HAL
open science

Mobilisation de l'acide arachidonique et sensibilité au peptide ß-amyloïde

Mélanie Thomas

To cite this version:

Mélanie Thomas. Mobilisation de l'acide arachidonique et sensibilité au peptide ß-amyloïde. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0255 . tel-01664960

HAL Id: tel-01664960

https://theses.hal.science/tel-01664960v1

Submitted on 15 Dec 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

École doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine
Discipline « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

par

Mme Mélanie Thomas

Mobilisation de l'acide arachidonique et sensibilité au peptide β-amyloïde

Soutenue publiquement le 14 décembre 2015,
devant la commission d'examen composée de :

Rapporteurs	M. Gérard LIZARD	Professeur des Universités, Université de Bourgogne Franche Comté
	M. Jean Denis TROADEC	Professeur des Universités, Université Aix-Marseille
Examinateurs	M. Michel LINDER	Professeur des Universités, Université de Lorraine
	M. Judes POIRIER	Professeur des Universités, Université de Mac Gill, Montréal
	M. Jean Luc OLIVIER, Directeur de thèse	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Lorraine
Invités	Thierry PILLOT	Chief Operating Officer & Chief Strategy Officer, Synaging, Nancy
	Nicolas VITALE	Directeur de recherche, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Gérard Lizard, Professeur à l'Université de Bourgogne Franche Comté, et Jean Denis Troadec, Maître de Conférences à l'université d'Aix-Marseille, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail en tant que rapporteurs. Je souhaite également remercier Michel Linder, Professeur à l'Université de Lorraine, et Judes Poirier, Professeur à l'Université Mac Gill de Montréal, pour avoir accepté de participer à ce jury, ainsi que Thierry Pillot, Directeur Scientifique de Synaging, et Nicolas Vitale, Directeur de recherche au CNRS et à l'Université de Strasbourg, pour avoir accepté l'invitation à ma soutenance de thèse. Je remercie toutes ces personnes pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon encadrant, le Pr. Jean-Luc Olivier, qui m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse. Je le remercie pour sa confiance, ses conseils avisés, ses remarques constructives et surtout le temps et l'énergie qu'il a consacrés à l'élaboration de ce travail. Jean-Luc, j'ai beaucoup appris de nos diverses discussions, scientifiques ou non, et j'ai beaucoup apprécié vos qualités humaines de compréhension et de sympathie. Pour toutes ces raisons, je vous adresse toute ma gratitude.

J'adresse également mes remerciements au Dr Frances Yen-Potin, directrice du laboratoire Lipidomix à mon arrivée en stage, puis animatrice de l'équipe BFLA, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et accordé sa confiance pour ces travaux. Je remercie par la même occasion le Pr Guido Rychen, directeur de l'URAFPA, pour m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse au sein de son laboratoire.

J'aimerais aussi souligner l'importance du soutien financier apporté par l'association France Alzheimer et la Région Lorraine dans la réalisation de ce projet.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à Cédric Paris, qui a réalisé les analyses de phospholipides de mes échantillons. Merci pour ton investissement, ta gentillesse et ta bonne humeur, c'était un plaisir de travailler avec toi. Je remercie également Marie-Christine Escanyé, pour avoir réalisé les analyses d'acides gras de mes nombreux échantillons.

J'adresse mes vifs remerciements à l'ensemble des membres statutaires de l'équipe BFLA que j'ai eu l'honneur de rencontrer au cours de ces années, les Dr Lynn Gregory-Pauron, Marie-Claire Lanhers et Catherine Malaplate-Armand, les Pr. Thomas Claudepierre, Catherine Corbier et Thierry Oster, ainsi que Marie-Antoinette Dziurla pour leurs conseils et leurs encouragements.

Remerciements

Merci du fond du cœur à mes collègues, qui ont tous participé à la bonne ambiance du labo et avec qui j'ai passé des moments inoubliables depuis mon arrivée ici. Merci à Violette Koziel pour son aide à mes débuts et nos discussions tout au long de ma thèse. Merci à Claire Soligot-Hognon pour son aide technique et sa bonne humeur. Merci à Ahmad, Hamed et Samina pour vos sourires, votre bonne humeur et votre gentillesse. Merci à Anthony pour ton soutien pendant mes deux premières années de thèse. Merci à Annabelle, Dorine, Laurent, Marion, Mylène, Nico et Pamela, pour votre aide technique, mais surtout pour votre amitié ! Tous ces délires, fou rires et discussions sur tout et n'importe quoi m'ont apporté toute la bonne humeur dont j'avais besoin pour cette thèse. Merci à Sandra, pour tous tes conseils, tes gaffes pour m'accompagner, tes encouragements et ton soutien, même à l'autre bout du monde ! Merci à Julie pour toutes ces discussions sur la thèse, l'avenir, la vie, pour ton aide du début à la fin, et pour avoir eu le courage de relire ma thèse ! Merci à tous d'avoir été là pour moi pendant ces trois ans, et surtout pour votre présence cette année.

