ; Kemp *et al.*, 2011). L'ACOX1 étant la principale étape enzymatique de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale sera suivie d'une deuxième réaction catalysée par la MFP2 afin d'assurer la dégradation des acides gras.

En effet, les gènes codant pour l'ACOX1 et la MFP2 sont les cibles directes du PPAR $\alpha$  (**Pyper et al., 2010**). Il est à noter qu'une altération des niveaux des acides gras pourrait être à l'origine de certaines maladies comme les maladies cardiovasculaires, l'hyperlipidémie, l'obésité, la résistance à l'insuline. Ceci suscite un contrôle des niveaux des acides gras dans l'organisme (**Forman et al., 1997**).

Le traitement des cellules 158N avec le 7KC (25  $\mu$ M) associé ou non avec l'huile d'argan (1%) montre que le 7KC affecte le niveau d'expression génique des marqueurs peroxysomaux (ABCD1, ABCD3, ACOX1 et MFP2), ce qui conduit à un dysfonctionnement de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et donc une accumulation des acides gras. En accord avec les résultats ayant été réalisés sur la microglie BV2, l'expression minimale de ces marqueurs causée par le 7KC pourrait contribuer au stress oxydatif (surproduction des ERO), au dysfonctionnement mitochondrial, lésions cérébrales, altération de la structure et les fonctions des membranes cellulaires qui sont les caractéristiques des maladies neurodégénératives et de lipotoxicité (**Nury et al., 2014**). Il a été bien signalé qu'une accumulation des AGs (C22:0 ; C24:00 ) au niveau des lésions de cerveaux de malades alzheimer suggère une éventuelle altération du métabolisme des peroxysomes dans cette maladie (**Lizard et al., 2012**). L'accumulation de ces AGs suggère l'activation d'enzymes impliquées dans l'élongation des AGs localisés au niveau du réticulum endoplasmique (**Kemp and Wanders, 2010**). Les récepteurs PPAR sont des récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation de nombreux gènes du métabolisme des lipides (**Schmuth et al., 2014 ; Lefebvre et al., 2006**). Le traitement des cellules 158N par le 7KC abouti à une diminution du taux d'expression des ARNm codant pour les enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, ce qui a eu de répercussion sur la régulation de ces gènes cibles comme l'ACOX1 et la MFP2. Les travaux ayant été menés dans ce sens, montrent que les PPARs sont aussi impliqués dans la régulation de l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 qui sont responsables dans l'efflux du cholestérol vers l'extérieur des cellules (**Ozasa et al., 2011**).

Dans leur ensemble, les résultats obtenus sur les cellules 158N montrent que le 7KC affectent les marqueurs peroxysomaux responsables du transport et de la dégradation des AGLG. Une déficience de ces marqueurs est à l'origine de nombreuses maladies peroxysomales dont la plus connue est l'adrénoleucodystrophie (X-ALD) qui signifie **Adrén**o pour glande surrénale, **leuco** pour la substance blanche du système nerveux qui est atteint lors de la maladie et **dystrophie** signifiant croissance ou développement anormal (**Moser, 1997**). Cette maladie a pour origine d'une ou plusieurs mutations du gène ABCD1, localisé sur le

chromosome X. Le deuxième trouble le plus fréquent de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale est la déficience en MFP2 qui conduit au syndrome de Zellweger dans tous ses aspects y compris la dysmorphie crânienne du visage, d'un défaut de la migration neuronale, et au début de décès. Les caractéristiques cliniques, biochimiques et génétiques d'une grande cohorte de patients déficients MFP2 ont été publiés avant (Ferdinandusse *et al.*, 2006).

### ***1.6 Evaluation des effets protecteurs de l'huile d'argan sur la toxicité induite par le 7-cétocholestérol et le chlorure d'aluminium***

Les études montrent que les antioxydants naturels peuvent prévenir sinon soulager certains formes des maladies. Des travaux, actuellement en cours, aussi bien que des futures recherches, apporteront des éléments supplémentaires sur le rôle spécifique des antioxydants naturels dans la prévention contre les maladies neurodégénératives. Dans les conditions oxydantes, le 7KC est identifié en quantité augmentée dans certains tissus, dans le plasma et dans le liquide céphalorachidien des malades atteints des maladies neurodégénératives. L'aluminium est identifié aussi comme étant un risque majeur pour la cause et le développement de la MA. Ces deux molécules exercent plusieurs activités délétères (activités pro-oxydantes, pro-inflammatoires et induction de mort cellulaire). Il est, donc intéressant d'identifier des cibles thérapeutiques comme l'huile d'argan ou certains de ses composants, capables de s'opposer aux effets secondaires du 7KC et d' $\text{AlCl}_3$ . Pour cela, les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (25  $\mu\text{M}$ : 10  $\mu\text{g/mL}$ ) et ou avec l' $\text{AlCl}_3$  aux concentrations allant de (62,5 – 1000  $\mu\text{M}$ ) en absence et en présence d'huiles d'argan (1%) ou certains de ses composants ( $\alpha$ -tocophérol, spinastérol, schotténol et acide férulique) pour tenter de corriger les effets cytotoxiques induits par le 7KC et l' $\text{AlCl}_3$ . Nos résultats montrent que l'huile d'argan ou certains de ses composants peuvent atténuer la surproduction des ERO, la mort cellulaire, l'induction d'apoptose et d'autophagie, la perte d'adhésion, la diminution de la prolifération. Les résultats montrent que le 7KC effecte aussi l'expression des marqueurs peroxysomaux (ABCD1, ABCD2, ABCD3, ACOX1) ainsi que l'expression de facteur de transcription PPAR $\alpha$  au niveau cellulaire. Ces résultats suggèrent que l'efficacité thérapeutique de l'huile d'argan pourrait ainsi fortement dépendre de la dose et des conditions de traitement.

Les effets de l'huile d'argan révélés dans la présente étude, pourrait expliquer, au moins en partie, de sa composition chimique riche entre autre en tocophérol, schotténol, spinastérol et acide férulique qui jouent un rôle crucial comme des antioxydants contre les

dommages oxydatifs. En effet, les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Diallo, 2005**). Certains témoignages ont rapporté que les tocophérols et les polyphénols sont les anti-oxydants les plus importants dans de l'huile d'argan grâce à leur présence en quantité importante ainsi que leur activité anti-oxydante (**Lopez et al., 2013**). Il a été démontré que les huiles d'argan alimentaires présentent une activité anti-oxydante supérieure en comparaison avec beaucoup d'autres huiles végétales alimentaires (**El Abassi et al., 2014, Zarrouk et al., 2016b**). La présence des tocophérols ( $\alpha$ - et  $\gamma$ -tocophérol) identifiés par GC-MS dans l'huile d'argan (Agadir et Berkane ; Maroc), pourraient non seulement jouer un rôle dans leur conservation (**Chimi et al., 1988 ; El Abbassi et al., 2014**), mais aussi contre de nombreuses maladies neurodégénératives.

Plusieurs études ont montré que l'huile d'argan est caractérisée par sa haute teneur en tocophérols. Les tocophérols jouent un rôle central autant que nutriments liposolubles essentiels, ils fonctionnent comme des antioxydants dans le corps humain. Les humains et les animaux ne peuvent pas les synthétiser ; ils doivent donc les apporter de la nourriture. La vitamine E (tocophérol) est apportée par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ce type d'antioxydant est appelé piégeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons). De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement comme les polyphénols (**Favier, 2003**). Les tocophérols sont des molécules à fort pouvoir antioxydant. L' $\alpha$ -tocophérol est considéré comme un puissant antioxydant contre le stress oxydatif qui est à la base des troubles du système nerveux (**Jomova et al., 2010**). Il agit non seulement comme un antioxydant efficace, lipophile et piégeur de radicaux libres, mais aussi stabilise les membranes cellulaires (**Caligiani et al., 2010**). L' $\alpha$ -tocophérol a un rôle essentiel dans le maintien de la fonction neurologique (**Ulatowski and Manor, 2015**) et la supplémentation par voie orale de l' $\alpha$ -tocophérol atteint le liquide céphalo-rachidien et le cerveau (**Sen et al., 2004**). En outre, le traitement avec l' $\alpha$ -tocophérol pris seul ou en combinaison est capable de retarder la progression de la MA (**Emilien et al., 2000**). En effet, nos données établissent que l'huile d'argan, riche en tocophérols, est capable de s'opposer à de nombreux effets secondaires induits par 7KC: inhibition de cellules de croissance, surproduction des ERO, dysfonctions mitochondriales et lysosomales et induction de la mort cellulaire

(oxiapoptophagy: Oxydation + APOPTOSE + autophagie) (**Monier et al., 2003 ; Vejux and Lizard 2009 ; Ragot et al., 2011; Nury et al., 2013; Nury et al., 2015**). Il convient de noter, que les effets protecteurs de l'huile d'argan ont été similaires à ceux de l' $\alpha$ -tocophérol utilisé comme témoin positif pour prévenir la cytotoxicité induite par le 7KC. L'effet protecteur de l' $\alpha$ -tocophérol contre les effets secondaires du 7KC, peut être expliqué, au moins en partie, par sa capacité à lutter contre l'accumulation de 7KC dans des radeaux lipidiques (**Royer et al., 2009 ; Ragot et al., 2013**). En outre, l' $\alpha$ -tocophérol a également été rapporté pour agir sur les voies de signalisation spécifiques conduisant à l'apoptose et comprenant une activation de la cascade des caspases dont la caspase-3, -7, -8 et -9 (**Vejux and lizard, 2009**). Par conséquent, l' $\alpha$ -tocophérol est capable de s'opposer aux effets du 7KC induisant une diminution de l'activité PI3-K, ce qui contribue à réduire le niveau de PI (3,4,5), P3 sur la face interne de la membrane plasmique, ce qui conduit par conséquent à une diminution de l'activité PDK-1 et de l'absence de phosphorylation de Akt / PKB (**Vejux et al., 2009**). L' $\alpha$ -tocophérol est également capable d'empêcher l'activation de la GSK3 et la dégradation de Mcl-1 induites par le 7KC ce qui conduit à l'apoptose (**Ragot et al., 2011**). Il reste à déterminer comment l'huile d'argan agit sur ces voies de signalisation. **Abubakar et al., (2004)** ont montré que la vitamine E joue un rôle contre l'élimination des ERO induits par l'Al lactate. De plus; la vitamine E joue un rôle important dans la prévention de la mort neuronale, non seulement par l'élimination des ERO par sa capacité antioxydante, mais aussi par des propriétés non antioxydantes comme influençant la signalisation cellulaire et le contrôle transcriptionnel (**Ferri et al., 2003 ; Brigelius-Flohe et al., 2002**). En vu d'ensemble, le 7KC et le chlorure d'aluminium sont capables d'induire un stress oxydatif via la production des ERO sur les oligodendrocytes 158N, mais les mécanismes par lesquels ils favorisent la génération des ERO au sein de ces cellules ne sont pas encore connus. Les résultats ont montré que les deux types de l'huile (alimentaire et cosmétique), l' $\alpha$ -tocophérol, le schotténol et l'acide férulique sont capables de piéger les ERO. En accord avec ces résultats, l' $\alpha$ -tocophérol stoppe la production des ERO (**Traber, 2007**). Il joue un rôle central contre les dommages oxydatifs dans le tissu neuronal en le protégeant efficacement contre les lésions neuronales (**Numakawa et al., 2006**). En plus de ce composé, le spinastérol, composant majoritaire de l'huile d'argan est capable de supprimer la production des ERO sur les cellules HTT22 hippocampiques murines et les cellules gliales BV2. Ces résultats suggèrent que spinastérol a un potentiel thérapeutique contre les maladies neurodégénératives qui sont causées par le stress oxydatif (**Jeong et al., 2010**).



En effet, des données scientifiques récentes suggèrent que les polyphénols exercent leurs actions protectrices en défendant les neurones contre les dommages induits par les neurotoxines, et en améliorant la mémoire et l'apprentissage (**Kovacsova et al., 2010**). Comme l'huile d'argan alimentaire ou cosmétique est un mélange complexe, certains de ces composants (polyphénols, les flavonoïdes, les phytostérols) peuvent également contribuer aux effets cytoprotecteurs de l'huile d'argan. En effet, l'huile d'argan est également riche en composés phénoliques ce qui pourrait avoir un effet protecteur contre les oxystérols. À l'heure actuelle, on sait peu sur l'activité cytoprotectrice des composés phénoliques. Cependant, les effets cytoprotecteurs des extraits phénoliques ont été étudiés sur les cellules d'adénocarcinome Caco2 humaines épithéliales traitées avec les oxystérols. Cette étude a suggéré que l'activité de ces composés phénoliques peut être due à leur fonction comme piègeurs des ERO qui empêchent partiellement les effets pro-oxydants des oxystérols (**Incani et al., 2016**). Les composés phénoliques peuvent aussi atténuer les dysfonctionnements mitochondriaux et l'apoptose induits par le 7KC par suppression des ERO et l'activation de GSH dans les cellules neuronales SHST5Y et PC12 (**Lee et al., 2015**). En outre, il a été établi que les flavonoïdes ont des actions potentielles neuroprotectrices, pour empêcher la réduction des performances des tâches cognitives, la mémoire et l'apprentissage (**Wang et al., 2014a ; Wang et al., 2014b**). Ils ont également un effet cytoprotecteur contre le stress oxydatif, et ils sont en mesure de sauver les neurones contre la toxicité d'Aβ dans des cultures primaires de l'hippocampe (**Dore et al., 1999**). Cependant, les effets bénéfiques des polyphénols seraient le résultat de leurs capacités à prévenir les lésions cérébrales qui conduisent aux maladies neurodégénératives et plus particulièrement à la MA. L'acide férulique est capable de protéger contre la mort cellulaire induit par le 7KC et l'AlCl<sub>3</sub>. En accord avec ces résultats, il a été montré que les composés phénoliques sont capables de réduire la mort neuronale (**Kovacsova et al., 2010**), ils peuvent aussi protéger contre les dommages oxydatifs associé aussi avec la MA et d'autres maladies neurodégénératives en diminuant l'activité de la NADPH oxydase. Les polyphénols particulièrement l'acide férulique, sont capables de pénétrer dans la barrière hématoencéphalique et de piéger les ERO ainsi de chélater les ions métalliques (**Aquilano et al., 2008**). Différents composés phénoliques se sont avérés activer les enzymes antioxydantes clés dans le cerveau et brisant ainsi le stress oxydatif et les lésions tissulaires (**Lau et al., 2005 ; Esposito et al., 2002**). De même, il a été montré que l'α-tocophérol, schotténol et spinastérol se caractérisent par le potentiel piègeur des radicaux libres (**Nury et al., 2014 ; Abubakar et al., 2004 ; Fuhrman et al., 2007 ; Summanen et al.,**

2003). Les polyphénols limitent l'oxydation des structures cellulaires par piégeage des radicaux libres, ils peuvent également agir en modulant l'expression et l'activité des systèmes de défense enzymatiques (**Ashokkumar et al., 2008**). De nombreux travaux attribuent aux polyphénols un effet bénéfique sur la santé. Ils sont ainsi capables de protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres (**Zheng et al., 2010 ; Sies, 2010**), ils peuvent prévenir les maladies dégénératives (**Del Rio et al., 2010**). Les polyphénols sont susceptibles d'être dotés d'autres propriétés antioxydantes (**Gomez et al., 2006 ; Muanda et al., 2011**). L'activité antioxydante des polyphénols est principalement définie par la présence de substituants orthodihydroxy, qui stabilisent les radicaux et chélatent les métaux. Les effets antioxydants des acides phénoliques, et leurs esters dépendent du nombre des groupes hydroxyles dans la molécule (**Berrougui et al., 2006**). Il a été démontré une corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante (**Wong et al., 2006 ; Alali et al., 2007 ; Perez et al., 2007 ; Hayouni et al., 2007 ; Turkmen et al., 2007 ; Wojdylo et al., 2007 ; Surveswaran et al., 2007 ; Djeridane et al., 2006**).

L' $\alpha$ -tocophérol est le composé majoritaire dans l'huile d'argan, l'association de ce micronutriment avec des autres composants mineurs (stérols, squalène et acides phénols), présents dans l'huile d'argan exercent des effets bénéfiques plus importants que la somme des différents composants pris isolément. Les effets neuroprotecteurs des stérols ont été bien rapportés. L'huile d'argan contient une quantité importante des stérols dont les principaux sont le spinastérol et le schotténol qui représentent jusqu'à 88 % du totum stérolique. Les résultats obtenus sur les oligodendrocytes 158N ont montré que les deux types de l'huile d'argan (alimentaire et cosmétique), les phytostréols (spinastérol et schotténol) et l'acide férulique induisent une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial. Cela a conduit à conclure que l'huile d'argan ainsi que ses composants majoritaires ont un impact sur le potentiel transmembranaire mitochondrial. Ces données confirment également un certain nombre d'études montrant que les mitochondries constituent la cible directe ou indirecte des phytostérols (**Lizard, 2011**). En accord avec les données obtenues, les oligodendrocytes 158N, les gliomes de rat C6, les cellules neuronales humaines SK-N-BE et les microgliales murines BV2 ont montré que le spinastérol et schotténol conduisent à une perte de potentiel transmembranaire mitochondrial et ils peuvent moduler l'activité mitochondriale et pourraient donc influencer sur le métabolisme cellulaire (**Baderddine et al., 2015 ; El Kharrassi et al., 2014**). En effet, spinastérol et schotténol sont aussi capables de se lier et d'activer LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  (**El Kharrassi et al., 2014**). Ils se sont révélés comme des ligands de LXR (**Law, 2000**

; **Plat et al., 2005**). LXR existe sous deux formes qui sont LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ . Ces récepteurs nucléaires sont considérés comme des intégrateurs de signalisation métabolique et inflammatoire, en particulier dans le cerveau (**Zelcer and Tontonoz, 2006**). Le rôle joué par LXR dans les maladies neurodégénératives, en particulier la MA est encore peu connu (**Kim et al., 2008 ; Zelcer et al., 2007**). LXR est un facteur de transcription qui est principalement impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides et du cholestérol. Il régule la sensibilité des neurones moteurs et des cellules gliales aux phytostérols (**Kim et al., 2008 ; Zelcer et al., 2007**).

L'huile d'argan (Agadir et Berkane) ont pu réduire l'autophagie révélée par un clivage de la caspase-3 et par un ratio LC3-II / LC3-I inférieur au 7KC seul. Par conséquent, à l'heure actuelle, nous avons identifié des molécules naturelles ( $\alpha$ -tocophérol, acide docosahexaénoïque, acide oléique) et synthétiques (fumarate de diméthyle (DMF)) (**Zarrouk et al., 2016c**) et des mélanges de molécules (huile d'argan) capables de prévenir les dysfonctionnements des oligodendrocytes induits par le 7KC, ce qui pourrait contribuer à la prévention de la neurodégénérescence, notamment la démyélinisation sur les oligodendrocytes, qui sont les cellules synthétisant la myéline dans le système nerveux central.

### **III. Chapitre : Evaluation des effets de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur le comportement des rats, le poids et les marqueurs du stress oxydant**

#### **1. Accumulation du chlorure d'aluminium dans le cerveau**

Il est établi aujourd'hui que l'aluminium est toxique et qu'il est impliqué comme un facteur étiologique dans de nombreuses manifestations neuropathologiques. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine de la toxicité de ce métal sont encore très peu compris. Il a été observé que l'aluminium s'accumulait dans certaines maladies neurodégénératives telles que la MA (**Crapper et al., 1976**), la sclérose amyotrophique latérale, la démence de Guam (**Perl et al., 1982 ; Garruto et al., 1984**), la maladie de Parkinson (**Yasui et al., 1992**) et autres.

Cependant, la distribution de l'aluminium dans le cerveau a été largement étudiée depuis des années (**Santos et al., 1987 ; Fosmire et al., 1993 ; Van Ginkel et al., 1993 ; Sahin et al., 1994**). La neurotoxicité de l'aluminium a été bien établie et elle produit des

symptômes neurotoxiques chez les humains et les rongeurs (**Perry and Keeling-Tucker, 1998 ; Becaria et al., 2002**).

Le traitement des rats avec le chlorure d'aluminium à la dose 100 mg/kg.p.c, pendant 42 jours, a montré que l' $\text{AlCl}_3$  s'accumule plus dans le cortex et l'hippocampe, que dans le foie. La distribution de l'aluminium dans le cerveau a été largement étudiée (**Santos et al., 1987 ; Fosmire et al., 1993 ; Van Ginkel et al., 1993 et Sahin et al., 1994**). En accord avec nos résultats, après une exposition aigue et subaiguë à l'aluminium, celui-ci s'accumulait dans toutes les régions du cerveau et qu'il se répartissait de manière variable dans presque tous les tissus du corps (**Yu et al., 2014 ; Kaur et al., 2006 ; Julka et al., 1996 ; Lal et al., 1993**). Une preuve supplémentaire confirme la distribution d'Al dans les régions du cerveau de rat et montre que l'accumulation de l'Al était plus importante dans le groupe recevant l'Al par voie intrapéritonéale que par voie orale, ce qui suggère que la distribution de l'Al dépend de la voie d'administration (**Sanchez-Iglesias et al., 2007**). En revanche, l'absorption de l'Al dans le cerveau est beaucoup plus lente par rapport aux autres organes, mais une fois, dans le cerveau, il est distribué dans les différentes régions cérébrales. Il est aussi rapporté que le cerveau contient des niveaux faibles de l'Al par rapport à d'autres organes (**Walker et al., 1994; Yokel, 2000**), cela confirme les valeurs trouvées dans nos résultats qui sont de l'ordre de  $\mu\text{g/mL}$ . Certains auteurs ont montré que le contenu d'Al dans le cerveau humain augmente avec l'âge (**Markesbery et al., 1981; Jansson, 2001**). L'Al peut pénétrer la barrière hémato-encéphalique (**Banques and Kastin, 1989; Yokel et al., 2001; Zatta et al., 2002**), et s'accumule dans différentes régions du cerveau, y compris le cortex, cingulum, le corps calleux et l'hippocampe (**Platt et al., 2001; Flaten, 2001; Walton, 2012**), et entre dans différentes parties de la cellule, y compris les mitochondries, les lysosomes et le noyau (**Dobson et al., 1998**). En plus, il a été suggéré que la forme chimique de l'Al influence fortement sa biodisponibilité (**Ogasawara et al., 2002**). Le passage de l'aluminium dans le cerveau apparaît être génétiquement dépendant (**Fosmire et al., 1993**).