Merci à tous mes amis, aux rencontres de 2015, aux belles (re)découvertes récentes, pour tous ces moments passés ensemble, ces bouffées d'oxygène, votre présence dans les bons et mauvais moments et pour vos nombreux encouragements dans la dernière ligne droite. Un merci tout particulier à Eglantine pour avoir relu ma thèse, et une petite pensée pour Blandine, Clément, Delphine et Martial et à nos discussions de thésards : je vous souhaite tout le courage qu'il vous faudra pour aller au bout de vos projets. Merci Rémi pour ta tendresse, ton soutien et ta patience lors de ces derniers mois. Je souhaite également remercier toute la famille Hasser avec qui on ne s'ennuie jamais, et notamment mes oncles qui ont toujours le mot pour rire et pour redonner confiance en soi. Merci à mes deux beaux-frères préférés, qui ont toujours été adorables avec moi. Jordane, merci pour ton aide aussi bien pour la thèse que pour tout le reste (dont mes nombreux déménagements !) et pour tes délires hors du commun. Pierre-Marie, merci pour ta gentillesse et ta joie de vivre à toute épreuve. Je te souhaite un énorme courage pour cette année. Un petit clin d'œil à mes deux magnifiques nièces, pour tous les moments d'évasion, de joie et de fous rires qu'elles m'offrent régulièrement. Une énorme pensée pour mes sœurs, sur qui j'ai toujours pu compter depuis toute petite et qui m'ont souvent servi d'exemple. Noémie, merci pour ta bienveillance et ton soutien. Emeline, merci pour nos fous rires et tes conseils sur la vie. Je termine ces remerciements par les deux personnes les plus importantes, mes parents. Merci pour tout votre amour qui m'a permis de m'épanouir dans un environnement parfait. Vous m'avez toujours soutenue dans mes choix et encouragée dans les épreuves. Si je suis arrivée jusqu'ici aujourd'hui c'est grâce à vous !

Je dédie cette thèse à mes regrettés grands-parents, Emile, Huguette, René, et surtout Simone qui m'a soutenue pendant une grande partie de ma thèse.

Table des matières

Remerciements **3**

Table des matières **5**

Liste des Figures **9**

Liste des tableaux **12**

Liste des abréviations **13**

Introduction **17**

Chapitre 1 : synthèse bibliographique **19**

I. La maladie d'Alzheimer : une maladie de la mémoire **19**
A. Bases biologiques de la mémoire 19
B. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer 23
1. Les démences séniles 23
2. Symptomatologie et évolution de la maladie d'Alzheimer 25
3. Formes de la maladie d'Alzheimer 27
C. Acteurs moléculaires de la maladie d'Alzheimer 27
1. La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires 27
2. Le peptide β-amyloïde et les plaques amyloïdes 29
3. Comment Tau et β–amyloïde interagissent-t-ils ? 35
D. La neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer 37
1. Les cellules gliales 38
2. Les médiateurs de l'inflammation 42
3. La régulation de l'inflammation 44
E. Les modèles animaux 46
1. Les modèles murins transgéniques de la maladie d'Alzheimer 47
2. Les modèles d'injection du peptide β-amyloïde 48
F. Approches thérapeutiques et préventives de la maladie d'Alzheimer 50
1. Approches thérapeutiques 50
2. Approches préventives 50

II. L'acide arachidonique et les fonctions cérébrales **53**
A. L'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé 53
B. Les acteurs de la mobilisation cellulaire de l'acide arachidonique 56
1. La phospholipases A2 cytosolique : libération de l'acide arachidonique 57
2. Les acyl-CoA synthétases 58
3. Les lysophospholipide acyltransférases 60
C. Rôle de l'acide arachidonique dans la fonction synaptique 62
1. L'acide arachidonique : un messager rétrograde 62
2. L'acide arachidonique : un acteur de l'exocytose 63
D. Les dérivés de l'acide arachidonique : eicosanoïdes et endocannabinoïdes 68
1. La voie des cyclo-oxygénases 69
2. La voie des lipoxygénases 71
3. La voie cytochrome P450 époxygénase 72
4. La synthèse des endocannabinoïdes 73

E. Rôles physiologiques et implication dans la MA des métabolites de l'acide arachidonique 75
1. Les prostanoïdes 75
2. Les leucotriènes 79
3. Les acides époxyeicosatriénoïques 79
4. Les endocannabinoïdes 80