En conclusion l'accumulation de l'Al dans les régions de l'hippocampe et le cortex pourrait être expliquée en raison que la barrière hémato-encéphalique est riche en récepteurs de transferrine, ces derniers favorisent la translocation de l'aluminium en utilisant les récepteurs de la transferrine. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le processus par lequel l'aluminium peut traverser la barrière hémato-encéphalique, et arriver dans les tissus cérébraux et s'accumuler là-dedans. Une enquête récente a indiqué que l'aluminium peut pénétrer dans le tissu cérébral par le sang via deux voies, soit en traversant

la barrière hémato-encéphalique ou par perméation à travers le plexus choroïde suivie par son absorption par la cavité nasale, ensuite les nerfs olfactifs et enfin sa distribution directement dans le cerveau (Yokel, 2002).

Le foie est un organe critique qui contient la plupart des métaux accumulés et où les effets toxiques peuvent être attendus (Dodds-Smith *et al.*, 1992 ; Kurutas *et al.*, 2009). Les résultats obtenus montrent que le chlorure d'aluminium s'accumule dans le foie. Cependant, cette accumulation reste beaucoup plus faible par rapport au cortex et l'hippocampe. Le niveau le plus faible se trouvant dans le foie, est probablement dû à une excrétion biliaire. En effet, il a été suggéré que l'aluminium absorbé, acheminé au foie par la circulation portale, était rapidement éliminé dans la bile (Jessica *et al.*, 1996). Sutherland and Greger, (1998) ont suggéré que le foie était capable de sécréter dans la bile de petites quantités d'aluminium alimentaire absorbé mais que les reins restent les organes excréteurs principaux pour l'aluminium quand la capacité sécrétrice du foie est dépassée.

## 2. Effet du chlorure d'aluminium sur le comportement des rats

La formation de la mémoire est un processus sophistiqué nécessitant différents précurseurs pré-synaptiques et post- synaptiques (Kuntz *et al.*, 2005). Diverses études ont été menées pour déterminer les mécanismes moléculaires associés aux changements synaptiques qui contribuent aux activités qui ont lieu pendant le développement et la formation de la mémoire. Des études ont confirmé depuis assez longtemps que l'Al peut induire divers effets toxiques sur le système nerveux central, y compris les déficits cognitifs (Kumar *et al.*, 2011; Petit *et al.*, 1985 ; Sethi *et al.*, 2008 ; Walton, 2012). L'Al pourrait causer des dommages de fonctions cognitives qui ont été étroitement liés aux maladies neurodégénératives (Zhang *et al.*, 2013). La potentialisation à long terme (LTP) est une forme de plasticité synaptique en association avec la fonction cognitive. Des études antérieures ont montré qu'une exposition à l'Al induit des dommages de la mémoire spatiale, en conduisant à des changements neuronaux et synaptiques et par conséquent, à une altération de LTP au niveau de l'hippocampe (Zhang *et al.*, 2013). L'hippocampe est une partie du système limbique qui est nécessaire pour la formation de différents types de mémoire et l'apprentissage chez les souris et les autres mammifères. Cependant, l'hippocampe, qui est un élément crucial des bases neurobiologiques de la fonction cognitive, est l'organe cible pour l'Al (Savage *et al.*, 2004). Cela indique que l'aluminium influence les fonctions cognitives au niveau de l'hippocampe. Chez l'homme, tout dommage causé à l'hippocampe conduit à un trouble d'apprentissage, de

capacité, de mémoire, en se souvenant des effets mentaux indésirables (**Asili and Sharifzadeh, 2011**). En revanche, le mécanisme exact qui induit ces déficits de mémoire n'est pas clair. L'exposition chronique à l'Al peut affecter l'apprentissage et la mémoire, et son accumulation chronique dans le cerveau peut entraîner une réduction de la capacité de la mémoire concomitante d'un déficit dans la potentialisation à long terme dans la région de l'hippocampe (**Wang et al., 2010**).

Les résultats obtenus indiquent que l'administration chronique de chlorure d'aluminium à la dose (100 mg/kg), pendant 42 jours, a donné lieu à une détérioration progressive de la mémoire spatiale telle que déterminée par le labyrinthe radial et le labyrinthe aquatique de Morris. Expérimentalement, il a été démontré que l'administration intracérébrale de chlorure d'aluminium a provoqué des déficits d'apprentissage montrés via le labyrinthe aquatique de Morris chez les rats. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature (**Platt et al., 2001 ; Kumar, 2011 ; Rabe et al., 1982**). Ce phénomène pourrait être attribué, à la capacité d'aluminium d'interférer avec les molécules effecteurs, tels que le GMP cyclique, impliqué dans la potentialisation à long terme lors de l'apprentissage et de formation de la mémoire (**Canales et al., 2001**), ce qui pourrait réduire la capacité d'apprentissage de la tâche spatiale de mémoire.

Les conclusions de notre étude sont en accord avec les rapports précédents (**Kaur et Sodhi, 2015 ; Lakshmi et al., 2015 ; Jangra et al., 2015 ; Ribes et al., 2008 ; Sharma et al., 2013 ; Asili and Sharifzadeh, 2011 ; Miu et al., 2003**) qui ont montré des changements de comportement conduisant à des déficits de mémoire spatiale dans le labyrinthe de Morris après une exposition à l'Al. De nombreux chercheurs confirment le rôle du système nerveux cholinergique dans le processus d'apprentissage et de mémoire (**Kaizer et al., 2005**). D'après les études précédentes, l'injection de l'Al dans le ventricule intracérébral provoque un grand effet sur la réduction de l'acétylcholine transférase dans le cortex cérébral et l'hippocampe du chat. Les études sur le cerveau humain ont clairement démontré l'association de l'acétylcholine et la mémoire. Par exemple, chez les patients atteints de la MA, on observe que le niveau d'acétylcholine dans le cerveau est réduit. Compte tenu de l'importance des fonctions de l'hippocampe dans la mémoire spatiale, des lésions du système cholinergique dans cette région du cerveau conduit à la détérioration de la mémoire (**Halliwel and Gutteridge, 1995**). Par conséquent, la destruction des fibres cholinergiques peut être l'un des mécanismes pour l'altération de la mémoire spatiale induite par l'AlCl<sub>3</sub>.

En outre, le test du labyrinthe radial 8 bras est largement répandu pour évaluer les capacités de mémorisation et les performances d'apprentissage de la mémoire spatiale chez les rongeurs au niveau de l'hippocampe. Il a été utilisé dans de nombreuses études antérieures (**Levin, 2015 ; Hritcu *et al.*, 2015 ; Yamada *et al.*, 2015**). Dans notre étude, les résultats montrent un plus grand nombre d'erreurs dans la tâche du labyrinthe, ce qui indique que l'exposition à l'aluminium réduit la capacité à résoudre les tâches de labyrinthe. Ceci suggère que l'aluminium interrompt la récupération d'informations qui ont été acquises au cours de la session de formation. Nos résultats sont en accord avec une étude similaire à nos conditions supportant l'administration du chlorure d'aluminium à la dose 50 mg/kg pendant 42 jours (**Al-Amin *et al.*, 2016**). Il est important de noter que, tous les groupes d'animaux ont suivi une formation suffisante pour apprendre le déroulement du test.

En présence de l'huile d'argan, d'huile d'olive et la poudre d'amande d'arganier, on note une amélioration significative des capacités mémoratives pour les rats recevant le chlorure d'aluminium cocomitant avec l'huile d'argan, d'huile d'olive et la poudre d'amande d'arganier. Cela pourrait être expliqué par le fait que les polyphénols présentant dans ces produits sont capables d'améliorer la mémoire et l'apprentissage induit par l' $AlCl_3$ . En accord avec les résultats, une étude suggère que les polyphénols exercent leurs actions protectrices en défendant les neurones contre les dommages induits par les neurotoxines, et en améliorant la mémoire et l'apprentissage (**Kovacsova *et al.*, 2010**).

### **3. Effet du chlorure d'aluminium sur le poids corporel des rats et la masse relative des organes**

Le traitement des rats avec l' $AlCl_3$  à la dose (100 mg/kg) pendant 42 jours a montré une légère diminution non significative du poids corporel des rats à la fin du traitement. L'absence du gain normal de poids corporel chez les rats reflète un degré de toxicité systémique du traitement. C'est en raison d'une réduction marquée de la prise de nourriture dans les groupes expérimentaux au cours du traitement. Un semblable absence de gain de poids a été observé chez les rats injectés par voie intraventriculaire de lactate d'Al, ce qui suggère que l'Al a un effet directe sur les voies appétitives centrales (**Bondy *et al.*, 1998**). Nos résultats stipulent que le chlorure d'aluminium n'a pas d'effet significatif sur le poids relatif du cerveau, pancréas, coeur et testicules, alors qu'il a fait diminuer le poids corporel des autres organes (foie, rate, reins et poumons). Il pourrait s'agir d'une atrophie sélective de ces organes.

Cela devrait correspondre à des troubles sévères en cours d'évolution, comme par exemple ; la néphropathie (reins), la cirrhose hépatique (foie) et les maladies pulmonaires (poumons)... l'Al est connu pour induire l'apoptose, ceci pourrait aussi expliquer la réduction rapide du poids de ces organes. Cependant, un traitement plus long aurait sans doute montré des lésions plus nettes, voire l'accumulation de ce métal dans les tissus étudiés (**Ogasawara et al., 2002 ; Sanchez-Iglesias et al., 2007; Gomez et al., 1997**).

#### **4. Effet du chlorure d'aluminium sur les paramètres plasmatiques**

Le traitement des rats avec le chlorure d'aluminium à la dose (100 mg/kg) pendant 42 jours, a montré une augmentation significative du taux du cholestérol. Cela a indiqué une perte d'intégrité de la membrane (**Sarin, 1997**). Ce bilan a une importance cruciale dans le diagnostic et le traitement de plusieurs maladies cardiovasculaires, métaboliques et maladies neurodégénératives (**Akuyam et al., 2007**). Nos résultats sont en accord avec la littérature. Une étude a montré que le chlorure d'aluminium augmente le taux de cholestérol (**El-Demerdash, 2004**). L'augmentation du cholestérol dans les radeaux lipidiques des membranes plasmiques facilite le contact de l'APP, présent dans les radeaux, avec la  $\beta$ -sécrétase conduisant à une production accrue de l'A $\beta$  (**Fonseca et al., 2010**). A travers sa propriété dyslipidémique, l'aluminium aurait contribué à une forte accumulation des lipides dans les radeaux de la membrane neuronale du cerveau conduisant à la MA (**John et al., 2015**). La dyslipidémie due au traitement à l'aluminium (taux élevé de cholestérol total, LDL..., entre autre) est attribuée en grande partie à l'accumulation d'aluminium dans le foie, provoquant une altération du métabolisme des lipides (**Fyiad, 2007 ; Wilhelm et al., 1996**).

Les résultats obtenus montrent que l'ingestion de l'huile d'argan et de l'huile d'olive aux rats a réduit le taux du cholestérol plasmatique et cela pourrait être expliqué en raison de la richesse de ces deux huiles en acide oléique et linoléique et de l' $\alpha$ -tocophérol (**Zarrouk et al., 2016b ; Berrougui et al., 2006 ; Berrougui et al., 2003**). En accord avec nos résultats, les phytostérols présents dans l'huile d'argan et l'huile d'olive inhibent l'absorption du cholestérol par des mécanismes complexes (**Ikeda and Sugano, 1998**). Il a été démontré que l'huile d'olive contenant un taux particulièrement élevé de la  $\beta$ -sitostérol est capable de s'opposer à l'absorption intestinale du cholestérol (**Osland, 2002**). Plus précisément, les phytostérols font diminuer la concentration de "mauvais" cholestérol (LDL) (low density lipoprotein) sans faire baisser le taux de "bon" cholestérol (HDL) (light density lipoprotein).



Comme les phytostérols ressemblent au cholestérol, ils entrent en compétition avec ce dernier et réduisent l'absorption au niveau de l'intestin. Par contre, leur biodisponibilité est très faible, c'est-à-dire qu'ils sont mal absorbés. Il faut une dose de 2 à 2,4 g par jour pour réduire l'absorption du cholestérol alimentaire d'environ 40% (**Ostlund, 2002**). De plus, la réduction d'absorption causée par les phytostérols est associée à une augmentation de près de 20% de la synthèse du cholestérol par le foie, ce qui donne un effet final modeste sur le taux de cholestérol de l'ordre de 15% de réduction du cholestérol total et de 10% des LDL ou mauvais cholestérol (**Miettinen and Gylling, 2004**). De plus, les effets des stérols et plus particulièrement le spinastérol sont documentés pour provoquer une réduction du taux de cholestérol dans le plasma et le foie des souris, modulés aussi par une augmentation de l'excrétion fécale (**Uchida et al., 1983**). Selon une méta-analyse de 41 études cliniques, la réduction du cholestérol total sanguin varie entre 4 et 15% avec une moyenne de 10% (**Miettinen and Gylling, 2004**). Il faut aussi savoir que les stérols sont des molécules très peu solubles et qu'elles ont une efficacité erratique d'une personne à l'autre (**Katan, 2003**). Chez l'animal, des travaux de recherche ont montré clairement que le spinastérol réduit le cholestérol plasmatique et hépatique chez la souris (**Uchida et al., 1983**). Il est connu que l'administration des stérols végétaux, par voie orale ou parentérale, entraîne une diminution des concentrations plasmatiques du cholestérol total (**Law, 2000**), due à la grande similitude des propriétés physicochimiques des stérols avec celles du cholestérol. Ainsi, les stérols végétaux inhibent l'absorption intestinale du cholestérol par l'empêchement de son estérification, en restant ainsi libre, moins soluble et moins absorbable (**Adlouni, 2010**).

Une étude a montré que l'administration de l'huile d'argan à une dose de 5 mL/kg par jour chez des rats spontanément hypertendus pendant 10 jours a permis une diminution du taux de cholestérol sanguin. Une étude similaire, portant sur des gerbilles *Meriones shawi* rendues hyperlipémiques par un régime hypercalorique enrichi en cholestérol, a montré une diminution de 37 % du taux de cholestérol sanguin, de 67 % des LDL, de 31 % des triglycérides et de 13 % du poids corporel, après sept semaines de traitement à l'huile d'argan à raison de 1 ml/100g par jour (**Berrougui et al., 2003**). L'activité hypocholesérolémiant de l'huile d'argan a été prouvée par des essais cliniques. La consommation pendant un mois, de deux cuillères à soupe par jour d'huile d'argan induit une baisse du taux de cholestérol de 7,9 % pour les femmes et de 13,1 % pour les hommes à la fin du traitement. Parallèlement à la baisse du taux de cholestérol total, une diminution du taux des triglycérides a été observée (**Charrouf et al., 1997**). Les résultats obtenus dans notre étude semblent être à l'opposé de

nos prédictions. Nos résultats montrent une augmentation du taux de triglycérides chez les rats traités avec les différentes huiles (colza, olive et argan) et la poudre d'amande d'arganier alors qu'il y a aucune variation du taux de triglycérides chez les rats traités avec le chlorure d'aluminium (100 mg/kg).

Nous avons montré aussi que l' $\text{AlCl}_3$  (100 mg/kg) conduit à une baisse significative du glucose plasmatique par rapport au groupe contrôle. Cela peut suggérer que la toxicité de l'Al pourrait aggraver la demande d'énergie cellulaire et conduire à une utilisation excessive du glucose par le cerveau (Dua *et al.*, 2010). L'urée est formée dans le foie, il constitue la principale voie métabolique d'excrétion du surplus d'azote corporel. L'urée, filtrée par les glomérules, est partiellement réabsorbée par les tubules. Son taux plasmatique reflète l'équilibre entre sa production et son excrétion. Le dosage de l'urée, comme étant un test de surveillance de la fonction rénale montre aucune variation des taux de ce dernier dans le plasma des animaux traités et non traités avec le chlorure d'aluminium (100 mg/kg). Les transaminases catalysent la réaction de transfert d'un groupe amine d'un acide aminé. Le groupe amine est transféré à l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique et provient soit de l'acide aspartique soit de l'alanine, ce qui définit l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT). Les transaminases sont largement distribuées dans divers tissus. L'ASAT est particulièrement abondante au niveau du coeur, du foie, des muscles squelettiques, des reins (par ordre décroissant). L'ALAT se retrouve essentiellement au niveau hépatique. L'ALAT est présente uniquement dans le cytosol, alors que l'ASAT est également présente dans les mitochondries. L'ASAT et l'ALAT sont des indicateurs de souffrance cellulaire. Une augmentation de leur concentration dans le sang serait synonyme d'atteinte hépatique. Se sont généralement utilisées comme marqueurs précoces de toxicité hépatique, parce qu'elles apparaissent dans le sang en cas de dommages cellulaires au niveau des hépatocytes. Nos résultats montrent qu'il y a aucune différence significative concernant les taux sanguins d'ASAT et d'ALAT entre les groupes traités avec l' $\text{AlCl}_3$  (100 mg/kg) ainsi que ceux traités avec les huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de poudre de graine d'arganier.

##### **5. Effet de l'huile d'argan et du chlorure d'aluminium sur les marqueurs du stress oxydant**

La rupture de l'hémostase métallique a été impliquée dans de nombreux troubles neurodégénératifs et les dysfonctionnements cognitifs. L'aluminium est le meilleur métal abondant dans la nature mais qui n'a pas connu un rôle biologique. Chez l'homme, l'aluminium joue un rôle causal dans plusieurs maladies. De nombreuses études ont démontré

que les concentrations en aluminium sont élevées dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, et la démence sénile de type MA. De plus, l'aluminium a été bien rapporté d'être neurotoxique.

Comme les dommages oxydatifs sont médiés par les radicaux libres, il était nécessaire d'enquêter sur l'état endogène des enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase et les glutathions, qui sont la première ligne de défense contre les dommages des radicaux libres dans les conditions oxydatives. Dans notre étude, l'administration chronique de l' $\text{AlCl}_3$  à la dose (100 mg/kg.p.c) pendant 42 jours, a conduit à une diminution marquée de la catalase, la superoxyde dismutase, le glutathion réduit, le glutathion peroxydase, au niveau du cortex. A l'opposé, toutes ces enzymes sont augmentées au niveau d'hippocampe et du foie, à l'exception de la catalase qui reste diminuée au niveau du cortex et de l'hippocampe.

A l'instart de ces résultats, l'inhibition du système antioxydant et les activités enzymatiques au niveau du cortex peuvent être expliqués en raison que ces enzymes sont les cibles potentielles de l'aluminium, puisque ces enzymes dépendent de divers oligo-éléments essentiels à leur activité. Cela est en accord avec l'hypothèse renforçant que l'inhibition du système antioxydant et les activités enzymatiques au niveau neuronal pourraient résulter des modifications oxydatives des gènes qui contrôlent ces enzymes (**Naidu et al., 2013**). Cette diminution des activités enzymatiques pourrait être liée à une synthèse réduite des enzymes en raison des concentrations intracellulaires élevées d'aluminium ou de l'accumulation des radicaux libres et donc peut conduire à une neurotoxicité sévère de l'Al dans le cortex et l'hippocampe (**Sumath et al., 2013 ; Tripathi et al., 2009**). L'accumulation de l'aluminium détruit le système antioxydant dans le cerveau, telque la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion. Dans les conditions de stress oxydatif, la SOD présente la première ligne de défense contre le superoxyde et il convertit l'anion superoxyde en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$  (**Fridovick, 1975**). Elle a également un rôle important dans la détoxification radicale d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui est ensuite convertie en  $\text{H}_2\text{O}$  par CAT et GSH. Le GSH sous sa forme réduite est l'antioxydant intracellulaire le plus abondant, qui est impliqué dans le balayage des radicaux libres ou servant de substrat pour la glutathion peroxydase qui catalyse la détoxification de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Kumar et al., 2011**). C'est un cofacteur essentiel pour les antioxydants comme la GPx et la CAT. Une diminution de l'activité GSH conduit a des taux élevés de lipides et de protéines. Il est également connu que la SOD et la catalase sont des enzymes de protection et elles travaillent en association très étroite pour la désintoxication des radicaux libres hautement réactifs.

En concordance avec les résultats obtenus, une étude récente a montré, que suite à une exposition au  $\text{AlCl}_3$  à la dose 50 mg/kg. p.c pendant 42 jours, induit une diminution de l'activité de la catalase, la SOD et le GSH au niveau de l'hippocampe et le cortex (**Al-Amin et al., 2016**). **Lakshmi, (2015)** a montré qu'une exposition au  $\text{AlCl}_3$  (100 mg/kg p.c.) pendant 21 jours, une diminution de l'activité SOD, CAT et GSH a été constatée dans le cerveau des rats. Une exposition pendant 60 jours au  $\text{AlCl}_3$  (175 mg/kg.p.c) a induit une diminution de la CAT et GSH au niveau de l'hippocampe et le cortex frontal (**John et al., 2015**). Une administration de 1 mg/100 mL de l'aluminium pendant 20 semaines a fait augmenter l'activité de la SOD au niveau de l'hippocampe. Une autre étude dans le même sens a montré, que suite à une exposition au  $\text{AlCl}_3$  à la dose de 4,2 mg/kg/jr.p.c, pendant 4 semaines, une diminution significative de l'activité de la CAT, SOD, GPx et le taux du GSH a été observée. **Sumath et al., (2013)** a montré qu'une exposition chronique au  $\text{AlCl}_3$  (100 mg/kg p.c.) pendant 8 semaines, a conduit à une diminution de l'activité SOD et CAT dans le cervelet, l'hémisphère cérébral et le tronc cérébral en suggérant que l'Al a un effet pro-oxydant et agit comme une neurotoxine sur l'activité de ces enzymes (**Nehru and Anand, 2005**). L'administration de chlorure d'aluminium à des doses de 0,7 et 35 mg / kg.p.c, pendant 14 jours a conduit à une concentration supérieure en Al dans l'hippocampe et le cervelet. Des rats Wistar ont reçu une dose de 50 mg/kg d' $\text{AlCl}_3$  dans l'eau potable pendant 6 mois, a conduit au stress oxydatif lié aux dommages des lipides, protéines et des activités SOD, GPx suggérant que le système antioxydant pourrait jouer un rôle crucial dans l'atténuation du stress oxydatif (**Sethi et al., 2008**). Dans une autre étude, des rats mâles Winstar, ont administré le chlorure d'aluminium (50 mg/kg) pendant 30 jours, par voie orale, une diminution de l'activité SOD, GSH a été observée (**Jyoti et al., 2007**). Une étude réalisée par **Fattoretti et al., (2003)** a montré que suite à une exposition au  $\text{AlCl}_3$  (2 g/L) pendant 6 mois, une augmentation de la surface des fibres moussues dans la zone hippocampique CA3 ce qui indique une augmentation des dommages hippocampiques. Une administration de chlorure d'aluminium (10, 50 ou 300 mg d'Al/kg.p.c) par l'alimentation pendant 100 jours a également montré une diminution de l'activité SOD dans l'hippocampe et les régions du cortex cérébral des souris indiquant l'accumulation des dommages oxydatifs dans le cerveau (**Rui and Yongjian, 2010**). Des études ont montré qu'une administration de 10 mg/kg.p.c, induit une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase dans le cerveau des rats (**Sánchez-Iglesias et al., 2009 ; Julka and Gill, 1996**).