III. L'alimentation dans la maladie d'Alzheimer 83
A. Synthèse des acides gras polyinsaturés à partir des précurseurs : une compétition entre les ω-6 et les ω-3 85
B. Approvisionnement du cerveau en acides gras polyinsaturés 88
1. Le transport des acides gras vers le cerveau 89
2. Incorporation des AGPI ω-3 et ω-6 dans les membranes cérébrales 92
C. Influence des acides gras polyinsaturés ω-3 et ω-6 alimentaires sur les fonctions cérébrales 96
1. Effets des acides gras polyinsaturés ω-3 et de l'acide docosahexaénoïque alimentaires 96
2. Effets des acides gras polyinsaturés ω-6 et de l'acide arachidonique alimentaires 99

Hypothèses de travail et objectifs 101

I. La recherche de stratégies préventives contre la MA est primordiale 101
II. L'acide arachidonique dans le cerveau et la maladie d'Alzheimer : rappel de la synthèse bibliographique 102
III. Hypothèses de travail 103
IV. Objectif de la thèse et plan du travail 104

Chapitre 2 : Matériel et méthodes 106

I. Etudes animale 106
A. Animaux et conditions d'hébergement 106
B. Procédure expérimentale 106
C. Prise de poids et prise alimentaire 108
D. Chirurgie stéréotaxique 108
1. Préparation des solutions injectables 108
2. Anesthésie des animaux 109
3. Injection intracérébroventriculaire 109
E. Analyses comportementales 111
1. Système de capture vidéo 111
2. Etude de la mémoire de travail ou mémoire à court terme 111
3. Etude de la mémoire à long terme 112
F. Prélèvements sanguins 114
G. Prélèvements des structures cérébrales et du foie 115
1. Extraction lipidique des structures cérébrales et du foie 115
2. Préparation de fractions enrichies en synaptosomes 116
3. Préparation des homogénats 116

II. Etudes *in vitro* 117
A. Origine et choix de la lignée cellulaire 117
B. Entretien de la lignée HT22 117
C. Congélation des stocks de cellules 118
D. Conditions de culture 118
1. Différenciation des cellules HT22 118
2. Traitement des cellules HT22 par les acides gras 118
3. Transfection des cellules HT22 par les siRNA 119

E. Extraction des lipides des cellules HT22 119
F. Préparation des protéines des cellules HT22 120

III. Analyses biochimiques 120
A. Dosages plasmatiques 120
B. Analyse des acides gras par chromatographie gazeuse 121
C. Analyse des espèces phospholipidiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem 122
D. Dosage protéique 124
E. Enzyme-linked immunosorbent assay 124
F. Analyses par Western blot 125
1. Electrophorèse 125
2. Electrotransfert 125
3. Immunorévélation des protéines 126

IV. Analyses statistiques 127

Chapitre 3 : Résultats 128

I. Impact d'un régime enrichi en acide arachidonique sur les phospholipides membranaires, la fonction synaptique et la sensibilité au stress amyloïde chez la souris 128
A. Introduction 128
B. Composition des régimes 128
C. Résultats 132
1. Impact des régimes sur la prise alimentaire et le poids des souris 132
2. Impact des régimes sur les taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques 134
3. Impact des régimes sur la répartition des acides gras périphériques 135
4. Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur les lipides membranaires au niveau cérébral 142
5. Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur les capacités cognitives 152
6. Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur l'expression de protéines impliquées dans la fonction synaptique 158
7. Impact des régimes et du peptide β–amyloïde sur des marqueurs de l'inflammation périphérique et centrale 165
8. Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur les enzymes phospohlipase A2 cytosolique, acyl-CoA synthétase 4 et acyl-CoA synthétase 6 167

II. Rôle de l'acyl-CoA synthétase 4 dans le développement des membranes neuronales 171
A. Introduction 171
B. Développement d'un modèle de différenciation neuronale 171
1. Description de la lignée HT22 171
2. Modèle de cellules HT22 différenciées 172
3. Validation du modèle de différenciation 173
C. Rôle de l'acyl-CoA synthétase 4 dans la différenciation neuronale 176
1. Expression protéique des acyl-CoA synthétases 4 et 6 dans la différenciation neuronale 176
2. Impact d'une diminution de l'expression de l'acyl-CoA synthétase 4 sur la différenciation neuronale 177
D. Rôle de l'acyl-coA synthétase 4 dans l'incorporation des acides arachidonique et docosahexaénoïque au sein des phospholipides membranaires 179
1. Expression protéique des acyl-CoA synthétases 4 et 6 en présence des acides arachidonique et docosahexaénoïque 179

2. Impact de traitements en acides arachidonique et docosahexaénoïque sur la répartition des phospholipides membranaires 181

Chapitre 4 : Discussion 188

I. Modifications lipidiques périphériques et centrales par les régimes « OLE » et « ARA » 188
A. Positionnement des régimes utilisés dans l'étude par rapport à ceux de la littérature 188
B. Les acides gras érythrocytaires et hépatiques 191
C. Les acides gras et phospholipides du système nerveux central 193
D. Rôle de l'acyl-CoA synthétase 4 dans l'incorporation du DHA et de l'ARA dans les phospholipides neuronaux 195

II. Acide arachidonique et altérations des fonctions mnésiques 196

III. Acide arachidonique, neuroinflammation et fonction synaptique 199
A. Acide arachidonique et neuroinflammation 199
B. Acide arachidonique et fonction synaptique 200
C. Action(s) de l'acide arachidonique : implication du cycle de Lands ? 202

Conclusion et perspectives 204

Références bibliographiques 210

Communications scientifiques 237

Liste des Figures

Figures de Bibliographie

Figure 1 : Différentes formes de plasticité synaptique médiées par les récepteurs N-methyl-D-aspartate (NMDA-R) au glutamate 22
Figure 2 : Exemples de lésions histologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer mises en évidence par des techniques de colorations 24
Figure 3 : Evolution du déclin cognitif chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer reflété par le score *Mini Mental State Examination* 26
Figure 4 : Stabilité des microtubules, hyperphosphorylation de Tau et dégénérescences neurofibrillaires 29
Figure 5 : Clivage protéolytique de la protéine *Amyloid Precursor Protein* par les enzymes α-, β- et γ-sécrétase : voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique 31
Figure 6 : Augmentation de la libération de glutamate médiée par le peptide β-amyloïde et excitotoxicité résultante 34
Figure 7 : Cascade pathologique de la maladie d'Alzheimer 36
Figure 8 : Activation de l'excitotoxicité du récepteur au N-methyl-A-asparate induite par le peptide β-amyloïde suite à l'interaction des protéines Tau et Fyn 37
Figure 9 : Le processus neuroinflammatoire suite à une altération du cerveau 39
Figure 10 : Structure des triglycérides et phospholipides 54
Figure 11 : Structure moléculaire des acides gras 55
Figure 12 : Structure de l'acide arachidonique 55
Figure 13 : Réorganisation des phospholipides membranaires dans le cycle de Lands 56
Figure 14 : Activation d'un acide gras en acyl-CoA par une acyl-CoA synthétase 59
Figure 15 : Formation du complexe *Soluble N-Ethylmaleimide-Attachment Receptor* (SNARE) par l'interaction entre la protéine SNARE vésiculaire et les protéines SNARE membranaires permettant l'exocytose 64
Figure 16 : Modèle d'intéraction entre la protéine Munc18 et la syntaxine 66
Figure 17 : Métabolisme de l'acide arachidonique et synthèse des eicosanoïdes 69
Figure 18 : Biosynthèse des leucotriènes par la voie des lipoxygénases 73
Figure 19 : Synthèse d'acides gras polyinsaturés à longue chaine à partir de leurs précurseurs essentiels 86
Figure 20 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique composée des cellules endothéliales, des péricytes et des prolongements des astrocytes 88
Figure 21 : Représentation schématique des voies de transport d'acides gras à travers la membrane plasmique 90
Figure 22 : Rôles du *Major Facilitator Super Family Domain Containing 2a* (Mfsd2a) dans le transport à travers la barrière hémato-encéphalique 91
Figure 23 : Synthèse *de novo* des triglycérides et glycérophospholipides : voie du glycérol-3-phosphate 93

Figures de la Stratégie Expérimentale

Figure 24 : Protocole expérimentale de l'étude de l'impact d'un régime enrichi en acide arachidonique sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer 108
Figure 25 : Repères anatomiques de référence Bregma et Lambda sur le crâne de souris 110
Figure 26 : Schéma du labyrinthe en Y pour évaluer la mémoire à court terme 112
Figure 27 : Schéma de la piscine de Morris pour évaluer la mémoire à long terme 113
Figure 28 : Composition en acides gras des huiles et du saindoux 129