L'augmentation de l'activité de la SOD, GPx et GSH dans l'hippocampe, des rats traités avec l' $\text{AlCl}_3$ , est en accord avec les études ayant montré que l' $\text{AlCl}_3$  est capable d'entraîner une augmentation significative de l'activité SOD, catalase, GPx dans diverses régions du cerveau y compris l'hippocampe (**Yuan et al., 2012**). Les mêmes résultats sont rapportés par **Esparza (Esparza et al., 2005)**. L'augmentation de l'activité SOD a également été observée dans toutes les structures du cerveau après un traitement avec l'Al. Les changements de l'activité de la SOD s'accompagne parallèlement avec une production de l' $\text{O}_2^-$ . Nos résultats sont aussi cohérents avec l'étude de **Resende et al., (2008)** qui ont signalé une augmentation significative des activités de SOD et de la GPx dans le cerveau du modèle de souris transgéniques triple de la MA. Une augmentation de l'activité SOD a été trouvée chez les patients atteints de démence (**de Lustig et al., 1993**). Les résultats **Micic et al., (2003)** ont montré une augmentation significative de l'activité de la SOD dans le cerveau des gerbilles après 24 et 96 h d'administration de l'Al. Après 24 h de traitement avec deux concentrations d' $\text{AlCl}_3$ ;  $\text{DL}_{25}$  (1,96 g/kg.c.p)  $\text{DL}_{50}$  (3,7 g/kg.p.c), pendant 21 jours, une augmentation de l'activité de la SOD a été observée dans les structures du cerveau dont l'hippocampe et le cortex. Les changements dans l'activité de la SOD étaient parallèles avec l'augmentation de  $\text{O}_2^-$  (**Vucetic-Arsic et al., 2013**). D'autre part **Ansari and Scheff, (2010)** a obtenu une corrélation entre l'examen mini-mental et le déclin significatif des antioxydants, tels que la SOD du cortex frontal post mortem humain des individus caractérisés par les stades moyens et tardifs de la MA. Il est probable que l'augmentation de l'activité SOD est un événement précoce dans la MA qui est suivi par une diminution consécutive dans les stades développés de la maladie.

En ce qui concerne le foie, les résultats des activités enzymatiques de la CAT, SOD et taux du GSH sont difficiles à interpréter comparativement à la littérature. Les résultats trouvés dans le foie sont complètement l'inverse de ce que nous avons observé dans le cortex. Nos résultats ont montré qu'il n'y a aucune différence significative de l'activité de la catalase hépatique par rapport aux rats non traités. Néanmoins, les résultats du foie sont conformes par rapport à **Abubakar et al., (2004)** ; **Bondy et al., (1998)**, qui ont montré que l'aluminium induit une augmentation de l'activité de la SOD et celle de GSH par rapport aux rats contrôles. A l'opposé, des études antérieures ont montré que le traitement avec l'aluminium a conduit à une diminution significative de l'activité de la SOD et la CAT dans le foie des rats traités avec l'aluminium (**Al-Amin et al., 2016** ; **Tahari et al., 2016** ; **Al-Hashem, 2009** ; **Swain and Chainy, 1998**). Ces constatations contradictoires sont difficiles à

interpréter du fait que les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine de la toxicité au  $AlCl_3$  qui fait augmenter l'activité de ces enzymes sont encore très peu compris. La variation entre les résultats obtenus par les différentes études est due aux conditions expérimentales, notamment l'espèce animale, l'origine et la forme de l'aluminium utilisé ainsi que la quantité administrée et la durée de traitement.

Comme pour l' $AlCl_3$  le traitement des rats avec 6% des huiles (colza, olive, argan) et 14,3% de la poudre de graine d'arganier pendant 42 jours a montré une diminution significative de l'activité CAT, SOD, GPx et GSH au niveau du cortex, et une augmentation de la SOD et GPx au niveau de l'hippocampe. L'activité de la CAT reste toujours faible au niveau de ces deux zones. Nos résultats témoignent la richesse de nos huiles (argan, olive, colza) en tocophérols totaux (plus particulièrement  $\alpha$  et  $\gamma$  tocophérols) par rapport aux autres huiles. Cependant, il a été suggéré que la vitamine E a un effet biphasique, qui peut être à la fois anti et pro-oxydant. Cela dépend de la durée et la dose de traitement. Les rats reçoivent quotidiennement une nourriture supplémentée des huiles, ce qui a induit des changements adaptatifs dans les défenses anti-oxydantes. A l'instar des résultats obtenus, la diminution des activités enzymatiques pourrait être expliquée par les effets potentiels pro-oxydants de la vitamine E, présente en taux élevée, due à la formation du radical tocophéryle (**Abubakar et al., 2004 ; Stocker, 1999**). Cependant, ce résultat négatif semble indiquer que, bien que le système de défense de l'enzyme est actif et répond aux agressions oxydantes puissantes, l'activité antioxydante des enzymes n'était pas sensible aux variations à court terme de la concentration du traitement. Les résultats de **Abubakar et al., (2004)** sont similaires avec nos conclusions. La supplémentation des rats avec la vitamine E seule a conduit à une diminution de la GSH au niveau du cortex et son augmentation au niveau de l'hippocampe. En ce qui concerne la CAT, la vitamine E l'a fait diminuer au niveau du cortex et l'hippocampe. Cependant, il y a eu des rapports précédents indiquant que la vitamine E peut augmenter les niveaux des enzymes antioxydantes dans d'autres tissus (**Zaidi and Banu, 2004**), y compris le foie (**Lii et al., 1998**). Bien que l'huile d'argan contient des polyphénols en éléments de traces, une étude *in vitro* a montré qu'une forte dose de la quercétine réduit significativement la CAT et GPx (**Alia et al., 2006**). Des études antérieures ont décrit que les fortes concentrations de plusieurs antioxydants conduisent à des changements dans l'activité enzymatique ainsi que l'expression de leur gènes (**Duthie et al., 2000 ; Röhrdanz et al., 2002 ; Breinholt, 1999**). Les résultats obtenus dans ces études semblent être à l'opposé de nos prédictions. L'effet de l' $AlCl_3$  n'a pas été renversé par l'huile d'argan, l'huile de colza et

l'huile d'olive et la poudre de graine d'arganier et cela peut être du à une différence de compartimentation (**Abubakr et al., 2004**). Toutes les huiles étudiées contiennent des phytostérols (**Badreddine et al., 2015 ; Zarrouk et al., 2016b**). Il a été montré qu'une mixture des phytostérols peut avoir des effets antioxydants particulièrement la bêta-sitostérol, le stigmastérol, et le campestérol, contre la peroxydation lipidique. Il est possible que des fortes concentrations des phytostérols sont incapables de piéger les ERO signifiant une déffillance du système antioxydant (**Yoshida and Niki, 2003 ; Ferretti et al., 2010**).

**Conclusion**

**et**

**Perspectives**





## Conclusion et Perspectives

L'alimentation figure parmi les facteurs environnementaux susceptibles de jouer un rôle important dans le développement ou la diminution du risque des maladies. En effet, de nombreuses études ont montré que les maladies neurodégénératives peuvent être fortement influencés par l'alimentation notamment l'apport en lipides et en anti-oxydants.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une valorisation d'une huile alimentaire endémique du sud-ouest marocain : l'huile d'argan. Cette huile pourrait être utilisée dans un cadre de prévention nutritionnelle pour prévenir la progression des maladies chroniques comme la maladie d'Alzheimer, où le stress oxydant est un élément clé. En effet, l'objectif de notre travail a consisté à chercher des molécules naturelles, d'origine nutritionnelle, afin de protéger contre la toxicité induite par le 7KC et l'AlCl<sub>3</sub>. Dans cette étude, nous avons choisi l'huile d'argan, comme une huile végétale riche en anti-oxydants et bien positionnée entre la nutrition et la santé.

Le screening phytochimique sur les cinq parties de la plante d'*Argania spinosa* (amande, coque, pulpe, feuilles et rameaux), a montré que les extraits préparés à partir de cette plante sont riches en polyphénols, flavonoïdes et qu'ils sont dotés d'un bon pouvoir anti-oxydant et chélateur de fer pour certains extraits. En effet, l'huile d'argan extraite à partir de cette plante est extrêmement riche en tocophérols, stérols et acides gras ce qui lui confère des propriétés anti-oxydantes importantes susceptibles d'attribuer à cet aliment un intérêt thérapeutique dans le cadre de la prévention des maladies neurodégénératives. Compte tenu de l'originalité de la composition chimique de la fraction insaponifiable de l'huile d'argan, nous avons testé cette huile sur un modèle animal et un modèle cellulaire afin de prouver ses effets bénéfiques obtenus chimiquement.

Les résultats obtenus *in-vivo* sur un modèle animal, montrent que l'AlCl<sub>3</sub> induit une diminution des activités des enzymes antio-oxydantes (catalase, superoxyde dismutase, les glutathions) au niveau du cortex, une altération des fonctions cognitives qui ont été étroitement liées aux maladies neurodégénératives, et des modifications des paramètres plasmatiques. Au niveau cellulaire, sur des cellules d'oligodendrocytes murins 158N, nos résultats montrent que le 7KC et l'AlCl<sub>3</sub> conduisent aux modifications suivantes: inhibition de la croissance cellulaire, perte d'adhésion, modification des caractéristiques fonctionnelles de la mitochondrie (chute de potentiel transmembranaire mitochondrial  $\Delta\Psi_m$ ), rupture de l'équilibre RedOx (surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène), augmentation de la

perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'iodure de propidium, induction d'apoptose et d'autophagie, diminution de la prolifération et dysfonctions du lysosome. La lipotoxicité du 7KC affecte aussi l'expression des marqueurs peroxysomaux (ABCD1, ABCD2, ABCD3, ACOX1) ainsi que l'expression de facteur de transcription PPAR $\alpha$  au niveau cellulaire.

Les résultats révèlent que l'huile d'argan ou certains de ses composés sont capables de s'opposer en partie aux effets secondaires induits par le 7KC et l'AlCl<sub>3</sub>, ce qui suggère une nouvelle activité biologique de l'huile d'argan sur les cellules du système nerveux central qui pourrait avoir de l'intérêt pour prévenir les maladies neurodégénératives. De nos jours, aucune étude sur l'effet protecteur de l'huile d'argan contre les maladies neurodégénératives n'a été réalisée ce qui fait l'originalité de notre travail.

Compte tenu des résultats obtenus, plusieurs perspectives de travail peuvent être envisagées.

❖ **Les études sur le screening phytochimique seront prolongées pour :**

- Utiliser d'autres procédés d'extraction pour extraire les meilleurs des métabolites secondaires ayant des propriétés anti-oxydantes importantes.
- Identifier par des analyses chromatographiques (HPLC, CPG ...), les molécules présentes dans les extraits d'arganier ayant montré un effet protecteur, afin de pouvoir purifier et isoler ces molécules pour un intérêt thérapeutique ultérieur.

❖ **Les études *in vitro* seront prolongées pour :**

- Les sites d'accumulation chlorure d'aluminium dans la cellule qui sont encore à préciser.
- L'accumulation de chlorure d'aluminium dans des membranes d'organites cellulaires (mitochondrie, peroxysome) n'est pas à exclure ce qui pourrait ainsi contribuer au dysfonctionnement mitochondrial et aux désordres lipidiques observés.
- La chronologie des événements conduisant à la mort cellulaire (stress oxydant, autophagie, apoptose) ainsi que les interactions entre ces différents événements.
- L'origine du stress oxydant.

L'huile d'argan ou certains de ces composants majoritaires (vitamine E, spinastérol, schotténol et acide férulique) s'opposent aux effets délétères du 7KC et d'AlCl<sub>3</sub>, mais les mécanismes physiologiques précis conduisant à cette protection reste à élucider. Il serait donc intéressant de :

- Etudier comment l'huile d'argan est capable de bloquer la mort cellulaire et le stress oxydant au niveau cérébrale.
- Doser le spinastérol, schotténol, et acide férulique au niveau du cerveau des rats traités avec le chlorure d'aluminium afin d'identifier lequel de ces composés est capable de s'opposer à cette toxicité.

**❖ Sur le modèle animal, il serait souhaitable de :**

- Choisir une large gamme de concentrations de chlorure d'aluminium, dans le but de connaître celle à partir de laquelle commence les lésions cérébrales.
- Traiter les rats avec le chlorure d'aluminium pendant une longue période tout en se plaçant dans la toxicité chronique afin de souligner l'accumulation de chlorure d'aluminium au niveau cérébrale.
- Effectuer des contrôles des niveaux d'aluminium plasmatique dans le but d'évaluer leurs taux circulant et éliminé..
- Etudier les mécanismes de toxicité du chlorure d'aluminium qui affectent la mémoire.
- Evaluer l'effet du chlorure d'aluminium sur l'inflammation, par un dosage des marqueurs clé de l'inflammation (IL-6, TNF ...).
- Etudier l'expression des marqueurs de stress oxydatif par Q-PCR.
- Evaluer l'effet du chlorure d'aluminium à court et à long terme sur des rats plus âgés que ceux que nous avons utilisés car le stress oxydatif augmente avec l'âge et donc si on se place dans ces conditions, un traitement avec chlorure d'aluminium peut donner un meilleur modèle pour étudier les maladies neurodégénératives.
- Evaluer l'effet du chlorure d'aluminium sur des rats et / ou des souris transgéniques (Alzheimer) présentant des symptômes des maladies neurodégénératives.

Fait intéressant, les résultats obtenus confirment que l'huile d'argan méritent d'être exploités en tant que suppléments nutritionnels et pharmaceutiques en raison de ses propriétés anti-oxydantes, ce qui pourrait contribuer à la sauvegarde de l'arganier.

Il est donc aussi, possible d'envisager une alimentation contrôlée ou fonctionnelle avec l'huile d'argan (ou certains de ses composés) afin de prévenir certaines formes de neurodégénérescences.

**Références**

**Bibliographiques**

**Références Bibliographiques**

- **Abreo K, Abreo F, Sella ML, Jain S.** Aluminum enhances iron uptake and expression of neurofibrillary tangle protein in neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 1999; 72:2059–64.
- **Abreo K and Malluche HH.** Effect of 1-25-vitamin D and parathyroidectomy on the uptake of aluminium in bone of rats with renal insufficiency. *Am J Nephrol.* 1988 ; 8 : 426-430.
- **Abubakar MG, Taylor A, Ferns GA.** Regional accumulation of aluminium in the rat brain is affected by dietary vitamin E. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;18(1):53-9.
- **Adlouni A.** L’huile d’argan, de la nutrition à la santé. *Phytothérapie.* 2010 ; 8, 89-97.
- **Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K.** Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2000a;14 Suppl 1:S47-53.
- **Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T.** Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000b;21(3):383-421.
- **Akuyam SA, Isah HS, Ogala WN.** Evaluation of serum lipid profile of under-five Nigerian children. *Ann Afr Med.* 2007;6(3):119-23.
- **Al-Amin MM, Reza HM, Saadi HM, Mahmud W, Ibrahim AA, Alam MM, Kabir N, Saifullah AR, Tropea ST, Quddus AH.** Astaxanthin ameliorates aluminum chloride-induced spatial memory impairment and neuronal oxidative stress in mice. *Eur J Pharmacol.* 2016 Apr 15; 777:60-9.
- **Alfrey AC.** Aluminum Intoxication Recognition and Treatment. In : *Aluminum in Chemistry, Biology and Medicine. A series of Advances. Vol 1.* Edited by Nicolini, M., Zatta, P.F. and Corain, B., New York / Raven Press. 1991 ; 80-81.
- **Al-Hashem F.** Camel's Milk Protects against Aluminum Chloride-Induced Toxicity in the Liver and Kidney of White Albino Rats. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 2009 ;5, (3): 98-108.

- **Altmann R.** Die elementarorganismen und ihre beziehungen zu den zellen. Veit, Leipzig. 1890.
- **Alves de Almeida E, Celso Dias Bainy A, Paula de Melo Loureiro A, Regina Martinez G, Miyamoto S, Onuki J, Fujita Barbosa L, Carrião Machado Garcia C, Manso Prado F, Eliza Ronsein G, Alexandre Sigolo C, Barbosa Brochini C, Maria Gracioso Martins A, Helena Gennari de Medeiros M, Di Mascio P.** Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment : antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;146(4):588-600. Epub 2006 Apr 19.
- **Alzheimer A.** Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.* 1907 ; 64, 146– 148.
- **Amador FC, Santos MS, Oliveira CR.** Lipid peroxidation facilitates aluminum accumulation in rat brain synaptosomes. *J Toxicol Environ Health A.* 1999; 58:427–35.
- **Anane R, Bonini M and Creppy EE.** Transplacental passage of aluminum from pregnant mice to fetus organs after maternal transcutaneous exposure. *Hum Exp Toxicol.* 1997 ; 16 : 501-504.
- **Anane R, Bonini M, Grafeille JM, Creppy EE.** Bioaccumulation of water soluble aluminium chloride in the hippocampus after transdermal uptake in mice. *Arch Toxicol.* 1995 ; 69 :568–571.
- **Ansari MA, Scheff, SW.** Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease 344 in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010; 69, 155–167.
- **AOAC International AOAC:** Official Methods of Analysis. 1990; (Volume 1).
- **Apelt J, Ach K, Schliebs R.** Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. *Neurosci. Lett.* 2003 ; 339, 183–186.
- **Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR.** Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease : A Review on the Antioxidant and Antiinflammatory Activity of Polyphenols. *Neurochem Res.* 2008 ; 33(12) :2416-26.
- **Aremu DA and Meshitsuka S.** Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. *Brain Res.* 2005 ; 1031 :284–96.

- **Ashokkumar P and Sudhandiran G.** Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacother.* 2008 ; 62: 590-597.
- **Asili E and Sharifzadeh M.** Effects of Aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) on spatial memory: association with oxidative stress. Executive Editor, 2011 - sid.ir.
- **Astier C, Benchad Yel A, Moneret-Vautrin DA, Bihain BE, Kanny G.** Anaphylaxis to argan oil. *Allergy.* 2010 ;65(5):662-3.
- **Atsdr.** Toxicological profile for aluminum. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, GA. 2008 ; p. 357. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.html>, Last Updated August 7, Accessed on July 4 2010.
- **Aubourg P and Wanders R.** Peroxisomal disorders. *Handb Clin Neurol.* 2013 ; 113 :1593–1609.
- **Baarine M, Andréoletti P, Athias A, Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Vejux A, Riedinger JM, Kattan Z, Bessede G, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, Lizard G.** Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid--treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience.* 2012 ;28 ;213 :1-18.
- **Baarine M, Ragot K, Genin EC, El Hajj H, Trompier D, Andreoletti P, Ghandour MS, Menetrier F, Cherkaoui-Malki M, Savary S, Lizard G.** Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP) : potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *J Neurochem.* 2009 ; 111 (1) : 119-131.
- **Badreddine A, Karym EM, Zarrouk A, Nury T, El Kharrassi Y, Nasser B, Cherkaoui Malki M, Lizard G, Samadi M.** An expeditious synthesis of spinasterol and schottenol, two phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, and evaluation of their biological activities on cells of the central nervous system. *Steroids.* 2015 ; 99, 119-24.
- **Bakchine S, Habert MO.** Classification des démences : aspects nosologiques. *Médecine Nucléaire.* 2007 ; 31, 278-293.
- **Balaraman Y, Limaye AR, Levey AI, Srinivasan S.** Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  And Alzheimer's Disease : Pathophysiological And Therapeutic Significance. *Cell Mol. Life Sci.* 2006 ;63(11) :1226-35.



- **Balasundram N, Sundram K, Samman S.** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products : antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006 ; 99 : 191–203.
- **Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM.** Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid  $\beta$ -peptide deposition. *Nat Genet*. 1997 ;17(3):263-4.
- **Bani-Aameur F.** Phenological phases of *Argania spinosa* (L.) Skeels flower. *For Genetics*. 2000 ;7 : 333-8.
- **Banks WA and Kastin AJ.** Aluminum-induced neurotoxicity: Alterations in membrane function at the blood-brain barrier. *Neurosci Biobehav Rev*. 1989;13(1):47-53.
- **Barger SW and Harmon AD.** Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature*. 1997 ; 388 :878–81.
- **Barouki R.** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences* 2006 ; 22 : 266-72.
- **Bartzokis G.** Age-related myelin breakdown : a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004 ;25(1):5-18; author reply 49-62.
- **Baumann N and Pham-Dinh D.** Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological reviews*. 2001 ;81(2) : 871-927.
- **Beal MF.** Mitochondria and neurodegeneration. *Novartis Found Symp*. 2007 ; 287 : 183-192.
- **Becaria A, Campbell A, Bondy SC.** Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health* 2002; 18:309–20.
- **Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D.** Hydrogen peroxide mediates amyloid b protein toxicity. *Cell*. 1994 ;77 :817–827.
- **Behrendt G, Baer K, Buffo A, Curtis MA, Faull RL, Rees MI, Gotz M, Dimou L.** Dynamic changes in myelin aberrations and oligodendrocyte generation in chronic amyloidosis in mice and men. *Glia*. 2013;61(2):273-8
- **Bellahcen S, Hakkou Z, Ziyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Aziz M, Bnouham M.** Antidiabetic and antihypertensive effect of Virgin Argan Oil in model of neonatal streptozotocin-induced diabetic and l-nitroarginine methylester (l-NAME) hypertensive rats. *J Complement Integr Med*. 2013 ; 6;10.

- **Bellahcen S, Mekhfi H, Ziyat A, Legssyer A, Hakkou A, Aziz M, Bnouham M.** Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil. *Phytother Res.* 2012 ; 26(2) :180-5.
- **Bennani H, Drissi A, Giton F, Kheuang L, Fiet J, Adlouni A.** Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev.* 2007 ; 31(1) :64-9.
- **Bentabet N, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K.** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie.* 2014 ; Volume 12, Issue 6, pp 364–371.
- **Benzaria A, Meskini N, Dubois M, Croset M, Némoz G, Lagarde M, Prigent AF.** Effect of dietary argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes. *Nutrition.* 2006 ;22(6):628-37.
- **Benzina S, Altmeyer A, Malek F, Dufour P, Denis JM, Gueulette J, Bischoff P.** High-LET radiation combined with oxaliplatin induce autophagy in U-87 glioblastoma cells. *Cancer letters.* 2008; 264, 63-70.
- **Berrougui H , Ettaib A, Herrera Gonzalez MD, Alvarez de Sotomayor M, Bennani-Kabchi N, Hmamouchi M.** Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol.* 2003 ;89(1):15-8.
- **Berrougui H, Alvarez de Sotomayor M, Perez-Guerrero C, Ettaib A, Hmamouchi M, Marhuenda E, Herrera MD.** Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.* 2004 ; 92, 921-929.
- **Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Khalil A.** Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis.* 2006 ;184(2):389-96.
- **Beyer WF and Fridovich I.** Assaying for superoxide dismutase activity : some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem.* 1987; 161(2):559-66.
- **Bharathi, Shamasundar NM, Sathyanarayana Rao TS, Dhanunjaya Naidu M, Ravid R, Rao KS.** A new insight on Al-maltolate-treated aged rabbit as Alzheimer's animal model. *Brain Res Rev.* 2006 ; 52(2) :275-92.

- **Bismuth C.** Toxicologie clinique. Paris : Médecine-Sciences Flammarion. 2000 ; 1092p.
- **Bjorkhem I and Meaney S.** Brain cholesterol : long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2004 ; 24, 806-815.
- **Björkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E.** Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase : evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ;91 :8592-8596.
- **Bliss TVP, Collingridge GL, Morris RG.** Synaptic plasticity in health and disease : introduction and overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013 ; 2;369 (1633):20130129.
- **Bnouham M, Bellahcen S, Benalla W, Legssyer A, Ziyat A, Mekhfi H.** Antidiabetic activity assessment of *Argania spinosa* Oil. *J Complement Integr.* 2008 ; 5 : 32.
- **Bodovitz S and Klein WL.** Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem.*1996 ; 271 : 4436-4440.
- **Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW, Björkhem I.** On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett.* 2001 ; 314, 45–48.
- **Bohr VA, Stevnsner T, de Souza-Pinto NC.** Gene. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. 2002 ;6, 286(1) :127-34.
- **Bondy SC, Guo-Ross SX, Pien J.** Mechanisms underlying the aluminium-induced potentiation of the prooxidant properties of transition metals. *Neurotoxicology.* 1998 ; 19(1) :65-71.
- **Borel P, Preveraud D, Desmarchelier C.** Bioavailability of vitamin E in humans: an update. *Nutrition reviews.* 2013; 71, 319-331.
- **Bors W, Heller W, Michel C, Satan M.** Flavonoids as antioxidants : determination of radical-scavenging-efficiencies. *Methods in Enzymology.* 1990 ;186, p. 343.
- **Boudey M, Bureau F, Place C, Neuville D, Drosdowsky M, Arhan P, Bougle D.** Effect of small variations of aluminum intake on calcium metabolism in young rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997 ; 24 : 124-127.
- **Boumhras M, Ouafik S, Nury T, Gresti J, Athias A, Ragot K, Nasser B, Cherkaoui-Malki M, Lizard G.** Determination of heavy metal content and lipid

profiles in mussel extracts from two sites on the moroccan atlantic coast and evaluation of their biological activities on MIN6 pancreatic cells. *Environ Toxicol.* 2014 ; 29(11):1245-61.

- **Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G.** Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:1025-40
- **Braak H, Braak E.** Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.* 1991 ; 1(3) : 213-216.
- **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 1995 ; 28 : 25–30
- **Braverman NE and Moser AB.** Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012 ; 1822(9) :1442-1452.
- **Breinholt V, Lauridsen ST, Dragsted LO.** Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica.* 1999;29(12):1227-40.
- **Brenner S.** Aluminum neurotoxicity is reduced by dantrolene and dimethyl sulfoxide in cultured rat hippocampal neurons. *Biol Trace Elem Res.* 2002; 86(1):85-9.
- **Bretillon L, Sidén A, Wahlund LO, Lütjohann D, Minthon L, Crisby M, Hillert J, Groth CG, Diczfalusy U, Björkhem I.** Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett.* 2000 ; 293,87–90.
- **Breuer O and Björkhem I.** Use of an 18O<sub>2</sub> inhalation technique and mass isotopomer distribution analysis to study oxygenation of cholesterol in rat. Evidence for in vivo formation of 7-oxo-, 7 beta-hydroxy-, 24-hydroxy-, and 25-hydroxycholesterol. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 20278-84.
- **Breydo L and Uversky VN.** Role of metal ions in aggregation of intrinsically disordered proteins in neurodegenerative diseases. *Metallomics.* 2011 ; 3(11) :1163-80.
- **Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A.** The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(4):703-16.
- **Brinton RD.** The healthy cell bias of estrogen action : mitochondrial bioenergetics and neurological implications. *Trends Neurosci.* 2008 ; 31(10) : 529-537.
- **Brites P, Waterham HR, Wanders RJ.** Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2004 ; 1636 (2-3) : 219-231.

- **Brown J 3rd, Theisler C, Silberman S, Magnuson D, Gottardi-Littell N, Lee JM, Yager D, Crowley J, Sambamurti K, Rahman MM, Reiss AB, Eckman CB, Wolozin B.** Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2004 ; 279, 34674–34681.
- **Browne BA, McColl JG, Driscoll CT.** Aluminum speciation using morin : I. Morin and its complexes with aluminum. *Journal of Environmental Quality* 1990a;19:65-72.
- **Brun A and Englund E.** A white matter disorder in dementia of the Alzheimer type : a pathoanatomical study. *Ann Neurol.* 1986 ;19(3):253-62.
- **Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE.** Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain : mechanistic implications. *Ann Neurol.* 2005 ; 57, 695–703.
- **Buclez B.** L'aluminium au contact des aliments et la santé. *Ann Fals Exp Chim.* 1997 ; 90 : 207-216.
- **Buraimoh AA, Ojo SA, Hambolu JO, Adebisi SS.** Effects of Oral Administration of Aluminium Chloride on the Histology of the Hippocampus of Wistar Rats. *Current Research Journal of Biological Sciences.* 2011 : 3(5) : 509-515.
- **Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grösgen S, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weingärtner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lütjohann D, Hartmann T, Grimm MO.** Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease ? A mechanistical study. *J Neurosci.* 2013 ; 9 ;33(41) :16072-87.
- **Burnet FM.** Neurobiology of the trace elements. In *Neurotoxicology and neuropharmacology*, ed. Ivor Dreosti and Smith RM. New Jersey, Humana press Clifton, 1983 ; 2 : 258-265.
- **Burwen DR, Olsen SM, Bland LA, Arduino MJ, Reid MH, Jarvis WR.** Epidemic aluminum intoxication in hemodialysis patients traced to use of an aluminum pump. *Kidney Int.* 1995; 48(2):469-74.
- **Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson MP, Carney J.** b-amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion : implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 ;200 :710–715.
- **Cabrera-Vique C, Marfil R, Giménez R, Martínez-Augustin O.** Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil—an edible oil with potential as a functional food. *Nutrition Reviews.* 2012 ; vol. 70, no. 5, pp. 266–279.

- **Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirlini M, Bruni R.** Characterization of a potential nutraceutical ingredient : pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil unsaponifiable fraction. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010;65(3):277-83.
- **Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N Jr, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM.** Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron.* 2004 ; 2 ;43(5) :633-45.
- **Campbell A, Becaria A, Lahiri DK, Sharman K and Bondy SC.** Chronic exposure to Al in drinking water increases inflammatory parameters selectively in the brain. *J Neurosci Res.* 2004 ; 75 : 565–572.
- **Campbell A, Hamai D, Bondy SC.** Differential toxicity of aluminium salts in human cell lines of neural origin: implications for neurodegeneration. *Neurotoxicology.* 2001; 22:63–71.
- **Campbell A, Prasad KN, Bondy SC.** Aluminium-induced oxidative events in cell lines: glioma are more responsive than neuroblastoma. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:1166–71.
- **Campbell A.** The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2002 ; 2 : 17-20.
- **Campello S, Scorrano L.** Mitochondrial shape changes : orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.* 2010;11(9):678-84.
- **Canales JJ, Corbalán R, Montoliu C, Llansola M, Monfort P, Erceg S, Hernandez-Viadel M, Felipo V.** Aluminium impairs the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in cultured neurons and in rat brain in vivo: molecular mechanisms and implications for neuropathology. *J Inorg Biochem.* 2001;87(1-2):63-9.
- **Cardenas E and Ghosh R.** Vitamin E: a dark horse at the crossroad of cancer management. *Biochemical pharmacology.* 2013; 86, 845-852.
- **Cayuela JA, Rada M, Pérez-Camino MC, Benaissa M, Abdelaziz E, Guinda A.** Characterization of artisanally and semiautomatically extracted argan oils from Morocco. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2008 ; 110 : 1159-1166.
- **Chaboub LS and Deneen B.** Astrocyte form and function in the developing central nervous system. See comment in PubMed Commons below *Semin Pediatr Neurol.* 2013 ;20(4):230-5

- **Chafi AH, Hauw JJ, Rancurel G, Berry JP, Galle C.** Absence of aluminium in Alzheimer's disease brain tissue : electron microprobe and ion microprobe studies. *Neurosci Lett.* 1991 ;11;123(1):61-4.
- **Chamberlain KA, Nanesu SE, Psachoulia K, Huang JK.** Oligodendrocyte regeneration : its significance in myelin replacement and neuroprotection in multiple sclerosis. *Neuropharmacology.* 2015 October 22.
- **Charrouf Z and Guillaume D.** Argan oil : occurrence, composition and impact on human health. *Eur J Lipid Sci.* 2008 ; 110 : 632– 636.
- **Charrouf Z and Guillaume D.** Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J Ethnopharmacol.* 1999 ; 67 : 7–14.
- **Charrouf Z and Guillaume D.** Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*. *Am J Food Technol.* 2007 ; 2 : 679–683.
- **Charrouf Z and Guillaume D.** The rebirth of the argan tree or how to give a future to Amazigh women. In : Harpelle RL, Muirhead B, eds. *Long-Term Solutions for a Short-Term World : Canada and Research Development.* Waterloo : WLU Press. 2010 ; 13 : 978-1-55458-223-5.
- **Charrouf Z, El Kabouss A, Nouaim R, Bensouda Y, Yaméogo R.** Etude de la composition chimique de l'huile d'argan en fonction de son mode d'extraction. *Al Biruniya,* 1997 ; 13 : 35-9.
- **Charrouf Z, Guillaume D, Driouich A.** The argan tree, an asset for Morocco. *Biofutur.* 2002 ; 220 : 54–57.
- **Charrouf Z.** Valorisation des produits de l'arganier In : actes des journées d'étude sur l'arganier, Essaouira. 1995 ; 29-30.
- **Chaussod R, Adlouni A, Christon R.** L'arganier et l'huile d'argane au Maroc : vers la mutation d'un système agroforestier traditionnel ? Enjeux et contribution de la recherche. *Cahiers Agricultures.* 2005 ; vol. 14, n° 4.
- **Chen CH, Zhou W, Liu S, Deng Y, Cai F, Tone M, Tone Y, Tong Y, Song W.** Increased NFkappaB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012;15(1):77-90.
- **Chen S, Ge X, Chen Y, Lv N, Liu Z, Yuan W.** Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research. *Drug Des. Devel. Ther.* 2013 ; 7, 117–125.

- **Chen Z, Liu J, Fu Z, Ye C, Zhang R, Song Y, Zhang Y, Li H, Ying H, Liu H.** 24(S)-Saringosterol from edible marine seaweed *Sargassum fusiforme* is a novel selective LXR $\beta$  agonist. *J Agric Food Chem.* 2014 ; 2, 62(26):6130-7
- **Cherkaoui-Malki M, Meyer K, Cao WQ, Latruffe N, Yeldandi AV, Rao MS, Bradfield CA, and Reddy JK.** Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expression.* 2001 ; 9, 291-304.
- **Cherkaoui-Malki M, Meyer K, Cao WQ, Latruffe N, Yeldandi AV, Rao MS, Bradfield CA, Reddy JK.** Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expr.* 2001;9(6):291-304.
- **Cherki M, Berrougui H, Drissi A, Adlouni A, Khalil A.** Argan oil : which benefits on cardiovascular diseases ? *Pharmacol.* 2006 ; Res 54, 1-5.
- **Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A, Khalil A, Adlouni A.** Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status : Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovas.* 2005 ; 15, 352-360.
- **Chimi H, Rahmani M, Cillard P.** Etude de la fraction phénolique des huiles vierges d'argan du Maroc. *Actes Inst. Agron. Vét.* 1988; Pp 17–21.
- **Christen Y.** Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am Soc Nutrition Am J Clin Nutr.* 2000 ; vol. 71 no. 2 621s-629s.
- **Cimini A, Moreno S, D'Amelio M, Cristiano L, D'Angelo B, Falone S, Benedetti E, Carrara P, Fanelli F, Cecconi F, Amicarelli F, Cerù MP.** Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease : a role for peroxisomes. *J Alzheimers Dis.* 2009;18(4):935-52.
- **Cimini A, Moreno S, D'Amelio M, Cristiano L, D'Angelo B, Falone S, Benedetti E, Carrara P, Fanelli F, Cecconi F, Amicarelli F, Ceru M.P.** Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease : a role for peroxisomes. *J. Alzheimers Dis.* 2009 ; 18, 935–952.
- **Claiborne A.** Catalase activity. In : Greenwald, R. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* CRC Press Boca Raton FL. 1985 ; pp. 283/284.



- **Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW.** Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 1977a ; 116(2) : 207-225.
- **Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW.** Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol.* 1977b ; 116(2) : 227-247.
- **Collier A and Lemaire B.** Carotenoids of argan oil. *Cahier Nutritional Diet.* 1974 ; 9 : 300-303.
- **Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ.** Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res.* 1990 ; 27(4):595-611.
- **Connor JR, Pavlick G, Karli D, Menzies SL, Palmer C.** A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol.* 1995, 24;355(1):111-23.
- **Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ.** The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol.* 2006 ; 23(1) : 111-22.
- **Coyle JT and Puttfarcken P.** Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science.* 1993 ; 262 :689–695.
- **Crapper DR, Krishnan SS, Quittkat S.** Aluminum, neurofibrillary degeneration and Alzheimer's disease. *Brain.* 1976; 99: 67-80
- **Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K, Perry VH.** Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci.* 2005 ; 25 : 9275–84.
- **David DC, Hauptmann S, Scherping I, Schuessel K, Keil U, Rizzu P, Ravid R, Dröse S, Brandt U, Müller WE, Eckert A, Götz J.** Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J Biol Chem.* 2005 ; 24;280(25):23802-14.
- **De Duve C and Baudhuin P.** Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 1966 ;46(2) :323-57.
- **De Lustig ES, Serra JA, Kohan S, Canziani GA, Famulari AL, Dominguez RO.** Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells and serum in demented patients and in aging. *J Neurol Sci.* 1993 ;115(1) :18-25.

- **De Ponteves E, Bourbouze A, Narjisse H.** Occupation de l'espace, droit coutumier et législation forestière dans un territoire de l'Arganeraie septentrionale au Maroc. Les cahiers de la recherche développement. 1990 ; 28-43.
- **Dehpour AA, Ibrahimzadeh MA, Fazel SN, Seyed MN.** Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*. 2009 ; Vol. 60. pp. 405-412.
- **Del Rio D, Costa L, Lean M, Crozier A.** Polyphenols and health : What compounds are involved ? *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* 2010 ; 20,1-6.
- **Del Rio LA.** Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Arch Biochem Biophys*. 2011 ;1;506(1):1-11.
- **Delacourte A.** Biochemical and molecular characterization of neurofibrillary degeneration in frontotemporal dementias. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1999 ; 10 Suppl 1 :75-79.
- **Derouich E, Cherki M, Drissi A, Benouhoud M, Chater R, EL Messal M, Kettani A, Saile R, Chraib A, Adlouni A.** Hormones thyroïdiennes et bilan lipidique de deux populations du sud marocain consommatrices de l'huile d'argan et du sel non iodé. *Biologie & Santé*. 2004 ; vol. 4, n° 3.
- **Derouiche A, Cherki M, Drissi A, Bamou Y, El Messal M, Idrissi-Oudghiri A, Lecerf JM, Adlouni A.** Nutritional intervention study with argan oil in man : effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab*. 2005 ; 49, 196-201.7.
- **Desai MK, Mastrangelo MA, Ryan DA, Sudol KL, Narrow WC, Bowers WJ.** Early oligodendrocyte/myelin pathology in Alzheimer's disease mice constitutes a novel therapeutic target. *Am J Pathol*. 2010 ; 177 :1422-1435.
- **Desvergne B, Michalik L, Wahli, W.** Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev*. 2006 ; 86, 465-514.
- **Dewitt DA, Hurd JA, Fox N, Townsend BE, Griffioen KJ, Ghribi O, Savory, J.** Peri-nuclear clustering of mitochondria is triggered during aluminum maltolate induced apoptosis. *J Alzheimers Dis*. 2006 ; 9 :195–205.
- **Di Frisco S, de Ruggieri P, Ercoli A.** Isolation of cerebrosterol from human brain. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1953 ; 29 : 1351-2.
- **Diallo A.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat. Mali. 2005.

- **Dixon SJ and Stockwell BR.** The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol.* 2014 10(1):9-17.
- **Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd, Stockwell BR** Ferroptosis : an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012 25;149 (5):1060-72.
- **Djeridane A, Yous M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006 ;97 : 654-660.
- **Dobson CB, Day JP, King SJ, Itzhaki RF.** Location of aluminum and gallium in human neuroblastoma cells treated with metal-chelating agent complexes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998;152, 145–152.
- **Dore S, Bastianetto S, Kar S, Quirion R.** Protective and rescuing abilities of IGF-1 and some putative freeradical scavengers against beta-amyloid-induced toxicity in neurons. *Ann. NY Acad. Sci.* 1999 ; 890, 356 – 364.
- **Dosunmu R, Wu J, Basha Mr, Zawia NH.** Environmental And Dietary Risk Factors In Alzheimer's Disease. *Expert Rev Neurother.* 200 7 ; 7 : 887-900.
- **Dowling AL and Head E.** Antioxidants in the canine model of human aging. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(5):685-9.
- **Drago D, Cavaliere A, Mascetra N, Ciavardelli D, di Ilio C, Zatta P, Sensi SL.**Aluminum modulates effects of  $\beta$  amyloid1-42 on neuronal calcium homeostasis and mitochondria functioning and is altered in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Rejuvenation research.* 2008 ; 11(5) :861-71.
- **Drissi A, Bennani H, Giton F, Charrouf Z, Fiet J, Adlouni A.** Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer Invest.* 2006 ; 24(6) :588–92.
- **Drissi A, Girona J, Cherki M, Godas G, Derouiche A, El Messal M, Saile R, Kettani A, Sola R, Masana L, Adlouni A.** Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr.* 2004 ; 23, 1159-1166.
- **Dua R, Kumar V, Sunkaria A, Gill KD.** Altered glucose homeostasis in response to aluminium phosphide induced cellular oxygen deficit in rat. *Indian Journal of Experimental Biology.* 2010;722-730.

- **DuBoff B, Feany M, Gotz J.** Why size matters - balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease *Trends Neurosci.* 2013;36(6):325-35.
- **Dunstan CR, Hills E, Norman AW, Bishop JE, Mayer E, Wong SY, Johnson JR, George CR, Collett P and Kalowski S.** The pathogenesis of renal dystrophy : role of vitamin D, aluminium, parathyroid hormone, calcium and phosphorus. *Q J Med.* 1985 ; 55 : 127-144.
- **Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JA.** Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev.* 2000 ;13(1) :79-106.
- **Dyrks T, Dyrks E, Hartmann R, Masters C, Beyreuther K.** Amyloidogenicity of bA4 and bA4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem.* 1992 ; 267 :18210–18217.
- **Eckert A, Nisbet R, Grimm A, Gotz J.** March separate, strike together--role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's. *Biochim Biophys Acta.* 2014 ;1842(8):1258-66.
- **Ehmann WD, Markesbery WR, Alauddin M, Hossain TIM, Brubaker EH.** Brain trace elements in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology.* 1986 ;7 :197–206.
- **El Abbassi A, Khalid N, Zbakh H, Ahmad A.** Physicochemical characteristics, nutritional properties and health benefits of argan oil: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;54, 1401-1414.
- **El Kebbaj R, Andreoletti P, El Hajj HA, El Kharrassi Y, Vamecq J, Mandarde S, Saiha FE, Latruffe N, El Kebbaj MS, Lizard G, Nasser B, Cherkaoui-Malki M.** Argan oil prevents down-regulation induced by endotoxin on liver fatty acid oxidation and gluconeogenesis and on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ , (PGC-1 $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and estrogen related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ). *Biochimie Open.* 2015; Volume 1, Pages 51–59.
- **El Kharrassi Y, Samadi M, Lopez T, Nury T, El Kebbaj R, Andreoletti P, El Hajj HI, Vamecq J, Moustaid K, Latruffe N, El Kebbaj MS, Masson D, Lizard G, Nasser B, Cherkaoui-Malki M.** Biological activities of Schottenol and Spinasterol, two natural phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, on murine microglial BV2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 ; 446, 798-804.
- **El Monfalouti H, Guillaume D, Denhez C, Charrouf Z.** Therapeutic potential of argan oil- A review. *J Pharm Pharmacol.* 2010 ; 62, 1669-1675.