Figure 29 : Composition en nutriments et en huiles ou saindoux des régimes « OLE » et « ARA » (en %) 130
Figure 30 : Répartition des acides gras dans les régimes « OLE » et « ARA » mesurés par chromatographie gazeuse (en % des acides gras totaux) 131
Figure 31 : Répartition des acides gras dans le régime « standard » mesurée par chromatographie gazeuse (en % des acides gras totaux) 132
Figure 32 : Prise alimentaire des souris sous régimes « OLE » et « ARA » 133
Figure 33 : Prise de poids des souris sous régime « OLE » et « ARA » 133
Figure 34 : Cholestérol plasmatique à jeun et post prandial des souris sous régimes « OLE » et « ARA » 134
Figure 35 : Triglycérides plasmatiques à jeun et post-prandial des souris sous régimes « OLE » et « ARA » 135
Figure 36 : Répartition des acides gras dans les érythrocytes des souris avant le début de l'étude (« standard ») et après les régimes « OLE » et « ARA » 136
Figure 37 : Répartition des acides gras dans le foie des souris sous régimes « OLE » et « ARA » 137
Figure 38 : Acides gras saturés dans les érythrocytes et le foie des souris avant le début de l'étude (« standard ») et après les régimes « OLE » et « ARA » 138
Figure 39 : Acides gras monoinsaturés dans les érythrocytes et le foie des souris avant le début de l'étude (« standard ») et après les régimes « OLE » et « ARA » 139
Figure 40 : Acides gras polyinsaturés de type ω-6 dans les érythrocytes et le foie des souris avant le début de l'étude (« standard ») et après régimes « OLE » et « ARA » 140
Figure 41 : Acides gras polyinsaturés de type ω-3 dans les érythrocytes et le foie des souris avant le début de l'étude (« stantard ») et après régimes « OLE » et « ARA » 141
Figure 42 : Répartition des acides gras dans le cortex des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » 142
Figure 43 : Acides gras saturés et monoinsaturés dans le cortex et l'hippocampe des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » 143
Figure 44 : Acides gras polyinsaturés dans le cortex et l'hippocampe des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » 144
Figure 45 : Répartition des espèces phosphatidylethanolamine contenant les acides arachidonique, docosahexaénoïque, docosatétraénoïque ou docosapentaénoïque dans le cortex des souris après les régimes « OLE » ou « ARA » 148
Figure 46 : Répartition des espèces phosphatidylethanolamine contenant les acides arachidonique, docosahexaénoïque, docosatétraénoïque ou docosapentaénoïque dans l'hippocampe des souris après les régimes « OLE » ou « ARA » 149
Figure 47 : Répartition des espèces phosphatidylsérine contenant les acides arachidonique, docosahexaénoïque, docosatétraénoïque ou docosapentaénoïque dans l'hippocampe et le cortex des souris après les régimes « OLE » ou « ARA » 149
Figure 48 : Répartition des espèces phosphatidylcholine contenant les acides arachidonique ou docosahexaénoïque dans l'hippocampe et le cortex des souris après les régimes « OLE » ou « ARA » 150
Figure 49 : Répartition des espèces phosphatidylinositol contenant les acides arachidonique ou docosahexaénoïque dans l'hippocampe et le cortex des souris après les régimes « OLE » ou « ARA » 151
Figure 50 : Capacités locomotrices et d'exploration des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurées par le nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe en Y 153
Figure 51 : Mémoire spatiale à court terme des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par le pourcentage d'alternances spontanées réalisées par les souris dans le labyrinthe en Y 154

Figure 52 : Apprentissage des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesuré par le temps de latence pour atteindre la plateforme dans la piscine de Morris..... 155
Figure 53 : Mémoire à long terme des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par le pourcentage de temps passé par les souris dans les cadrans cibles et opposés et par la latence pour atteindre le quadrant cible dans la piscine de Morris..... 157
Figure 54 : Expression protéique du marqueur présynaptique SNAP25 dans les synaptosomes préparés à partir de l'hippocampe des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot (à gauche) et par ELISA (à droite)..... 158
Figure 55 : Expression protéique du marqueur postsynaptique PSD95 dans les synaptosomes préparés à partir de l'hippocampe des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot (à gauche) et par ELISA (à droite)..... 159
Figure 56 : Expression protéique du marqueur présynaptique SNAP25 dans le cortex des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot (à gauche) et par ELISA (à droite) 160
Figure 57 : Expression protéique du marqueur postsynaptique PSD95 dans le cortex des souris « OLE + NaCl», « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot (à gauche) et par ELISA (à droite) 161
Figure 58 : Expression protéique des sous-unités GLUR1 et GLUR2 du récepteur AMPA dans l'hippocampe des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot..... 162
Figure 59 : Expression protéique des sous-unités GLUR3 et GLUR4 du récepteur AMPA dans l'hippocampe des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot..... 162
Figure 60 : Expression protéique des sous-unités GLUR1 et GLUR2 du récepteur AMPA dans le cortex des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot..... 164
Figure 61 : Expression protéique des sous-unités GLUR3 et GLUR4 du récepteur AMPA dans le cortex des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot..... 164
Figure 62 : Taux plasmatique de la protéine C réactive chez les souris à l'issue des 12 semaines de régimes « OLE » et « ARA » 165
Figure 63 : Expression protéique de la GFAP dans le cortex (à gauche) et l'hippocampe (à droite) des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot..... 166
Figure 64 : Expression protéique de la cPLA2 dans le cortex (à gauche) et l'hippocampe (à droite) des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot 168
Figure 65 : Expression protéique d'ACSL6 dans le cortex (à gauche) et l'hippocampe (à droite) des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot 169
Figure 66 : Expression protéique d'ACSL4 dans le cortex (à gauche) et l'hippocampe (à droite) des souris des « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot..... 170
Figure 67 : Protocole de différenciation des cellules HT22..... 172
Figure 68 : Cellules HT22 avant différenciation (témoin) et après 24 et 48 heures de différenciation (grossissement X100 et X200) 173
Figure 69 : Etude morphologique des cellules HT22 par la mesure des neurites avant différenciation et après 24 et 48h de différenciation 174
Figure 70 : Expression protéique du marqueur de différenciation NMDA-R1 dans les cellules HT22 non différenciées (avant le traitement de différenciation) et différenciées (après 48h de traitement de différenciation) mesurée par Western blotFigure 69 175