- **El Mousadik A, Petit RJ.** Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Mol Ecol.* 1996 ; 5, 547-555.
- **El Otmani A.** Contribution au développement de l'arganier. In : Journées d'étude sur l'arganier. Essaouira (Maroc). 1998 ; 23-24 juin 1988,6p.
- **El-Demerdash FM.** Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;18(1):113-21.
- **Emonard H, Marcq V, Mirand C, Hornebeck W.** Inhibition of gelatinase A by oleic acid. *Ann NY Acad Sci.* 1999 ; 878 : 647–649.
- **Erdal H, Berndtsson M, Castro J, Brunk U, Shoshan MC, Linder S.** Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 4;102(1):192-7.
- **Esparza JL, Gómez M, Rosa Nogués M, Paternain JL, Mallol J, Domingo JL.** Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats. *J Pineal Res.* 2005;39(2):129-36.
- **Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S.** A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging.* 23: 2002; 719–735.
- **Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992 ; Vol 13 : 341-390.
- **Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO.** Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. *JAMA.* 1989 ; 10;262(18):2551-6.
- **Evans PH, Peterhan E, Burge T, Klinowski J.** Aluminosilicate-induced free radical generation by murine brain glial cells in vitro : Potential significance in the aetiopathogenesis of Alzheimer's dementia. *Dementia.* 1992 ; 3 :1–6.
- **Exley C and Esiri MM.** Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford, Cornwall, UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006 ; 77 : 877-879.
- **Exley C.** Amyloid, aluminum and the aetiology of Alzheimer's disease [letter, comment]. *Med J Aust* 1996 ;164 : 252–253.
- **Exley C.** The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie.* 2016 – Elsevier.

- **Fabre P.** L'intérêt de l'huile d'argan enrichie en insaponifiable ainsi que les peptides extraits des tourteaux en cosmétologie. In : Bani Aameur F (Editeur) Coloque International sur les Ressources Végétales : l'arganier et les plantes des zones arides et semi-arides. Faculté des Sciences, Université de Ibnou Zohr, Agadir.1999 ;103-106.
- **Fahmi F, Tahrouch S, Hatimi A.** Geoclimatic influences on flavonoids contents of the leaves of the argan tree Influences géoclimatiques sur la composition en flavonoïdes des feuilles de l'arganier *Argania spinosa*. J. Mater. Environ. Sci. 2013 ; 4, (6),881-886.
- **Famer D, Meaney S, Mousavi M, Nordberg A, Björkhem I, Crisby M.** Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: cerebesterolstimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway. Biochem. Biochem Biophys Res Commun. 2007 ; 359, 46–50.
- **Farooqu AA and Horrocks LA.** Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. J Mol Neurosci. 2001 ; 16, 263-272.
- **Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Baliotti M, Mocchegiani E, Scancar J, Zambenedetti P, Zatta P.** The effect of chronic aluminum(III) administration on the nervous system of aged rats: clues to understand its suggested role in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2003;5(6):437-44.
- **Faust PL and Kovacs WJ.** Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. Biochimie. 2014 ; 98 :75-85.
- **Favier A.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 2003 ; Vol 5 : 108-115.
- **Fehrenbacher N, Jaattela M.** Lysosomes as targets for cancer therapy. Cancer Res. 2005; 65:2993-5.
- **Ferdinandusse S, Kostopoulos P, Denis S, Rusch H, Overmars H, Dillmann U, Reith W, Haas D, Wanders RJ, Duran M, Marziniak M.** Mutations in the gene encoding peroxisomal sterol carrier protein X (SCPx) cause leukencephalopathy with dystonia and motor neuropathy. Am J Hum Genet. 2006;78(6):1046-52.
- **Fernandez-Menendez MJ, Olaizola IR, Diaz-Lopez JB, Fernandez-Soto I, Roza M, Cannata JB.** A double risk of aluminium hydroxide : increased aluminium uptake and reduced iron absorption. Trace elem Med. 1991 ; 8 : 167-171.

- **Ferradous A, Bani-aameur F, Dupuis P.** Climat stationnel, phénologie et fructification de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). Actes Inst. Agron. Veto (Maroc). 1996 ; 17 (1) : 51-60.
- **Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Bicchiega V.** Effect of phytosterols on copper lipid peroxidation of human low-density lipoproteins. *Nutrition*. 2010;26(3):296-304.
- **Ferri P, Angelino D, Gennari L, Benedetti S, Ambrogini P, Del Grande P, Ninfali P.** Enhancement of flavonoid ability to cross the blood-brain barrier of rats by co-administration with  $\alpha$ -tocopherol. *Food Funct*. 2015; 6: 394-400.
- **Ferri P, Cecchini T, Ciaroni S, Ambrogini P, Cuppini R, Santi S, Benedetti S, Pagliarani S, Del Grande P, Papa S.** Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. *J Neurocytol*. 2003;32(9):1155-64.
- **Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G.** Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1991 ;129 :318–20.
- **Fiorentino A, D'Abrosca B, Pacifico S, Golino A, Mastellone C, Oriano P, Monaco P.** Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Flavone Glycosides from *Melilotus neapolitana*. *Molecules*. 2007 ; 12 : 263-270.
- **Flaten TP.** Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull*. 2001; 55:187–96.
- **Flohe L, Gunzler WA.** Assays of glutathione-peroxidase. *Methods in Enzymology*. 1984; 105, 114–121.
- **Fonseca AC, Resende R, Oliveira CR, Pereira CM.** Cholesterol and statins in Alzheimer's disease : Current controversies. *Exp Neurol*. 2010 ;223(2) :282-93.
- **Forman BM, Chen J, Evans RM.** Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 ; 94, 4312-4317.
- **Fosmire GJ, Focht SJ, McClearn GE.** Genetic influences on tissue deposition of aluminum in mice. *Biol Trace Elem Res*. 1993;37(2-3):115-21..
- **Fraga CG, Oteiza PI, Golub MS, Gershwin ME, Keen CL.** Effect of aluminum on brain lipid peroxidation. *Toxicol Lett*. 1990 ; 51 :213–219.
- **Fu HJ, Hu QS, Lin ZN, Ren TL, Song H, Cai CK, Dong SZ.** Aluminum-induced apoptosis in cultured cortical neurons and its effect on SAPK/JNK signal transduction pathway. *Brain Res*. 2003 ; 1 ; 980(1) :11-23.

- **Fuhrman B, Plat D, Herzog Y, Aviram M.** Consumption of a novel dietary formula of plant sterol esters of canola oil fatty acids, in a canola oil matrix containing 1,3-diacylglycerol, reduces oxidative stress in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Agric Food Chem.* 2007 ; 55 : 2028–33.
- **Fujiki Y, Matsuzono Y, Matsuzaki T, Fransen M.** Import of peroxisomal membrane proteins : the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. *Biochim Biophys Acta.* 2006 ;1763(12):1639-46.
- **Fyiad AA.** Aluminium Toxicity and Oxidative Damage Reduction by Melatonin in Rats. *Journal of Applied Sciences Research.* 2007; 3(10): 1210-1217.
- **Galea E, Launay N, Portero-Otin M, Ruiz M, Pamplona R, Aubourg P, Ferrer I, Pujol A.** Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: a paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822 (9): 1475-1488.
- **Gamba P, Guglielmotto M, Testa G, Monteleone D, Zerbinati C, Gargiulo S, Biasi F, Iuliano L, Giaccone G, Mauro A, Poli G, Tamagno E, Leonarduzzi G.** Up-regulation of amyloidogenesis in neuron-like human cells by both 24-and 27-hydroxycholesterol : protective effect of N-acetyl-cysteine. *Aging Cell.* 2014 ; 1–12.
- **Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Terry g, Stephanie H , Kelly JW, Karen K, Mike L, Paul L, Ivan L Sheila L, Eliezer M, Lisa M, Martin MZ, Lennart M, Lisa P, Elizabeth P, Mike P, Dale S, Peter S, Ben S, Ferdie S, Hua T, Jame V, Sam W, Ben W, Jun Z.** Alzheimer type neuropathology in transgenic mice overexpressing V77F b-amyloid precursor protein. *Nature* 1995 ; 373 ;525-7.
- **Garruto RM, Fukatsu R, Yanagihara R, Gajdusek DC, Hook G, Fiori CE.** Imaging of calcium and aluminum in neurofibrillary tangle-bearing neurons in parkinsonism-dementia of Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 ;81(6):1875-9.
- **Geschwind DH.** Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration : the chicken or the egg ? *Neuron.* 2003 ; 40, 457–460.
- **Geula C1, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA.** Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. See comment in PubMed Commons below *Nat Med.* 1998 ;4(7):827-31.



- **Ghandour S, Feutz AM, Jalabi W, Taleb O, Bessert D, Cypher M, Carlock L, Skoff RP.** Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signalling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *GLIA*. 2002 ; 40 : 300-311.
- **Gharby S, Harhar H, El Monfalouti H, Kartah B, Maata N, Guillaume D, Charrouf Z.** Chemical and oxidative properties of olive and argan oils sold on the Moroccan market. A comparative study. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012 ; 5, 31-38.
- **Gibson GE, Sheu KF, Blass JP, Baker A, Carlson KC, Harding B, Perrino P.** Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 1988 ; 45, 8, 836-40.
- **Ginsberg L, Rafique S, Xuereb JH, Rapoport SI, Gershfeld NL.** Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 1995 ; 698 :223–226.
- **Girzalsky W, Saffian D, Erdmann R.** Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta*. 2010 ; 1803(6) : 724-731.
- **Goate AM.** "Molecular genetics of Alzheimer's disease." *Geriatrics*. 1997 ; 52 Suppl 2 : S9-12
- **Goffinet A.** Anatomie clinique du système nerveux central. 1994.
- **Gómez - Caravaca AM, Gómez - Romero M, Arráez - Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A.** Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis*. 2006 ; 41 : 1220 - 34.
- **Gómez M, Sánchez DJ, Llobet JM, Corbella J, Domingo JL.** The effect of age on aluminium retention in rats. *Toxicology*. 1997;15;116(1-3):1-8.
- **Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275, 5535–5544.
- **Goodenowe DB, Cook LL, Liu J, Lu Y, Jayasinghe DA, Ahiahonu PW, Heath D, Yamazaki Y, Flax J, Krenitsky KF, Sparks DL, Lerner A, Friedland RP, Kudo T, Kamino K, Morihara T, Takeda M, Wood PL.** Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency : a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia. *J Lipid Res*. 2007 ; 48(11) :2485–2498.

- **Goodman L.** Alzheimer's disease : A clinico-pathologic analysis of twenty-three cases with a theory on pathogenesis. *J Nerv Ment Dis.* 1953 ;118(2) :97-130.
- **Gourier-Fréry C, Fréry N, Berr C, Cordier S, Garnier R, Isnard H, Ravault C, Renaudeau C.** Aluminium. Quels risques pour la santé ? Synthèse des études épidémiologiques. Volet épidémiologique de l'expertise collective INVS-Afssa-Afssaps. Institut de Veille Sanitaire. 2003 ; 270 p.
- **Gourier-Fréry C, Fréry N.** Aluminium. *EMC-Toxicologie Pathologie 1.* 2004 ; 79–95.
- **Griffioen KJ, Ghribi O, Fox N, Savory J, DeWitt DA.** Aluminum maltolate-induced toxicity in NT2 cells occurs through apoptosis and includes cytochrome c release. *Neurotoxicology.* 2004 ; 25 :859–67.
- **Grimm A, Mensah-Nyagan AG, Eckert A.** Alzheimer, mitochondria and gender. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2016 ; Pages 89–101.
- **Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ.** Lysosomes in cell death. See comment in PubMed Commons below. *Oncogene.* 2004; 12; 23(16): 2881-90.
- **Guillaume D and Charrouf Z.** Argan oil and other argan products ; use in dermocosmetology. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2011 ; 113, 403-408.
- **Guillemaud C, Faucounau V, Greffard S, Verny M.** Prise en charge thérapeutique de la démence, *EMC - Traité Médecine.* 201; vol. 8, no 3, p. 1-9.
- **Guimarães CP, Domingues P, Aubourg P, Fouquet F, Pujol A, Jimenez-Sanchez G, Sá-Miranda C, Azevedo JE.** Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 2004 ; 4;1689(3):235-43.
- **Guina T , Deiana M, Calfapietra S, Cabboi B, Maina M, Tuberoso CI, Leonarduzzi G, Gamba P, Gargiulo S, Testa G, Poli G, Biasi F.** The role of p38 MAPK in the induction of intestinal inflammation by dietary oxysterols : modulation by wine phenolics. *Food Funct.* 2015 ; 6(4) :1218-28.
- **Guo JT, Yu J, Grass D, de Beer FC, Kindy MS.** Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid a protein in a mouse model of amyloidosis. *J Neurosci.* 2002 ;22 :5900–9.
- **Gupta V.B, Anitha S, Hegde M.L, Zecca L, Garruto R.M, Ravid R, Shankar, R. Stein S.K, Shanmugavelu P, Jagannatha Rao K.S.** Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cell Mol. Life Sci.* 62 (2005) 143–158.

- **Gutierrez CA and Gehlen MH.** Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with  $Al^{3+}$ . *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2002 ; 1;58(1):83-9.
- **Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP.** Le stress oxydant. *Rev Med Liege.* 2007 ; 62(10) :628-638.
- **Halliwell B, Gutteridge JMC.** The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 1985;8(2):89-193.
- **Han JH, Kim YJ, Han ES, Lee CS.** Prevention of 7-ketocholesterol-induced mitochondrial damage and cell death by calmodulin inhibition. *Brain Res.* 2007 ; 1137, 11-9.
- **Han X, Holtzman DM, McKeel DWJr.** Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models : molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem.* 2001 ;77 :1168–1180.
- **Han X.** Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and the altered lipids at the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010 ; 1801 : 774–783
- **Hanisch UK and Kettenmann H.** Microglia : active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 2007 ; 10, 1387–1394.
- **Hardy JA and Higgins GA.** Alzheimer's disease, the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992 ; 286, 184–185.
- **Haustgen T, Sinzelle J. Emil Kraepelin (1856–1926) – 2.** Le Traité. *Annales Médico-psychologiques, revue psychiatrique.* 2010 ; 168(9) : 716–719.
- **Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* 2007 ; Volume 105, Issue 3, Pages 1126–1134.
- **He C, Zhu H, Zhang W, Okon I, Wang Q, Li H, Le YZ, Xie Z.** 7-Ketocholesterol induces autophagy in vascular smooth muscle cells through Nox4 and Atg4B. *Am J Pathol.* 2013; 183(2):626-37.
- **Hebbel RP.** Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clinic Med.* 1986 ; 107, 401-404.
- **Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, Lovell M, Markesbery WR, Butterfield DA.** Brain

regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 1995 ; 65 :2146–2156.

- **Heverin M, Bogdanovic N, Lutjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, Diczfalusy U, Winblad B, Björkhem I.** Changes In The Levels Of Cerebral And Extracerebral Sterols In The Brain Of Patients With Alzheimer's Disease. *J Lipid Res.* 2004 ; 45 : 186-193.
- **Higgins GC, Beart PM, Shin YS, Chen MJ, Cheung NS, Nagley P.** Oxidative stress : emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20 Suppl 2:S453-73.
- **Hilali M, Charrouf Z, Souhli A, Hachimi L, Guillaume D.** Influence of Origin and Extraction Method on Argan Oil Physico-Chemical Characteristics and Composition. *J. Agric. Food Chem.* 2005 ; 53 (6), 2081–2087.
- **Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlack SL, Harris PLR, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA.** Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 2001 ; 21, 3017-3023.
- **Ho GJ, Dreger R, Hakimian E, Masliah E.** Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005 ; 4 :247–56.
- **Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K.** Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med.* 1998 ; 4(1) : 97-100.
- **Hritcu L, Bagci E, Aydin E, Mihasan M.** Antiamnesic and Antioxidants Effects of *Ferulago angulata* Essential Oil Against Scopolamine-Induced Memory Impairment in Laboratory Rats. *Neurochem Res.* 2015;40(9):1799-809.
- **Hruban Z, Rechcigl M.** Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry, and physiology. *Int Rev Cytol.* 1969:Suppl 1:1-296.
- **Huang B, Ke H, He J, Ban X, Zeng H, Wang Y.** Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* 2011 Jan;49(1):185-90.
- **Huang B, Ke H, He J, Ban X, Zeng H, Wang Y.** Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49(1):185-90.

- **Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI.** Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's Aβ peptides. *J Biol Inorg Chem.* 2004;9(8):954-60.
- **Igarashi M, Ma K, Gao F, Kim HW, Rapoport SI, Rao JS.** Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex, *J. Alzheimers Dis.* 2011 ; 24 : 507e517.
- **Ikeda I and Sugano M.** Inhibition on cholesterol absorption by plants sterols for mess intervention. *Curr. Opin. Lipidol.* 1998; 9, 527-531.
- **Inceni A, Serra G, Atzeri A, Melis MP, Serreli G, Bandino G, Sedda P, Campus M, Tuberoso CI, Deiana M.** Extra virgin olive oil phenolic extracts counteract the pro-oxidant effect of dietary oxidized lipids in human intestinal cells. *Food Chem Toxicol.* 90, 171-180. *Food Chem Toxicol.* 2016 ; 90 :171-80.
- **Inestrosa NC, Carvajal FJ, Zolezzi JM, Tapia-Rojas C, Serrano F, Karmelic D, Toledo EM, Toro A, Toro J, Santos MJ.** Peroxisome proliferators reduce spatial memory impairment, synaptic failure, and neurodegeneration in brains of a double transgenic mice model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2013 ;33(4) : 941-959.
- **Islinger M, Grille S, Fahimi HD, Schrader M.** The peroxisome : an update on mysteries. *Histochem Cell Biol.* 2012 ; 137(5) : 547-574.
- **Iuliano L.** Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and physics of lipids.* 2011 ; 164(6), 457–468.
- **Jaccard P.** L'arganier Sapotaceae oléagineusedu Maroc. *Pharma.Acta Helvetiae.* 1926 ; 203-209.
- **Jakobs S.** High resolution imaging of live mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2006, 1763(5-6) : 561-575.
- **Jangra A, Kasbe P, Pandey SN, Dwivedi S, Gurjar SS, Kwatra M, Mishra M, Venu AK, Sulakhiya K, Gogoi R, Sarma N, Bezbaruah BK, Lahkar M.** Hesperidin and Silibinin Ameliorate Aluminum-Induced Neurotoxicity: Modulation of Antioxidants and Inflammatory Cytokines Level in Mice Hippocampus. *Biol Trace Elem Res.* 2015;168(2):462-71
- **Jansson ET.** Aluminum exposure and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2001; 3:541–9.

- **Jantaratnotai N, Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG.** Amyloid beta peptide-induced corpus callosum damage and glial activation in vivo. *Neuroreport.* 2003 ; 6, 14(11):1429-33.
- **Jeitner TM, Voloshyna I, Reiss AB.** Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders. *Curr Med Chem.* 2011 ; 18 : 1515-25.
- **Jellinger Ka.** Traumatic Brain Injury As A Risk Factor For Alzheimer's Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.,* 2004, 75, 511-512.
- **Jeong GS, Li B, Lee DS, Kim KH, Lee IK, Lee KR, Kim YC.** Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via the induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines. *Int Immunopharmacol.* 2010;10 (12):1587-94.
- **Jessell TM and Kandel ER.** Synaptic transmission : a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell.* 1993 ;72 Suppl, 1–30.
- **Johnson AB and Blum NR.** Nucleoside phosphatase activities associated with the tangles and plaques of alzheimer's disease : a histochemical study of natural and experimental neurofibrillary tangles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1970 ; 29, 3, 463-78.
- **Johnson GV and Stoothoff WH.** Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci.* 2004 ; 117(Pt 24) : 5721-5729.
- **Johnson VJ, Kim SH, Sharma RP.** Aluminum-maltolate induces apoptosis and necrosis in neuro-2a cells : potential role for p53 signaling. *Toxicol Sci.* 2005 ; 83 :329–39.
- **Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M.** Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and cellular biochemistry.* 2010 ; 345 : 91-104.
- **Jorgenson, S.E, Jensen A.** Metal Ions Biol Syst, 18 : 61 (1984). In. *Aluminum in chemistry, bioogy and medicine. A Series of Advances* vol. 1,eds. M.
- **Julka D and Gill KD.** Effect of aluminum on regional brain antioxidant defense status in Wistar rats. *Res Exp Med.* 1996; 196:187–94.
- **Julka D, R.K Vasishtha, Gill KD.** Distribution of aluminum in different brain regions and body organs of rat, *Biol. Trace Elem. Res.* 1996 ; 52(2) : 181-92.
- **Jyoti A, Sethi P, Sharma D.** Bacopa monniera prevents from aluminium neurotoxicity in the cerebral cortex of rat brain. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111:56–62.
- **Kaizer RR, Corrêa MC, Spanevello RM, Morsch VM, Mazzanti CM, Gonçalves JF, Schetinger MR.** Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation

after long-term exposure to low levels of aluminium on different mouse brain regions. *J Inorg Biochem.* 2005 ;99(9) :1865-70.

- **Kaizer RR, Corrêa MC, Spanevello RM, Morsch VM, Mazzanti CM, Gonçalves JF, Schetinger MR.** Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminium on different mouse brain regions. *J Inorg Biochem.* 2005 ;99(9) :1865-70.
- **Karagözler A, Erdag CS, Çalmaz Emek Y.** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chem.* 2008 ; 111 : 400–7.
- **Kashiwayama Y, Seki M, Yasui A, Murasaki Y, Morita M, Yamashita Y, Sakaguchi M, Tanaka Y, Imanaka T.** 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Exp Cell Res.* 2009 ; 315(2) :190-205.
- **Kaur A, Joshi K, Minz RW, Gill KD.** Neurofilament phosphorylation and disruption: a possible mechanism of chronic aluminium toxicity in Wistar rats. *Toxicology.* 2006; 219:1–10.
- **Kaur P and Sodhi RK.** Memory recuperative potential of rifampicin in aluminum chloride-induced dementia: Role of pregnane X receptors. *Neuroscience.* 2015;12;288:24-36.
- **Kaur P and Sodhi RK.** Memory recuperative potential of rifampicin in aluminum chloride-induced dementia: Role of pregnane X receptors. *R.K. Neuroscience.* 2015 ;12 ;288 :24-36.
- **Kawahara M and Kato-Negishi M.** Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease : the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *Int J Alzheimers Dis.* 2011 ; 8;2011:276393.
- **Kawahara M.** Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 2005; 171–182.
- **Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Müller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Müller WE, Eckert A.** Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem.* 2004 ; 26;279(48):50310-20 .
- **Kemp S and Wanders R.** Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 2010 ; 20 : 831–7.

- **Kemp S and Wanders RJ.** X-linked adrenoleukodystrophy : Very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment. *Mol Genet Metab.* 2007;90(3):268-76.
- **Kemp S, Theodoulou FL, Wanders RJ.** Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance. *Br J Pharmacol.* 2011; 164:1753–1766.
- **Khallouki F, Younos C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen RW.** Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev.* 2003 ; 12, 67-75.
- **Khatib S and Vaya J.** Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014 ; 446, 709–713.
- **Kidd M.** Alzheimer's Disease--an Electron Microscopical Study. *Brain,* 1964 ; 87 : 307-320.
- **Kidd M.** Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 1963 ; 197 : 192-193.
- **Kiernan J and Raj Rajakumar R.** Barr's The Human Nervous System: An Anatomical Viewpoint. 1957 ; 978-1-4511-7327-7. Livre.
- **Kim HJ, Fan X, Gabbi C, Yakimchuk K, Parini P, Warner M, Gustafsson JA.** Liver X receptor beta (LXRbeta): a link between beta-sitosterol and amyotrophic lateral sclerosis -Parkinson's dementia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105 2094–2099.
- **Kinsky N.** Antioxydants function of carotenoides, *Free Rad. Biol. Med.* 1989; 7, p. 617.
- **Kohno Y, Egawa Y, Itoh S, Nagaoka S, Takahashi M, Mukai K.** Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochim Biophys Acta.* 1995 ; 28 ; 1256(1) :52-6.
- **Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F.** Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 ; 98(10): 5815-5820.
- **Kolsch H, Heun R, Kerksiek A, Bergmann KV, Maier W, Lutjohann D.** Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. *Neurosci Lett.* 2004 ; 368, 303–308.



- **Kolsch H, Lütjohann D, Tulke A, Björkhem I, Rao ML.** The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1999 ; 818(1): 171-175.
- **Konishi Y, Yagyu K, Kinebuchi H, Saito N, Yamaguchi T, Ohtsuki Y.** Chronic effect of aluminium ingestion on Bone in calcium –deficient Rats. *Pharmacol Toxicol.* 1996 ; 78 : 429-434.
- **Kou J, Kovacs GG, Höftberger R, Kulik W, Brodde A, Forss-Petter S, Hönigschnabl S, Gleiss A, Brügger B, Wanders R, Just W, Budka H, Jungwirth S, Fischer P, Berger J.** Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2011 ; 122(3) : 271-283.
- **Kovacsova M, Barta A, Parohova J, Vrankova S, Pechanova O.** Neuroprotective Mechanisms of Natural Polyphenolic Compounds. *Activitas Nervosa Superior Rediviva.* 2010; Volume 52 No.3.
- **Kövári E, Hof PR, Bouras C.** The Geneva brain collection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011 :1225 Suppl 1, E131–E146.
- **Krishnaswamy S, Verdile G, Groth D, Kanyenda L, Martins RN.** The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(5-6):282-301.7.
- **Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G.** Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 ; 16(1) : 3-11.
- **Kuczynski B and Reo NV.** Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochem Res.* 2006 ; 31 :639–656.
- **Kudo T, Imaizumi K, Tanimukai H, Katayama T, Sato N, Nakamura Y, Tanaka T, Kashiwagi Y, Jinno Y, Tohyama M, Takeda M.** Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease ? *Neurobiol Aging.* 2000 ; 21(2) : 215-224.
- **Kumar A, Prakash A, Dogra S.** Neuroprotective effect of carvedilol against aluminium induced toxicity : possible behavioral and biochemical alterations in rats. *Pharmacol Rep.* 2011; 63(4):915-23.

- **Kumar V and Dip Gill K.** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: A review. *Neurotoxicology*. 2014 ; 41 :154-66.
- **Kumar V, Bal A, Gill KD.** Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. *Toxicology*. 2009 ; 29; 264(3):137-44.
- **Kumar V, Bal A, Gill KD.** Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Res*. 2008; 232:94–103.
- **L'Écuyer L.** Intoxication. Québec. Institut de vie parfaite. 2002 ; 6 P.
- **Lai JC, Lim L, Davison AN.** Effects of Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Al<sup>3+</sup> on rat brain synaptosomal uptake of noradrenaline and serotonin. *J Inorg Biochem*. 1982 ; 17, 215-225.
- **Lakshmi BV, Sudhakar M, Prakash KS.** Protective effect of selenium against aluminum chloride-induced Alzheimer's disease: behavioral and biochemical alterations in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2015;165(1):67-74..
- **Lal B, Gupta A, Murthy RC, Ali MM, Chandra SV.** Aluminium ingestion alters behavior and some neurochemicals in rats. *Ind J Exp Biol* 1993; 31:30–5.
- **Landsberg J, McDonald B, Grime G, Watt F.** Microanalysis of senile plaques using nuclear microscopy. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1993 ; 6, 97-104.
- **Landsberg JP, McDonald B, Watt F.** Absence of aluminium in neuritic plaque cores in Alzheimer's disease, *Nature*. 1992 ; 5 ;360(6399) :65-8.
- **Latruffe N.** Les peroxysomes et la prolifération cellulaire ou la prise en considération d'un organe méconnu. *Médecine sciences*. 1992 ; 8 : 239-48.
- **Lau FC, Shukitt-Hale B, Joseph JA.** The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiol Aging*. 2005;26: 128–132.
- **Lauwerys RR and Hoet P.** Industrial chemical exposure : Guidelines for biological monitoring. London : Lewis publishers. 2001 ; 638 p.
- **Law M.** Plant sterol and stanol margarines and health. *BMJ*. 2000 ; 25;320(7238):861-4.
- **Lazarov O and Demars MP.** All in the Family : How the APPs Regulate Neurogenesis. *Front Neurosci*. 2012 ; 4 ; 6 :81.
- **Lazarow PB and Fujiki Y.** Biogenesis of peroxisomes. *Ann Rev Cel/ Biol*. 1985 ; 1 : 489-530.

- **Lecerf JM.** Phytostérols et phytostanols. Quel bénéfice cardiovasculaire ? Cholé-Doc. 2007 ; n°101 Mai-Juin. CERIN.
- **Lee da H, Nam YJ, Lee CS.** Apocynin attenuates cholesterol oxidation product-induced programmed cell death by suppressing NF- $\kappa$ B-mediated cell death process in differentiated PC12 cells. *Neurochem Int.* 2015;89, 28-39.
- **Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food Chem.* 2003 ; 51 : 7292–5.
- **Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD.** Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature.* 2012. 26 ;487(7408) :443-8.
- **Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B.** Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *The Journal of clinical investigation.* 2006;116, 571-580.
- **Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G.** Comparison of the cytotoxic, prooxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol.* 2005 ; 21, 97–114.
- **Lemire J, Mailloux R, Puiseux-Dao S, Appanna VD.** Aluminum-induced defective mitochondrial metabolism perturbs cytoskeletal dynamics in human astrocytoma cells. *J Neurosci Res.* 2009 ; 87 :1474–83.
- **Leonard SS, Harris GK, Shi XL.** Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37:1921–42.
- **Leoni V, Caccia C.** Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids.* 2011;164(6):515-524.
- **Leoni V, Lütjohann D, Masterman T.** Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *J Lipid Res.* 2005; 46, 191-195.
- **Leuner K, Muller WE, Reichert AS.** From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation : novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 2012;46(1):186-93.

- **Lévesque L, Mizzen CA, McLachlan DR, Fraser PE.** Ligand specific effects on aluminum incorporation and toxicity in neurons and astrocytes. *Brain Res.* 2000 ; 22; 877(2):191-202.
- **Levin ED.** Learning about cognition risk with the radial-arm maze in the developmental neurotoxicology battery. *Neurotoxicol Teratol.* 2015;52(Pt A):88-92.
- **Levine B and Klionsky DJ.** Development by self-digestion : molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 2004; 6:463-77.
- **Lhuillier A, Fabre N, Moyano F, Martins N, Claparols C, Fourasté I, Moulis C.** Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007; 10; 1160 (1-2):13-20.
- **Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry.* 2007 ; 102 : 771-776.
- **Lichtenthaler SF.** Alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein: proteolysis regulated by signaling pathways and protein trafficking. *Curr Alzheimer Res.* 2012 ;9(2) :165-77. Review.
- **Lii CK, Ko YJ, Chiang MT, Sung WC, Chen HW.** Effect of dietary vitamin E on antioxidant status and antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer.* 1998 ;32(2) : 95-100.
- **Lim SH, Park E, You B, Jung Y, Park AR, Park SG, Lee JR.** Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin10. *PLoS One.* 2013 ; 22;8(11):e81218.
- **Lin MT and Beal MF.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 ; 443, 787–795.
- **Ling Y, Morgan K, Kalsheker N.** Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing : relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 ; 35(11):1505-35.
- **Liu B and Hong JS.** Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases : mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304, 1–7.
- **Liu B, Moloney A, Meehan S, Morris K, Thomas SE, Serpell LC, Hider R, Marciniak SJ, Lomas DA, Crowther DC.** Iron promotes the toxicity of amyloid beta peptide by impeding its ordered aggregation. *J Biol Chem.* 2011 ; 11;286 (6):4248-56.

- **Liu C and Götz J.** How it all started : tau and protein phosphatase 2A. *J Alzheimers Dis.* 2013 ; 37(3) :483-94.
- **Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX.** Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 2005 ;22 : 1942–1950.
- **Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP.** Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry.* 1995 ; 21 : 275-283.
- **Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquiere L, Deckert V, Gueldry S, Lagrost L, Gambert P.** Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology.* 1999 ; 19, 1190-1200.
- **Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquiere L, Deckert V, Gueldry S, Lagrost L, Gambert P.** Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 1999 ;19, 1190-1200.
- **Lizard G, Rouaud O, Demarquoy J, Cherkaoui-Malki M, Iuliano L.** Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. *J Alzheimers Dis.* 2012 ; 29(2) : 241-254.
- **Lizard G.** Impact of phytosterols on mitochondrial functions. *Br J Nutr.* 2011;106, 461,2.
- **López LC, Cabrera-Vique C, Venegas C, García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Acuña-Castroviejo D, Escames G.** Argan oil-contained antioxidants for human mitochondria. *Nat Prod Commun.* 2013;8(1):47-50.
- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
- **Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW.** cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ; 96 : 7238-43.

- **Lund EG, Xie C, Kotti T, Turley SD, Dietschy JM, Russell DW.** Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem.* 2003 ; 278(25) : 22980-22988.
- **Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén A, Diczfalusy U, Björkhem I.** Cholesterol homeostasis in human brain : evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 ; 3;93(18):9799-804.
- **Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem, I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R.** Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* 2000; 41, 195–198.
- **Lyan B, Azais-Braesco V, Cardinault N, Tyssandier V, Borel P, Alexandre-Gouabau M.C, Grolier P.** Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001, 751, 297–303.
- **M'hirit O, Benzyane M, Benchekroun F, El Yousfi SM, Bendaanoun M.** L'Arganier : une espèce fruitière-forestière à usages multiples. Sprimont, Belgique, Mardaga ; 1998, 150 p.
- **Malvitte L, Montange T, Vejux A, Joffre C, Bron A, Creuzot-Garcher C, Lizard G.** Activation of a caspase-3-independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization in cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to 7beta-hydroxycholesterol. *Curr Eye Res.* 2008 ; 33(9) :769-81.
- **Marfil R, Cabrera-Vique C, Giménez R, Bouzas PR, Martínez O, Sánchez JA.** Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil : influence of the extraction method. *J Agric Food Chem.* 2008 ;27 ;56(16) :7279-84
- **Marfil R, Giménez O, Martínez PR, Bouzas JA, Rufián-Henares M, Mesías C, Cabrera-Vique.** Determination of polyphenols, tocopherols, and antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *Eur J Lipid Sci Technol.* 2011 ; 113 : 886-893.
- **Mario Alía, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L.** Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr.* 2006;45: 19–28.

- **Markesbery WR and Ehmann WD.** Brain trace elements in Alzheimer disease. In : Terry, RD, Katzman R ; Bick KL, eds. Alzheimer disease. New York : Raven Press ; 1993 :353–367.
- **Markesbery WR, Ehmann WD, Hossain TIM, Allauddin M, Goodin DT.** Instrumental neuron activation analysis of brain aluminum in Alzheimer's disease and aging. *Ann Neurol.* 1981; 10:511–6.
- **Markesbery WR.** Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997 ; 23 : 134–147.
- **Martin F, Corrigan FM, Donard OF, Kelly J, Besson JA, Horrobin DF.** Organotin compounds in trimethyltin-treated rats and in human brain in Alzheimer's disease. *Hum Exp Toxicol.* 1997 ; 16;(9) :512–515.
- **Martin L, Latypova X, Terro F.** Post-translational modifications of tau protein : implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2011 ; 58(4) :458-471.
- **Martin MG, Perga S, Trovò L, Rasola A, Holm P, Rantamäki T, Harkany T, Castrén E, Chiara F, Dotti CG.** Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 2008 ; 19, 2101–2112.
- **Martin RB, Savory J, Brown S, Bertholf RL, Wills MR.** Transferrin binding of Al<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup>. *Clin Chem.* 1987;33(3):405-7.
- **Martinet W, De Bie M, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM.** 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin Figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 ; 24 : 2296-2301.
- **Massey JB and Pownall HJ.** Structures of biologically active oxysterols determine their differential effects on phospholipid membranes. *Biochemistry* 2006; 45:10747-58.
- **Massey JB and Pownall HJ.** The polar nature of 7-ketocholesterol determines its location within membrane domains and the kinetics of membrane microsolvubilization by apolipoprotein A-I. *Biochemistry.* 2005 ; 44 : 10423-10433.
- **Massey JB.** Membrane and protein interactions of oxysterols. *Curr Opin Lipidol.* 2000; 17:296-301.
- **Mast N, White MA, Bjorkhem I, Johnson EF, Stout CD, Pikuleva IA.** Crystal structures of substrate-bound and substrate-free cytochrome P450 46A1, the principal cholesterol hydroxylase in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 ;105,9546–9551.

- **Mastrogiacomo F, Bergeron C, Kish SJ.** Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1993 ; 61, 6, 2007-14.
- **Matthäus B, Guillaume D, Gharby S, Haddad A, Harhar H, Charrouf Z.** Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chemistry.* 2010 ; 120, 426-432.
- **Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR.** Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup>/concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1995 ;65 :1740–1751.
- **Mattson MP.** Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 ;1144:97-112.
- **Matyash V and Kettenmann H.** Heterogeneity in astrocytes morphology and physiology. *Brain Res. Rev.* 2009 ; 63,2-10.
- **Mayatepek E and Tiepelmann B.** Defective degradation of leukotrienes in peroxisomal- deficient human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 ; 227(1) : 131-134.
- **Mayatepek E, Lehmann WD, Fauler J, Tsikas D, Frolich JC, Schutgens RB, Wanders RJ, Keppler D.** Impaired Degradation of Leukotrienes in Patients with Peroxisome Deficiency Disorders. *J. Clin. Invest.* 1993 ; 91 : 881-888.
- **Mayor GH, Keiser JA, Makdani D and Ku PK.** Aluminum absorption and distribution : Effect of parathyroid hormone. *Science.* 1977 ; 197 : 1187-1189.
- **McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, Skipper L, Murphy M, Beard J, Das P, Jansen K, Delucia M, Lin WL, Dolios G, Wang R, Eckman CB, Dickson DW, Hutton M, Hardy J, Golde T.** Abeta<sub>42</sub> is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron.* 2005 ; 47(2) : 191-199.
- **McLachlan DRC, Dalton AJ, Kruck TP, Bell MY, Smith WL, Kalow W, Andrews DF.** Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *Lancet.* 1991 ; 337, 1304-1308.
- **McLachlan DRC, Quittkat S, Krishnan SS, Dalton AJ, De Boni U.** Intranuclear aluminum content in Alzheimer's disease, dialysis encephalopathy, and experimental aluminum encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 1980 ; 50, 19-24.
- **Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF.** Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1994 ; 36, 747–751.



- **Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF.** Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol.* 1993 ; 34, 609–616.
- **Micic DV, Petronijević ND, Vucetić SS.** Superoxide dismutase activity in the mongolian gerbil brain after acute poisoning with aluminum. *J Alzheimers Dis.* 2003;5(1):49-56.
- **Mielke MM, Vemuri P, Rocca WA.** Clinical epidemiology of Alzheimer’s disease : assessing sex and gender differences. *Clin Epidemiol.* 2014 ; 8;6:37-48.
- **Miettinen TA and Gylling H.** Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases. *Ann Med.* 2004;36(2):126-34.
- **Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétrier F, Néel D, Gambert P, Lizard G.** Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Comparison with various proapoptotic chemicals. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64 :527–541.
- **Milane H.** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg. 2004.
- **Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chem.* 2004 ; 85 : 231–7.
- **Miners JS, van Helmond Z, Kehoe PG, Love S.** Changes with age in the activities of beta-secretase and the Abeta-degrading enzymes neprilysin, insulin-degrading enzyme and angiotensin-converting enzyme. *Brain Pathol.* 2010 ; 20(4):794-802.
- **Misirli A, Küden A, Demir G, Gülcan R.** *Cahiers Options Méditerranéennes.* 2000 ; 56, 71-87.
- **Miu AC, Andreescu CE, Vasiu R, Olteanu AI.** A behavioral and histological study of the effects of long-term exposure of adult rats to aluminum. *Int J Neurosci.* 2003; 113:1197–211.
- **Moilanen T and Nikkari T.** The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clin. Chim. Acta.* 1981 ;114 : 111 e 116.

- **Mokhtar SH, Bakhuraysah MM, Cram DS, Petratos S.** The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease : communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2013 ; 910502.
- **Mokhtari M.** Le greffage de l'arganier. Un challenge pour la multiplication clonale. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA (Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture, Rabat).* 2002 ; 95, 3-4.
- **Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jurgens G, Nègre-Salvayre A, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Ne'el D, Gambert P, Lizard G.** Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 303 (3):814-24.
- **Moore PB, Day JP, Taylor GA, Ferrier IN, Fifield LK, Edwardson JA.** Absorption of aluminium-26 in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry. *Dementia and geriatric cognitive disorders.* 2000 ; 11(2) : 66-9.
- **Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Fariás GA, Maccioni RB.** Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front. Cell. Neurosci.* 2014 ; 8, 112.
- **Morris CM, Court JA, Moshtaghi AA, Skillen AD, Candy JM Perry, RH, Edwardson.** Transferrin and transferrin receptors in the normal brain in alzheimer's disease. *Biochem. Soc Trans.* 1987 ; 15 :891-892.
- **Morris R.** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984 ; 11 : 47-60.
- **Morrison WR and Smith LM.** Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron-uoride methanol. *J. Lipid Res.* 1964 ; 5, 600 - 608.
- **Moser HW.** Adrenoleukodystrophy : phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain.* 1997 ; 120 :1485-1508.
- **Moukal A.** L'arganier, *Argania spinosa* L. (Skeels), usage thérapeutique, cosmétique et alimentaire. *Phytothérapie.* 2004 ; 2, 135–141.
- **Mounts TL, Abidi SL, Rennick KA.** Effect of genetic modification on the content and composition of bioactive constituents in soybean oil. *American Oil Chemists' Society.* 1996 ; 73, 581–586.

- **Msanda FAEA and Peltier JP.** Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. Cahiers Agricultures. 2005 ; 14.
- **Muanda NF, Koné D, Dicko A, Soulimani R, Younos C.** Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:674320.
- **Mukhopadhyay S, Fellows K, Browne RW, Khare P, Krishnan Radhakrishnan S, Hagemeyer J, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Ramanathan M.** Interdependence of oxysterols with cholesterol profiles in multiple sclerosis. Mult Scler. 2016.
- **Nagasawa K, Akagi J, Koma M, Kakuda T, Nagai K, Shimohama S, Fujimoto S.** Transport and toxic mechanism for aluminum citrate in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Life Sci. 2006. 30 ; 79(1) :89-97.
- **Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang H.** Astrocytes accumulate A $\beta$ 42, and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. Brain Res. 2003 9;971(2):197-209.
- **Naidu NR, Bhat S, Dsouza U.** Effect of long term administration of aluminium chloride on oxidative stress and acetylcholinesterase activity in rat brains. Int J Pharm Bio Sci. 2013; 3:616–22
- **Nasri N, Elfalleh W, Tlili N, Hannachi H, Triki S, Khaldi A.** Minor lipid components of some Acacia species : potential dietary health benefits of the unexploited seeds. Lipids Health Dis. 2012 ; 11;11:49.
- **Nave KA.** Myelination and the trophic support of long axons. Nat Rev Neurosci. 2010;11(4):275-83.
- **Nayak P.** Aluminium : impacts and disease. Environ Res ; 2002 ;89 :101–115.
- **Nehru B, Anand P.** Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. J Trace Elem Med Biol. 2005; 19:203–8.
- **Neill D, Hughes D, Edwardson JA, Rima BK, Allsop D.** Human IMR-32 neuroblastoma cells as a model cell line in Alzheimer's disease research. J Neurosci Res. 1994 ; 39(4) : 482-493.
- **Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain H.M, Nebert DW.** Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. Pharmacogenetics. 2004; 14, 1-18.