Figure 71 : Expression protéique de l'ACSL4 dans les cellules HT22 non différenciées (avant le traitement de différenciation) et différenciées (après 48h de traitement de différenciation) mesurée par Western blot 176
Figure 72 : Expression protéique de l'ACSL6 dans les cellules HT22 non différenciées (avant le traitement de différenciation) et différenciées (après 48h de traitement de différenciation) mesurée par Western blot 177
Figure 73 : Protocole de différenciation des cellules HT22 après une sous-expression d'ACSL4 178
Figure 74 : Expression protéique d'ACSL4 dans les cellules HT22 après une transfection avec des siRNA ciblant l'ACSL4 178
Figure 75 : Pourcentage de cellules HT22 avec neurites après une sous-expression de 60% d'ACSL4 et 24h de différenciation 179
Figure 76 : Protocole de traitement des HT22 différenciées avec les acides arachidonique et docosahexaénoïque 179
Figure 77 : Expression protéique de l'ACSL4 dans les cellules HT22 différenciées traitées avec 5 µM d'acide arachidonique ou docosahexaénoïque mesurée par Western blot 180
Figure 78 : Expression protéique de l'ACSL6 dans les cellules HT22 différenciées traitées avec 5 µM d'acide arachidonique ou docosahexaénoïque mesurée par Western blot 181
Figure 79 : Protocole de traitement des HT22 différenciées avec les acides arachidonique ou docosahexaénoïque après une transfection avec des siRNA contrôles ou ciblant ACSL4 182
Figure 80 : Répartition des espèces phosphatidylinositol contenant les acides arachidonique et docosahexaénoïque dans les cellules HT22 transfectées avec des siRNA contrôles (à gauche) ou ACLS4 (à droite) et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque 182
Figure 81 : Répartition des espèces phosphatidylsérine contenant les acides arachidonique et docosahexaénoïque dans les cellules HT22 transfectées avec des siRNA contrôles (à gauche) ou ACLS4 (à droite) et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque 183
Figure 82 : Répartition des espèces phosphatidylcholine contenant les acides arachidonique et docosahexaénoïque dans les cellules HT22 transfectées avec des siRNA contrôles (à gauche) ou ACLS4 (à droite) et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque 184
Figure 83 : Répartition des espèces phosphatidylethanolamine contenant les acides arachidonique ou docosahexaénoïque dans les HT22 transfectées avec des siRNA contrôles et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque 185
Figure 84 : Répartition des espèces phosphatidylethanolamine contenant les acides arachidonique ou docosahexaénoïque dans les HT22 transfectées avec des siRNA ciblant l'ACSL4 et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque 186
Figure 85 : L'ARA est impliqué dans l'altération synaptique induite par les oligomères du peptide β-amyloïde 209

Liste des tableaux

Tableau I : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages 126
Tableau II : Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages 127
Tableau III : Identification des espèces phospholipidiques à partir de leur m/z par la technique de chromatogaphie liquide couplée à une double spectrométrie de masse 146

Liste des abréviations

A	
Aβ	β-amyloïde
ACSL	Acyl-CoA synthétase à longue chaine
ADA	*A Disintegrin And Metalloproteinase*
AEA	Arachidonoylethanolamine
AG	Acide gras
2-AG	2-arachidonoylglycérol
AGPA	1-acyl-glycerol-3-phosphate O-acyltransférase
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AICD	*APP Intracellular Domain*
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ALA	Acide α-linolénique
AMP	Récepteur α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic au glutamate
APOE	Apolipoprotéine E
APP	*Amyloid Precursor Protein*
ARA	Acide arachidonique
ATP	Adénosine triphosphate
B	
BACE	*Beta Site APP Cleaving Enzyme*
BHE	Barrière hémato-encéphalique
C	
cAMP	*Cyclic Adenosine Monophosphate*
CDK	*Cyclin-Dependent Kinase*
CDTA	*Calcium-Dependent Transacylase*
CELM	Comité d'éthique lorrain en matière d'expérimentation animale
CoA	Coenzyme A
COX	Cyclo-oxygénase
$cPLA_2$	Phospholipase A_2 cytosolique
CRP	Protéine C réactive
CYPEPOX	Cytochrome P450 époxygénase
Cys-LT	Cystéinyl-leucotriène
D	
DAG	Diacylglycérol
DAGL	Diacylglycérol lipase
Δ^9-THC	Δ^9-tetrahydrocannabinol
DHA	Acide docosahexaénoïque
diHETE	Dihydroxyeicosatriénoïque
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNF	Dégénérescences neurofibrillaires
15-d-PGJ_2	15-desoxy-Δ(12-14)-prostaglandine J_2