- **Nestor MW, Paull D, Jacob S, Sproul AA, Alsaffar A, Campos BA, Noggle SA.** Differentiation of serum-free embryoid bodies from human induced pluripotent stem cells into networks. *Stem Cell Res.* 2013;10(3):454-63.
- **Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA.** Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 1986 ; 387(3) : 271-280.
- **Nielsen HM, Ek D, Avdic U, Orbjorn C, Hansson O, Netherlands Brain B, Veerhuis R, Rozemuller AJ, Brun A, Minthon L, Wennstrom M.** NG2 cells, a new trail for Alzheimer's disease mechanisms ? *Acta Neuropathol Commun.* 2013 ; 9;1:7.
- **Nisbet RM, Polanco JC, Ittner LM, Götz J.** Tau aggregation and its interplay with amyloid- $\beta$ . *Acta Neuropathol. (Berl.).* 2015 ; 129, 207–220.
- **Niu PY, Niu Q, Zhang QL, Wang LP, He SE, Wu TC.** Aluminium impairs rat neural cell mitochondria in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2005 ; 18 :683–9.
- **Noguchi N, Urano, Y, Takabe, W, Saito Y.** New aspects of 24(S)-hydroxycholesterol in modulating neuronal cell death. *Free Radic Biol Med.* 2015; 87, 366-372.
- **Nordgren M and Fransen M.** Peroxisomal metabolism and oxidative stress, *Biochimie.* 2014 ; 98,56–62.
- **Norlin M and Chiang JY.** Transcriptional regulation of human oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase by sterol response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 ; 316 : 158-164.
- **Nouaim R, Chaussod R, El Aboudi A, Schnabel C, Peltier JP.** L'arganier : Essai de synthèse des connaissances sur cet arbre. *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Groupe d'étude de l'arbre (Paris).* 1991 ; 373-388.
- **Novikoff AB and Goldfischer S.** Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J Histochem Cytochem.* 1969;17(10):675-80.
- **Numakawa Y, Numakawa T, Matsumoto T, Yagasaki Y, Kumamaru E, Kunugi H, Taguchi T, Niki E.** Vitamin E protected cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem.* 2006;97(4):1191-202.
- **Nury T, Samadi M, Zarrouk A, Riedinger JM, Lizard G.** Improved synthesis and in vitro evaluation of the cytotoxic profile of oxysterols oxidized at C4 (4 $\alpha$ - and 4 $\beta$ -

hydroxycholesterol) and C7 (7-ketocholesterol, 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol) on cells of the central nervous system. *Eur J Med Chem.* 2013 ; 70, 558-67

- **Nury T, Zarrouk A, Mackrill JJ, Samadi M, Durand P, Riedinger JM, Doria M, Vejux A, Limagne E, Delmas D, Prost M, Moreau T, Hammami M, Delage-Mourroux R, O'Brien NM, Lizard G.** Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol : Protective effects of  $\alpha$ -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA ; C22 :6 n-3). *Steroids.* 2015 ; 9, 194-203.
- **Nury T, Zarrouk A, Vejux A, Doria M, Riedinger JM, Delage-Mourroux R, Lizard G.** Induction of oxiaoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: impairment by  $\alpha$ -tocopherol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 ; 11 ; 446(3) :714-9.
- **Nyholm NE.** Evidence of involvement of aluminum in causation of defective formation of eggshells and of impaired breeding in wild passerine birds, *Environmental Research.* *Environ Res.* 1981;26(2):363-71.
- **O'Callaghan YC, Woods JA, O'Brien NM.** Characteristics of 7-hydroxycholesterolinduced cell death in a human monocytic blood cell line, U937, and a human hepatoma cell line, HepG2. *Toxicol In Vitro.* 2002 ; 16 : 245-251.
- **Ogasawara Y, Sakamoto T, Ishii K, Takahashi H, Tanabe S.** Effects of the administration routes and chemical forms of aluminum on aluminum accumulation in rat brain, *Biol. Trace. Elem. Res.* 2002; 86(3): 269-78.
- **Ohnishi M, Matuo T, Tsuno T, Hosoda A, Nomura E, Taniguchi H, Sasaki H, Morishita H.** Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ- induced diabetic mice and KK-Ay mice. *Biofactors.* 2004 ; 21 : 315–319.
- **Ohsawa I, Takamura C, Kohsaka S.** The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 ; 236, 59-65.
- **Ohyashiki T, Satoh E, Okada M, Takadera T, Sahara M.** Nerve growth factor protects against aluminum-mediated cell death. *Toxicology.* 2002; 176:195–207.
- **Okabe A, Urano Y, Itoh S, Suda N, Kotani R, Nishimura Y, Saito Y, Noguchi N.** Adaptive responses induced by 24S-hydroxycholesterol through liver Xreceptor

pathway reduce 7-ketocholesterol-caused neuronal cell death. *RedoxBiol.* 2013 ; 2, 28–35.

- **Olton DS, Samuelson RJ.** Remembrance of places past : spatial memory in rats. *J. Exp. Psychol.* 1976 ; 2, 97-116.
- **Oshima E1, Ishihara T, Yokota O, Nakashima-Yasuda H, Nagao S, Ikeda C, Naohara J, Terada S, Uchitomi Y.** Tau Aggregation, Apoptosis and Neurological Dysfunction Caused by Chronic Oral Administration of Aluminum in a Mouse Model of Tauopathies. *Brain Pathology.* 2013 ; 23(6) :633-44.
- **Osland RE.** Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition.* 2002;22, 533-549.
- **Otaegui-Arrazola A, Menendez-Carreno M, Ansorena D, Astiasaran I.** Oxysterols : A world to explore. *Food Chem Toxicol.* 2010 ; 48 : 3289-3303.
- **Oyaizu M.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition.* 1986 ; 44, 307
- **Ozasa H, Ayaori M, Iizuka M, Terao Y, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Takiguchi S, Nakaya K, Hisada T, Uehara Y, Ogura M, Sasaki M, Komatsu T, Horii S, Mochizuki S, Yoshimura M, Ikewaki K.** Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPARgamma/LXRalpha pathway: findings from in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis.* 2011 ; 219(1):141-50.
- **Packer L.** Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr.* 1991 ;53(4 Suppl) :1050S-1055S.
- **Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Rao ML, Maier W, Björkhem I, Von Bergmann K, Heun R.** Plasma 24S-hydroxy-cholesterol, a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential statemarker for Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 2000 ; 11, 1959–1962.
- **Park SW and Addis PB.** Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. *Anal Biochem.* 1985 ; 15;149(1):275-83.
- **Pauly G, Henry F, Danoux L, Charrouf Z.** Cosmetic and/or dermatopharmaceutical preparations containing leaf extracts of the plant *Argania spinosa*. US patent. 2006 ; 7871766 B2.
- **Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidallo**

- MA, Lizard G, Ogier-Denis E.** NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2004 ; 24(24) : 10703-17.
- **Perl DP, Gadjusek DC, Garruto RM, Yanagihara RT, Gibbs CJ.** Intraneuronal aluminum accumulation in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson-dementia of Guam. *Science.* 1982; 217:1053-1055.
  - **Perl DP, Good PF, Bussière T, Morrison JH, Erwin JM, Hof PR.** Practical approaches to stereology in the setting of aging- and disease-related brain banks. *J Chem Neuroanat.* 2000;20(1):7-19.
  - **Perry CC and Keeling-Tucker T.** Aspects of the bioinorganic chemistry of silicon in conjunction with the biometals calcium, iron and aluminium. *J Inorg Biochem.* 1998; 69:181–91.
  - **Perry VH and Teeling J.** Microglia and macrophages of the central nervous system : the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.* 2013 ;35 :601–12.
  - **Perez G, Garbossa G, Nesse A.** Disturbance of Cellular Iron Uptake and Utilisation by Aluminium. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2002; 87:21-27.
  - **Perez MB, Calderon NL, Croci CA.** Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). *Food Chem.* 2007;104: 585-592.
  - **Petit TL, Biederman GB, Jonas P, LeBoutillier JC.** Neurobehavioral development following aluminum administration in infant rabbits. *Exp. Neurol.* 1985; 88:640-651.
  - **Petit-Paitel A.** GSK-3beta : a central kinase for neurodegenerative diseases ? *Med Sci (Paris).* 2010 ;26 : 516–521.
  - **Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ.** Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2001 ;26 :771–782
  - **Philips T and Rothstein JD.** Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 2014;262 Pt B:111-20.
  - **Pieri C, Moroni F, Marra M.** Food restriction increases the protection of erythrocytes against the hemolysis induced by peroxy radicals. *Mechanisms of Ageing and Development.* 1996 ; 87 :15–23.
  - **Plat J, Nichols JA, Mensink RP.** Plant sterols and stanols : effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res.* 2005 ;46 2468–2476.

- **Platt B, Fiddler G, Riedel G, Henderson Z.** Aluminium toxicity in the rat brain: histochemical and immunocytochemical evidence. *Brain Res Bull.* 2001; 55:257– 67.
- **Platta HW and Erdmann R.** The peroxisomal protein import machinery. *FEBS letters.* 2007 ;581 :2811-2819.
- **Polle A, Krings B, Rennenberg H.** Superoxide dismutase activity in needles of norwegian spruce trees (*Picea abies L.*) *Plant Physiol.* 1989 ;90 :1310-1315.
- **Pradier L and Duyckaerts C.** Chapitre : Modèle animaux de la maladie d'alzheimer 2015.
- **Prakash A, Dhaliwal GK, Kumar P, Majeed AB.** Brain biometals and Alzheimer's disease - boon or bane ? *Int J Neurosci.* 2016;25:1-10.
- **Prakash NT and Rao KS.** Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol Cell Biochem.* 1995; 146:107–13.
- **Prasanthi JR, Huls A, Thomasson S, Thompson A, Schommer E, Ghribi O.** Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Neurodegener.* 2009 ;6 ;4 :1.
- **Priest ND, Talbot RJ, Newton D, Day JP, King SJ, Fifield LK.** Uptake by man of aluminium in a public water supply. *Hum Exp Toxicol.* 1998 ;17 :296–301.
- **Priest ND.** Satellite symposium on Alzheimer's disease and dietary aluminium. *Proc Nutr Soc.* 1993 ; 52,231-240.
- **Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J.** Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 2006 ; 5,26(27):7212-21.
- **Prunet C, Lemaire-Ewing S, Ménétrier F, Néel D, Lizard G.** Activation of caspase-3-dependent and independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005; 19:311–326.
- **Puglielli L, Ellis BC, Ingano LA, Kovacs DM.** Role of acyl-coenzyme a : cholesterol acyltransferase activity in the processing of the amyloid precursor protein. *J Mol Neurosci.* 2004 ;24(1) : 93-6.
- **Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM.** Alzheimer's disease : the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 2003 ; 6(4) : 345- 51.



- **Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK.** PPARalpha : energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal.* 2010 ;16 ;8 : e002.
- **Pieri C, Moroni F, Marra M.** Food restriction increases the protection of erythrocytes against the hemolysis induced by peroxy radicals. *Mech Ageing Dev.* 1996; 24;87(1):15-23.
- **Rabe A, Moon HL, Shek J, Wisniewski HM.** Learning deficit in immature rabbits with aluminium induced neurofibrillary changes. *Exp Neurol.* 1982; 76:441–6.
- **Ragot K, Delmas D, Athias A, Nury T, Baarine M, Lizard G.** Alpha-Tocopherol impairs 7-ketocholesterol-induced caspase-3-dependent apoptosis involving GSK-3 activation and Mcl-1 degradation on 158N murine oligodendrocytes. *Chemistry and physics of lipids.* 2011 ;164, 469-478.
- **Roberts E.** Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol Aging.* 1986;7(6):561-7.
- **Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, Karttunen M.** Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim Biophys Acta.* 2009 ;1788(1) :97-121.
- **Rogers J, Lue LF, Walker DG, Yan SD, Stern D, Strohmeyer R, Kovelowski CJ.** Elucidating molecular mechanisms of Alzheimer's disease in microglial cultures. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2002 ; 25–44.
- **Roher AE, Weiss N, Kokjohn TA, Kuo YM, Kalback W, Anthony J, Watson D, Luehrs DC, Sue L, Walker D, Emmerling M, Goux W, Beach T.** Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 2002 ;41 :11080-11090.
- **Röhrdanz E, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R.** The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. *J Nutr.* 2002;132(3):370-5.
- **Rojas LB, Quideau S, Pardon P, Charrouf Z.** Colorimetric evaluation of phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary and cosmetic argan oil and press cake. *J Agric Food Chem.* 2005 ;16 ; 53(23) :9122-7.
- **Rolfe DF and Brown GC.** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997 ; 77, 731-758.
- **Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C, Dartigues J-F.** Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline : findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *American journal of epidemiology.* 2009 ; 169 :489-96.

- **Rossi R, Pastorelli G, Corino C.** Application of KRL test to assess total antioxidant activity in pigs : sensitivity to dietary antioxidants. *Res Vet Sci.* 2013 ; 94(2):372-7.
- **Rossner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR.** Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J. Neurochem.* 2005 ; 92, 226–234.
- **Rothe G and Valet G.** Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol.* 1990 ; 47(5) : 440-448.
- **Royer MC, Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Monier S, Pais de Barros JP, Athias A, Néel D, Lagrost L.** 7-ketocholesterol incorporation into sphingolipid/cholesterol-enriched (lipid raft) domains is impaired by vitamin E: a specific role for alpha-tocopherol with consequences on cell death. *Biol Chem.* 2009 ;5 ;284(23) :15826-34.
- **Rui D and Yongjian Y.** Aluminum chloride induced oxidative damage on cells derived from hippocampus and cortex of ICR mice. *Brain Res.* 2010; 1324:96–102.
- **Russell DW, Halford RW, Ramirez DM, Shah R, Kotti T.** Cholesterol 24-hydroxylase : an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu Rev Biochem.* 2009 ; 78 : 1017-40.
- **Russo GL.** Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids : from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol.* 2009 ; 77 : 937–946.
- **Sahin G, Varol I, Temizer A.** Determination of aluminum levels in the kidney, liver and brain of mice treated with aluminum hydroxide, *Biol. Trace. Elem. Res.* 1994;41: 129-135.
- **Samane S, Noel J, Charrouf Z, Amarouch H, Haddad PS.** Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006 ; 3, 317-327.
- **Samudralwar DL, DiPrete CC, Ni BF, Ehmann WD, Markesbery WR.** Elemental imbalances in the olfactory pathway in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1995 ;130 :139– 145.
- **Sanchez-Iglesias S, Soto-Otero R, Iglesias-Gonzalez J, Barciela-Alonso MC, Bermejo- Barrera P, Mendez-Alvarez E.** Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration. *J Trace Elem Med Biol.* 2007; 21:31–4.

- **Sánchez-Iglesias S, Méndez-Alvarez E, Iglesias-González J, Muñoz-Patiño A, Sánchez-Sellero I, Labandeira-García JL, Soto-Otero R.** Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2009 ;109(3) :879-88.
- **Sanders RJ, Ofman R, Dacremont G, Wanders RJA & Kemp S.** Characterization of the human omegaoxidation pathway for omega-hydroxy-very-long-chain fatty acids. *FASEB J.* 2008 ; 22 : 2064–2071.
- **Santos F, Chan JC, Yang MS, Savory J, Wills MR.** Aluminum deposition in the central nervous system, preferential accumulation in the hippocampus in weanling rats. *Med Biol.* 1987 ;65(1) :53-5.
- **Santos MJ, Quintanilla RA, Toro A, Grandy R, Dinamarca MC, Godoy JA, Inestrosa NC.** Peroxisomal proliferation protects from beta-amyloid neurodegeneration. *J Biol Chem.* 2005 ; 280, 41057-41068.
- Sarasa M and Pesini P. Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2009 ;6(2):171-8.
- **Sarin S, Gupta V, Gill KD.** Alterations in lipid composition and neuronal injury in primates following chronic aluminium exposure. *Biol Trace Elem Res.* 1997 ; 59 : 133-143.32.
- **Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, Willson TM, Klockgether T, Van Leuven F, Heneka MT.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-g agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of  $\beta$ -secretase. *J. Neurosci.* 2003 ; 23, 9796–9804.
- **Sastre M, Klockgether T, Heneka MT.** Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease : molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci.* 2006;24(2-3):167-76.
- **Savage LM, Buzzetti RA, Ramirez DR.** The effects of hippocampal lesions on learning, memory, and reward expectancies. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 82:109–19.
- **Savory J, Herman MM, Erasmus RT, Boyd JC, Wills MR.** Partial reversal of aluminium induced neurofibrillary degeneration by desferrioxamine in adult male rabbits. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994; 20:31–7.
- **Savory J, Huang Y, Herman MM, Reyes MR, Wills MR.** Tau immunoreactivity associated with aluminum maltolate-induced neurofibrillary degeneration in rabbits. *Brain Res.* 1995; 669:325–9.

- **Scarmeas N and Stern Y.** Cognitive Reserve : Implications For Diagnosis And Prevention of alzheimer's Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2004 ; 4 : 374-380.
- **Schaeffer EL, Novaes BA, da Silva ER, Skaf HD, Mendes-Neto AG.** Strategies to promote differentiation of newborn neurons into mature functional cells in Alzheimer brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009 1;33(7):1087-102.
- **Schaffer S, Eckert GP, Schmitt-Schillig S, Muller WF.** Plant foods and brain aging: a critical appraisal. *Forum Nutr.* 2006; 59: 86–115.
- **Schenk D, Hagen M, Seubert P.** Current Progress In Beta-Amyloid Immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.,* 2004, 16(5) : 599-606.
- **Schilling T and Eder C.** Amyloid-bêta-induced reactive oxygen species production and priming are differentially regulated by ion channels in microglia. *J Cell Physiol.* 2011 ; 226 :3295–302.
- **Schmitt K, Grimm A, Kazmierczak A, Strosznajder JB, Götz J, Eckert A.** Insights into mitochondrial dysfunction : aging, amyloid-beta, and tau-A deleterious trio *Antioxid Redox Signal.* 2012 ; 16 : 1456-1466.
- **Schmuth M, Moosbrugger-Martinz V, Blunder S, Dubrac S.** Role of PPAR, LXR, and PXR in epidermal homeostasis and inflammation. *Biochimica et biophysica acta.* 2014; 1841, 463-473.
- **Schrader M and Fahimi HD.** The peroxisome : still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol.* 2008 ; 129(4) : 421-440.
- **Schubert D and Chevion M.** The role of iron in beta amyloid toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 ; 13, 216(2):702-7.
- **Schulz KL, Eckert A, Rhein V, Mai S, Haase W, Reichert AS, Jendrach M, Müller WE, Leuner K A.** New link to mitochondrial impairment in tauopathies. *Mol Neurobiol.* 2012 ;46(1) :205-16.
- **Scott N.** L'Aluminium et la santé. ARAP, Agriculture and Agri- Food, Canada, Ottawa. 2003 ; 4p.
- **Selkoe DJ.** Alzheimer's disease : genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001 ; 81(2) : 741-766.
- **Selvaraju TR, Khaza'ai H, Vidyadaran S, Abd Mutalib MS, Vasudevan R.** The neuroprotective effects of tocotrienol rich fraction and alpha tocopherol against glutamate injury in astrocytes. *Bosn J Basic Med Sci.* 2014;16;14(4):195-204.

- **Sen CK, Khanna S, Roy S.** Tocotrienol The Natural Vitamin E to Defend the Nervous System ? *Ann N Y Acad Sci.* 2004 ; 1031:127-42.
- **Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT.** Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 ;1(1): a006189.
- **Sethi P, Jyoti A, Singh R, Hussain E, Sharma D.** Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *NeuroToxicology.* 2008;29;1069–1079.
- **Sgarbossa A, Giacomazza D, di Carlo M.** Ferulic Acid : A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients.* 2015;15,7(7):5764-82.
- **Shafaati M, Marutle A, Pettersson H, Lövgren-Sandblom A, Olin M, Pikuleva I, Winblad B, Nordberg A, Björkhem I.** Marked Accumulation Of 27-Hydroxycholesterol In The Brains Of Alzheimer's Patients With The Swedish App 670/671 Mutation. *J Lipid Res.* 2011 ; 52 :1004-1010.
- **Sharma DR, Wani WY, Sunkaria A, Kandimalla RJ, Verma D, Cameotra SS.** Quercetin protects against chronic aluminum-induced oxidative stress and ensuing biochemical, cholinergic, and neurobehavioral impairments in rats. *Neurotoxicol Res.* 2013; 23:336–57.
- **Shi C, Liu J, Wu F, Zhu X, Yew DT, Xu J.**  $\beta$ -sitosterol inhibits high cholesterol-induced platelet  $\beta$ -amyloid release. *J Bioenerg Biomembr.* 2011 ; 43(6) : 691-7
- **Shi R, Zhang Y, Shi Y, Shi S, Jiang L.** Inhibition of peroxisomal beta-oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and A $\beta$  generation in the rat brain. *Neurosci Lett.* 2012 ; 528 : 6–10.
- **Shore D and Wyatt RJ.** Aluminum and Alzheimer's disease. *J Nerv Ment Dis.* 1983 ; 171, 553-558.
- **Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F.** Energetic basis of brain activity : implications for neuroimaging *Trends in neurosciences.* 2004 ; 27 : 489-495
- **Siems WG, Hapner SJ, van Kuijk FJGM.** 4-hydroxynonenal inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Free Radic Biol Med.* 1996 ; 20 :215–223.
- **Sies H.** Polyphenols and health : update and perspectives. *Arch Biochem Biophys.* 2010 ; 501, 2-5.

- **Simpson JE, Ince PG, Lace G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, Savva G, Brayne C, Wharton SB.** MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging*. 2010;31(4):578-90.
- **Singla N and Dhawan DK.** Zinc modulates aluminium-induced oxidative stress and cellular injury in rat brain. *Metallomics*. 2014 ;6 : 1941–50.
- **Singleton VL and Rossi JAJr.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965 ; 16, 144–153.
- **Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR.** Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 ;88,10540–10543.
- **Solomon A, Leoni V, Kivipelto M, Besga A, Oksengård AR, Julin P, Svensson L, Wahlund LO, Andreassen N, Winblad B, Soininen H, Björkhem I.** Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2009 ; 462(1): 89-93.
- **Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM, Diaz-Arrastia R, Ogris E, Dayal S, Lentz SR, Arning E, Bottiglieri T.** Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation. *J Neurosci*. 2007 ; 14, 27(11):2751-9.
- **Sparks DL, Martin TA, Gross DR, Hunsaker JC 3rd.** Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease : a review. *Microsc Res Tech*. 2000 ; 50(4) :287-290.
- **Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR.** Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol*. 1994 ; 126(1) : 88-94.
- **Spencer AJ, Wood, JA, Saunders, HC, Freeman MS, Lote CJ.** Aluminium deposition in liver and kidney following intravenous administration of aluminium chloride or citrate in conscious rats. *Hum Exp Toxicol*. 1995 ; 14(10) : 787-94.
- **Spijker S.** Dissection of Rodent Brain Regions. *Neuroproteomics*. Volume 57 of the series *Neuromethods* pp 13-26.

- **Stevnsen T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC, Bohr VA.** Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exper Gerontol.* 2002 ;37 :1189–1196.
- **Stock D, Leslie AG et Walker JE.** Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science.* 1999 ; 286, 1700-1705.
- **Stocker R.** The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24:219–23.
- **Strauss S, Bauer J, Ganter U, Jonas U, Berger M, Volk B.** Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Lab Invest.* 1992 ; 66 :223–30.
- **Strong MJ, Garruto RM, Joshi JG, Mundy WR, Shafer TJ.** Can the mechanisms of aluminium neurotoxicity be integrated into a unified scheme? *J Toxicol Environ Health.* 1996; 48: 599–613.
- **Stuchlik A.** Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis : an update. *Front. Behav. Neurosci.* 2014 ; 8, 106.
- **Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B.** Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 ; 25;94(24):13287-92.
- **Suárez-Fernández MB, Soldado AB, Sanz-Medel A, Vega JA, Novelli A, Fernández-Sánchez MT.** Aluminum-induced degeneration of astrocytes occurs via apoptosis and result in neuronal death. *Brain Res.* 1999 ; 24 ; 835(2) :125-36.
- **Subramani S, Koller A, Snyder WB.** Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:399-418.
- **Sumathi T, Shobana CS, Mahalakshmi VR, Sureka RC, Subathra M, Vishali A, Krishnamoorthi.** Oxidative stress in brains of male rats intoxicated with aluminium and neuro-modulating effect of *Celastrus paniculatus* alcoholic seed extract. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013; 6:80–90.
- **Summanen J, Yrjönen T, Christiansen L, Mervaala E, Vaskonen T, Lassila M, Ahotupa M, Yliruusi J, Karppanen H, Hiltunen R.** Effects of microcrystalline plant sterol suspension and a powdered plant sterol supplement on hypercholesterolemia in genetically obese Zucker rats. *J Pharm Pharmacol.* 2003 ; 55 :1673–9.

- **Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M.** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 2007 ;102 : 938-953.
- **Sutherland JE and Greger JL.** Effect of the size of an oral dose of aluminium on the relative importance of biliary v. urinary aluminium excretion in conscious rats, *Food. Chem. Toxicol.* 1998;36(6): 505-12.
- **Swain C and Chainy GBN.** Effects of aluminum sulphate and citric acid ingestion on lipid peroxidation and on activities of superoxide dismutase and catalase in cerebral hemisphere and liver of developing young chicks. *Molecular and Cellular Biochemistry. Mol Cell Biochem.* 1998 ;187(1-2) :163-72.
- **Swerdlow RH.** Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging ? *Neurobiol. Aging.* 2007 ; 28, 1465–1480.
- **Tahari F A, Lablack M, Hamadouche N A, Tahari A, Aoues A.** Protective effect of Haloxylon salicornicum on hepatic and renal functions of Wistar rats exposed to aluminium. *African Journal of Biotechnology.* 2016Vol 15, No 9.
- **Takao T, Flint N, Lee L, Ying X, Merrill J, Chandross KJ.** 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *Journal of Neurochemistry.* 2004 ; 89 :660-673.
- **Tanaka AR, Tanabe K, Morita M, Kurisu M, Kasiwayama Y, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Imanaka T, Ueda K.** ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1). *J Biol Chem.* 2002 ; 18;277(42):40142-7.
- **Tang BL.** Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease : from APP and BACE1 to glutamate receptors. *Cell Adhes. Migr.* 2009 ; 3, 118–128.
- **Tang R, Liu H, Wang T, Huang K.** Mechanisms of selenium inhibition of cell apoptosis induced by oxysterols in rat vascular smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 441:16–24.
- **Tang S, MacColl R, Parsons PJ.** Spectroscopic study of the interaction of luminum ions with human transferrin. *J Inorg Biochem.* 1995 ;15;60(3):175-85.
- **Alali FQ, Tawaha K, El-Elimat T, Syouf M, El-Fayad M, Abulaila K, Nielsen SJ, Wheaton WD, Falkinham JO 3rd, Oberlies NH.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Nat Prod Res.* 2007 Oct;21(12):1121-31.



- **Teraoka H, Morii F, Kobayashi J.** The concentrations of 24 elements in foodstuffs and the estimate of their daily intake. *J Jpn Soc Food Nutr.* 1981 ; 34 : 221-239.
- **Terlecky SR, Koepke JI, Walton PA.** Peroxisomes and aging. *Biochim Biophys Acta.* 2006 ;1763,1749-1754.
- **Thal DR.** The role of astrocytes in amyloid  $\beta$ -protein toxicity and clearance. *Exp Neurol. Exp Neurol.* 2012;236(1):1-5.
- **Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, Bimonte-Nelson H, Sambamurti K, Kindy MS, Bhat NR.** High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem.* 2008 ; 106, 475–485.
- **Thompson CM, Markesbery WR, Ehmann WD, Mao YX, Vance DE.** Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology.* 1988 ;9 :1–8.
- **Thompson PM and Vinters HV.** Pathologic lesions in neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012 ;107:1-40.
- **Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, Marroni NP, Henriques JAP, Picada JN.** Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology.* 2007 ; 45 : 1140- 1146.
- **Titorenko VI and Terlecky SR.** Peroxisome metabolism and cellular aging. *Traffic.* 2011 ; 12, 252-259.
- **Tower DB and Young OM.** The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem.* 1973;20(2):269-78.
- **Traber MG.** Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:347-62.
- **Tripathi S1, Mahdi AA, Nawab A, Chander R, Hasan M, Siddiqui MS, Mahdi F, Mitra K, Bajpai VK.** Influence of age on aluminum induced lipid peroxidation and neurolipofuscin in frontal cortex of rat brain: a behavioral, biochemical and ultrastructural study. *Brain Res.* 2009 ;9 ;1253 :107-16.
- **Tsubouchi R, Htay HH, Murakami K, Haneda M, Yoshino M.** Aluminum-induced apoptosis in PC12D cells. *Biometals.* 2001; 14:181–5.
- **Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G.** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules.* 2007 ;12 :484-496.

- **Uchida K, Mizuno H, Hirota K, Takeda K, Takeuchi N, Ishikawa Y.** Effect of spinasterol and sitosterol on plasma and liver cholesterol levels and biliary and fecal sterol and bile acid excretion in mice. *Jpn J Pharmacol.* 1983 ;33(1) :103-12.
- **Ulatowski LM and Manor D.** Vitamin E and neurodegeneration. See comment in PubMed Commons below *Neurobiol Dis.* 2015;84:78-83.
- **Van Dam D and De Deyn PP.** Animal models in the drugs discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Brit J Pharmacol.* 2011 ; 164. 1285-1300.
- **Van Ginkel MF, van der Voet GB, D'Haese PC, De Broe ME, de Wolff FA.** Effect of citric acid and maltol on the accumulation of aluminum in rat brain and bone. *J Lab Clin Med.* 1993 ;121(3) :453-60.
- **Van Landeghem GF , D'Haese PC , Lamberts LV , De Broe ME .** Competition of iron and aluminum for transferrin : the molecular basis for aluminum deposition in iron-overloaded dialysis patients ? *Exp Nephrol.* 1997;5(3):239-45.
- **Van Oostdam JC, Zwanenburg H, Harrison JR.** Canadian perspectives on aluminium. *Environ Geochem Health.* 1990 ;12 :71–74.
- **Vance JE, Hayashi H, Karten B.** Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 ; 16(2) : 193-212.
- **Vaya J and Schipper HM.** Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem.* 2007 ; 102(6): 1727-1737.
- **Vejux A, Guyot S, Montange T, Riedinger JM, Kahn E, Lizard G.** Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *J Nutr Biochem.* 2009 ; 20, 45-61.
- **Vejux A and Lizard G.** Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30, 153–170.
- **Vejux A, Malvitte L, Lizard G.** Side effects of oxysterols : cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz J Med Biol Res.* 2008 ; 41(7) :545-556.
- **Vejux A, Samadi M, Lizard G.** Contribution of cholesterol and oxysterols in the physiopathology of cataract : implication for the development of pharmacological treatments. *J Ophthalmol.* 2011 ;2011 :471947.

- **Vejux A, Guyot S, Montange T, Riedinger JM, Kahn E, Lizard G.** Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *J Nutr Biochem.* 2009 ;20, 45-61.
- **Vejux A and Lizard G.** Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30,153–170.
- **Velasco ME, Smith MA, Siedlak SL, Nunomura A, Perry G.** Striation is the characteristic neuritic abnormality in Alzheimer disease. *Brain Res.* 1998 ; 813, 329–333.
- **Venegas C, Cabrera-Vique C, Garcia-Corzo L, Escames G, Acuna-Castroviejo D, Lopez LC.** Determination of coenzyme Q10, coenzyme Q9, and melatonin contents in virgin argan oils : comparison with other edible vegetable oils. *J Agric Food Chem.* 2011 ; 59, 12102-12108.
- **Venkateswaran V, Fleshner NE, Klotz LH.** Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. *J Urol.* 2002 ;168 :1578-1582.
- **Verkhatsky and Kirchoff F.** Glutamate-mediated neuronal–glial transmission. *J Anat.* 2007 ;210(6) :651–660.
- **Verstraeten SV, Golub MS, Keen CL, Oteiza PI.** Myelin is a preferential target of aluminum-mediated oxidative damage. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 344:289– 94.
- **Vivacons M and Moreno JJ.** Beta-sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biology & Medicine.* 2005 ; 39, 91–97.
- **Von Holtz RL, Fink CS, Awad AB.** Beta-Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate Dricancer cells. *Nutr Cancer.* 1998 ; 32 : 8–12.
- **Vucetic-Arsic S, Radonjic NV, Jovanovic M, Selakovic V, Nikolic T, Velimirovic M, Stojkovic T, Milovanovic A, Milovanovic J, Petronijevic ND.** Oxidative stress precedes mitochondrial dysfunction in gerbil brain after aluminum ingestion. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;36(3):1242-52.
- **Walker VR, Sutton RA, Meirav O, Sossi V, Johnson R, Klein J, Fink D, Middleton R.** Tissue disposition of aluminum in rats measured by accelerator mass spectrometry. *Clin Invest Med.* 1994 ;17(5) :420-5.

- **Walton JR and Wang MX.** APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem.* 2009a ;103, 1548-1554.
- **Walton JR.** Aluminum disruption of calcium homeostasis and signal transduction resembles change that occurs in aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2012; 29:255–73.
- **Walton JR.** Brain lesions comprised of aluminum rich cells that lack microtubules may be associated with the cognitive deficit of Alzheimer's disease. *Neurotoxicology.* 2009b ; 30, 1059-1069.
- **Walton JR.** Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminum equivalents. *Neurotoxicology.* 2009c ; 30, 182-193.
- **Wanders RJ and Waterham HR.** Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem.* 2006 ; 75 : 295-332.
- **Wang B, Xing W, Zhao Y, Deng X.** Effects of chronic aluminum exposure on memory through multiple signal transduction pathways. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;29(3):308-13.
- **Wang DM, Li SQ, Wu WL, Zhu XY, Wang Y, Yuan HY.** Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2014;39(8):1533-43.
- **Wang J, Bi W, Cheng A, Freire D, Vempati P, Zhao W, Gong B, Janle EM, Chen TY, Ferruzzi MG, Schmeidler J, Ho L, Pasinetti GM.** Targeting multiple pathogenic mechanisms with polyphenols for the treatment of Alzheimer's disease-experimental approach and therapeutic implications. *Front Aging Neurosci.* 2014;14;6:42.
- **Wang S, DeGros VL, Clinton SK.** Tomato and soy polyphenols reduce insulin-like growth factor-I-stimulated rat prostate cancer cell proliferation and apoptotic resistance in vitro via inhibition of intracellular signaling pathways involving tyrosine kinase. *J Nutr.* 2003 ;133 :2367-2376.
- **Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X.** Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol.* 2008;173(2):470-82.
- **Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X.** Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2009;15;29(28):9090-103.

- **Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y, Casadesus G, Zhu X.** Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 ;9;105(49):19318-23.
- **Ward RJ, Zhang Y, Crichton RR.** Aluminium toxicity and iron homeostasis. *J Inorg Biochem.* 2001; 87:9–14.
- **Ward RJ, Zhang Y, Crichton RR.** Aluminium toxicity and iron homeostasis. *J Inorg Biochem* 2001; 87:9–14.
- **Washington DC.** Toxicological risks of selected flame-retardant chemicals. National academy press. 2000 ; 99-131.
- **Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW.** "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975 ; 72(5) : 1858-1862.
- **Weydert CJ and Cullen JJ.** Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010; 5(1):51-66.
- **Wilhelm M, Jaeger DE, Schull-Cablitz H, Hafner D, Idel H.** Hepatic clearance and retention of aluminium : studies in the isolated perfused rat liver. *Toxicol Lett.* 1996 ; 89 : 257-263.
- **Wills MR and Savory J.** Water content of aluminum, dialysis dementia, and osteomalacia. *Environ Health Perspect.* 1985 ;63, 141-147.
- **Wisniewski H, Terry RD, Hirano A.** Neurofibrillary pathology. *J Neuropathol. Exp Neurol.* 1970 : 29, 163-176.
- **Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 2007 ;105 : 940-949.
- **Wong CC, Li HB, Cheng KW, Chen F.** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 2006; 97:705-711.
- **Wood PL, Mankidy R, Ritchie S, Heath D, Wood JA, Flax J, Goodenowe DB.** Circulating plasmalogen levels and Alzheimer Disease Assessment Scale- Cognitive scores in Alzheimer patients. *J Psychiatry Neurosci.* 2010 ;35(1) :59-62
- **World Health Organisation (WHO) :** Environmental levels and human exposure. Aluminium : Environmental Health Criteria (EHC). Geneva, World Health Organization. 1997 ; No. 194 : 57-79.

- **Wu Q and Huang K.** Protective effect of ebselen on cytotoxicity induced by cholestane-3 beta, 5 alpha, 6 beta-triol in ECV-304 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2006 ; 1761(3) :350-359.
- **Xie CX and Yokel RA.** Aluminum facilitation of iron-mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminium and iron concentrations. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 327:222–6.
- **Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W.** Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis.* 2009 ; 29(3): 422-37.
- **Xu J, Chen S, Ahmed SH, Chen H, Ku G, Goldberg MP, Hsu CY.** Amyloid-beta godeptides are cytotoxic to olindrocytes. *J Neurosci.* 2001 ;1, 21(1):RC118.
- **Xu Y, Lin D, Yu X, Xie X, Wang L, Lian L, Fei N, Chen J, Zhu N, Wang G, Huang X, Pan J.** The antinociceptive effects of ferulic acid on neuropathic pain : involvement of descending monoaminergic system and opioid receptors. *Oncotarget.* 2016;12;7(15): 20455-68.
- **Yaghmur A, Aserin A, Mizrahi Y, Nerd A, Garti N.** Evaluation of argan oil for deep-fat frying. *Lebensm Wiss Technol-Food Sci Technol.* 2001 ; 34 :124–130.
- **Yamada K, Shimizu M, Kawabe K, Ichitani Y.** Hippocampal AP5 treatment impairs both spatial working and reference memory in radial maze performance in rats. *Eur J Pharmacol.* 2015;5;758:137-41.
- **Yamamoto K and Fahimi HD.** Three dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver : evidence of interconnections between heterogene segments. *J Cel Biol.*1987 ; 1 05 : 7 1 3- 2 2.
- **Yang EY, Guo-Ross SX, Bondy SC.**The stabilisation of ferrous iron by a toxic B-amyloid fragment and by an aluminium salt. *Brain Res.* 1999; 28;839(2):221-6.
- **Yasui M, Kihira T, Ota K.** Calcium, magnesium and aluminum concentration in Parkinson's disease. *Neurotoxicol.* 1992;13: 593-600.
- **Yates CM, Butterworth J, Tennant MC, Gordon A.** Enzyme activities in relation to pH and lactate in post-mortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *J. Neurochem.* 1990 ; 55, 1624-1630.
- **Yin H, Xu L, Porter NA.** Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011;111, 5944-5972.

- **Yokel RA.** The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology*. 2000; 21:813–28.
- **Yoshida Y and Niki E.** Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2003;49(4):277-80.
- **Yoshikawa T, Yamamoto Y, Naito Y.** Free radicals in chemistry, Biology and Medicine, Ed. Oica International, Londres, 2000.
- **Yu L, Jiang R, Su Q, Yu H, Yang J.** Hippocampal neuronal metal ion imbalance related oxidative stress in a rat model of chronic aluminum exposure and neuroprotection of meloxicam. *Behav Brain Funct*. 2014;11;10:6.
- **Yuan CY, Lee YJ, Hsu GS.** Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J Biomed Sci*. 2012; 19:51.
- **Yuan XM, Li W, Brunk UT, Dalen H, Chang YH, Sevanian A.** Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28:208-18.
- **Zaidi SMKR, Banu N.** Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta. Clin Chim Acta*. 2004 ;340(1-2) : 229-33.
- **Zarrouk A, Debbabi M, Bezzine M, Karym EM, Badreddine A, Rouaud O, Moreau T, El Ayeb M, Nasser B, Hammami M, Lizard L.** Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* ; 2016a (En révision).
- **Zarrouk A, Martine L, Grégoire S, Camus E, Meddeb W, Karym E M, Badreddine A, Harzallah A, Hadj Ahmed S, Prost M, Majri M, Cherkaoui-Malki M, Nasser B, Hammami M, Bretillon L, Lizard L.** 2016b (en cours de rédaction).
- **Zarrouk A, Nury T, Karym EM, Vejux A, Sghaier R, Gondcaille C, Andreoletti P, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, Debbabi M, Fromont A, Riedinger JM, Moreau T, Lizard G.** Attenuation of 7-ketocholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy by dimethyl fumarate on 158N murine oligodendrocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016c ; 24 : S0960-0760(16)30038-3.
- **Zarrouk A, Vejux A, Mackrill J, O'Callaghan Y, Hammami M, O'Brien N, Lizard G.** Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res Rev*. 2014 ; 18,148–62.

- **Zatta P, Ibn-Lkhayat-Idrissi M, Zambenedetti P, Kilyen M, Kiss T.** In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. *Brain Res Bull.* 2002; 59:41–5.
- **Zatta P, Lain E, Cagnolini C.** Effects of aluminum on activity of krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. *Eur J Biochem.* 2000; 267(10):3049-55.
- **Zelcer N, Khanlou N, Clare R, Jiang Q, Reed-Geaghan EG, Landreth GE, Vinters HV, Tontonoz P.** Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer’s disease pathology by liver x receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104;10601–10606.
- **Zelcer N and Tontonoz P.** Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest.* 2006;116;607–614.
- **Zelcer N1, Khanlou N, Clare R, Jiang Q, Reed-Geaghan EG, Landreth GE, Vinters HV, Tontonoz P.** Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer’s disease pathology by liver x receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 ; 19;104 (25):10601-6.
- **Zhang L, Jin C, Liu Q, Lu X, Wu S, Yang J, Du Y, Zheng L, Cai Y.** Effects of subchronic aluminum exposure on spatial memory, ultrastructure and L-LTP of hippocampus in rats. *J Toxicol Sci.* 2013 ;38(2) :255-68.
- **Zhang M, Altuwaijri S, Yeh S.** RRR-alpha-tocopheryl succinate inhibits human prostate cancer cell invasiveness. *Oncogene.* 2004 ; 23 :3080-3088.
- **Zhang QL, Boscolo P, Niu PY, Wang F, Shi YT, Zhang L, Wang LP, Wang J, Di Gioacchino M, Conti P, Li QY, Niu Q.** How do rat cortical cells cultured with aluminum die: necrosis or apoptosis? *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008;21(1):107-15.
- **Zhang QL1, Niu Q, Shi YT, Niu PY, Liu CY, Zhang L, Zhang C.** Therapeutic potential of BAK gene silencing in aluminum induced neural cell degeneration. *J Inorg Biochem.* 2009 ; 103(11) :1514-20.
- **Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT.** Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem.* 2003; 270:3778-86
- **Zheng R, Shi Y, Jia Z, Zhao C, Zhang Q, Tan X.** Fast repair of DNA radicals. *Chem Soc Rev.* 2010 ; 39, 2827-2834.



- **Zhou XW, Gustafsson JA, Tanila H, Bjorkdahl C, Liu R, Winblad B, Pei JJ.** "Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A." *Neurobiol Dis.* 2008;31(3):386-94.
- **Zougagh M, Salghi R, Dhair S, Rios A.** Nanoparticle-based assay for the detection of virgin argan oil adulteration and its rapid quality evaluation. *Anal Bioanal Chem.* 2011 ;399, 2395-2405.
- **Zuliani G, Donnorso MP, Bosi C, Passaro A, Dalla Nora E, Zurlo A, Bonetti F, Mozzi AF, Cortese C.** Plasma 24S-hydroxycholesterol levels in elderly subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia : a case-control study. *BMC Neurol.* 2011 ;4 ;11 :121.