DPA	Acide docosapentaénoïque
DTA	Acide docosatétraénoïque
E	
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EET	Acide époxyeicosatriénoïque
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPA	Acide eicosapentaénoïque
ERK	*Extracellular signal-Regulated Kinase*
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESM	Erreur standard à la moyenne
F	
FAAH	*Fatty Acid Amide Hydrolase*
FABP	*Fatty Acid Binding Protein*
FATP	*Fatty Acid Transport Proteins*
FLAP	*5-LOX Activating Protein*
G	
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GC	Chromatographie gazeuse
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GLUR	Sous-unité des récepteurs α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic au glutamate
GSK	*Glycogen Synthase Kinase*
H	
HETE	Acide hydroxyeicosatetraénoïque
HPETE	Acide hydroperoxyeicosatetraénoïque
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
I	
ICV	Intracérébroventriculaire
IL	Interleukine
$iPLA_2$	Phospholipase A_2 calcium-indépendante
J	
JNK	*C-Jun N-ter Kinase*
L	
LA	Acide linoléique
LCMSMS	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LOX	Lipoxygénase
LPAAT	*Lysophosphatidic Acid Acyltransferase*
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPCAT	Lysophosphatidylcholine acyltransférase

LPE	Lysophosphatidylethanolamine
LPEAT	Lysophosphatidylethanolamine acyltransférase
LPI	Lysophosphatidylinositol
LPIAT	Lysophosphatidylinositol acyltransférase
LPLAT	Lysophospholipide acyltransférase
LPS	Lysophosphatidylsérine
LPSAT	Lysophosphatidylsérine acyltransférase
LT	Leucotriène
LTA_4H	Leucotriène A_4 hydrolase
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
LTQ	*Linear Trap Quadrupole*
M	
MA	Maladie d'Alzheimer
MAGL	Monoacylgylcérol lipase
MAPK	*Mitogen-Activated Protein Kinases*
MBOAT	*Membrane-Bound O-Acyltransferases*
MCI	*Mild Cognitive Impairment*
Mfsd2a	*Major Facilitator Super Family Domain Containing 2a*
mGlu	Récepteur métabotropique au glutamate
MMSE	*Mini Mental State Examination*
mPGES	Prostaglandine E_2 synthasePGES-1 microsomale
MRP1	*Multidrug-Resistance-Associated Protein*
MS	*Spectrométrie de masse*
m/z	Masse/charge
N	
NAPE	N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine
NGF	*Nerve Growth Factor*
NMDA-R	Récepteur N-methyl-D-aspartate au glutamate
NFκB	*Nuclear Factor* κB
O	
OMS	Organisation mondiale de la santé
P	
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PG	Prostaglandine
PGD2S	Prostaglandine D_2 synthase
PGES	Prostaglandine E_2 synthase
PI	Phosphatidylinositol
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C

PKCa	PKC atypique
PLA_2	Phospholipase A_2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PPAR	*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*
PS	Phosphatidylsérine
PSD95	*Postsynaptic Density Protein* 95
R	
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RPM	Tour par minute
RTPCR	*Reverse transcription polymerase chain reaction*
S	
SAFE	*Scientific Animal Food & Engineering*
siRNA	*Small interfering RNA*
SM	Sec1/Munc18
SNAP25	*Synaptosome-Associated Protein of 25 kDa*
SNARE	*Soluble N-Ethylmaleimide-Attachment Receptor*
SNC	Système nerveux central
SORL	*Sortilin-Related Receptor*
$sPLA_2$	Phospholipase A_2 secrétée
SVF	Sérum de veau foetal
T	
TAG	Triacylglycérol
TGF	*Transforming Growth Factor*
TNF	*Tumor Necrosis Factor*
TX	Thromboxane
V	
VAMP	*Vesicle Associated Membrane Protein*

Introduction

Aujourd'hui, le nombre de personnes souffrant de démence dans le monde est estimé à 47,5 millions, dont 60 à 80% sont atteints par la maladie d'Alzheimer (MA). Ce chiffre devrait doubler d'ici 2030 et tripler d'ici 2050 (d'après le *World Alzheimer report 2014*). La prévalence de la MA augmente de manière exponentielle avec l'âge, cette augmentation étant très marquée à partir de 65 ans. En effet la prévalence de la MA chez les personnes âgées de 65 à 75 ans est de 3% et s'élève jusqu'à 50% chez les personnes âgées de 85 ans ou plus (Mayeux and Stern, 2012 ; Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), le coût sociétal de la démence était estimé à 604 milliards de dollars en 2010. La MA ainsi que les autres démences sont fortement liées à l'âge, or le vieillissement de la population ne cesse d'augmenter depuis les années 1950 : le nombre de personnes âgées de plus de 60 ans dépassera le nombre d'enfants âgés de 0 à 14 ans en 2045 (Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). Avec le vieillissement de la population, la MA est devenue un problème majeur de santé publique au niveau mondial avec des enjeux socio-économiques importants.

C'est une maladie dont les mécanismes pathologiques sont de mieux en mieux connus mais dont les causes profondes restent largement à déterminer. Au-delà du terme de démence dont le sens est socialement très péjoratif, la MA est d'abord une maladie de la mémoire et des synapses. C'est pourquoi nous aborderons dans la première partie de notre synthèse bibliographique les mécanismes biologiques responsables de la formation et du maintien de la mémoire avant de détailler ce qui est connu des acteurs moléculaires et cellulaires de cette maladie. Nous préciserons notamment dans cette première partie le rôle de la neuroinflammation qui implique des dérivés de l'acide arachidonique (ARA). Nous nous focaliserons dans une deuxième partie de notre synthèse bibliographique sur l'ARA, sur son implication dans les fonctions synaptiques et sur sa possible implication dans les mécanismes de la MA.

Il n'existe pour l'instant aucun traitement véritablement efficace contre les mécanismes de la MA et les stratégies préventives sont balbutiantes, comme la

connaissance des facteurs de risque des formes sporadiques de la MA. Des approches nutritionnelles peuvent servir de base à une prévention de la MA. Après avoir décrit les connaissances actuelles sur les facteurs de risque de la MA dans la première partie de la synthèse bibliographique, nous porterons notre attention sur les approches nutritionnelles qui ont été tentées dans la MA, en relation avec les acides gras polyinsaturés (AGPI). La troisième et dernière partie de notre synthèse bibliographique sera donc consacrée à l'importance de la nutrition dans le fonctionnement cérébral et notamment les effets des AGPI alimentaires sur la MA.

Après avoir énoncé les objectifs de ce travail de thèse, la stratégie expérimentale permettant de répondre à ces objectifs sera développée. Dans un premier temps les techniques utilisées et les protocoles expérimentaux seront détaillés dans le deuxième chapitre matériel et méthodes de cette thèse. Dans un second temps, les résultats en découlant seront décrits dans le troisième chapitre de cette thèse. Les résultats obtenus seront ensuite discutés et mis en relation avec la littérature dans le dernier chapitre « discussion » de la thèse.

Nous allons à présent détailler les différents aspects de la littérature liés à notre travail dans le premier chapitre de cette thèse, la synthèse bibliographique.

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

I. La maladie d'Alzheimer : une maladie de la mémoire

A. Bases biologiques de la mémoire

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. Un défaut de la mémoire, ou au contraire sa présence, est reconnu comme la modification d'un comportement particulier ou un changement dans la capacité à apprendre ou à se souvenir (Stuchlik, 2014). Les premiers travaux réalisés sur le stockage de la mémoire ont proposé la théorie d'un changement anatomique dans les connexions fonctionnelles établies entre deux cellules nerveuses, appelées par la suite synapses (Foster *et al.*, 1897). Les transmissions synaptiques sont une forme de communication cellule-cellule bidirectionnelle et sont modifiables par elles-mêmes (Jessell and Kandel, 1993). De nombreuses études ont montré que les mécanismes de consolidation et de stockage de la mémoire à long terme commencent au niveau de la synapse. La signalisation trans-synaptique et le recrutement de mécanismes pré- et postsynaptiques forment la base du stockage de la mémoire (Marrone, 2005; Hawkins *et al.*, 2006). L'efficacité du transfert d'informations synaptiques dans le cerveau est modulable selon des échelles de temps allant de la milliseconde à plusieurs heures, voire des jours. On parle alors de plasticité synaptique, phénomène considéré comme un élément fondamental de la mémoire. Au début des années 1980, des études ont exploré les changements structuraux des synapses à l'origine de la consolidation de la mémoire par l'étude de la sensibilisation, qui est une forme d'apprentissage par la peur. L'animal apprend les propriétés d'un stimulus délétère unique. Le stockage de la sensibilisation à long terme s'accompagne de deux types de changements structuraux au niveau des synapses entre les neurones sensoriels et leur neurone cible. Le premier changement est la réorganisation d'une synapse préexistante menant à une augmentation du nombre et de la taille des zones actives des neurones sensoriels ainsi

qu'une multiplication des vésicules au niveau des neurones après sensibilisation (Bailey and Chen, 1983, 1988b). Le deuxième changement est un processus de croissance plus extensif qui induit une augmentation par deux du nombre de bourgeons synaptiques, qui sont l'extrémité de l'arborisation terminale de l'axone d'un neurone, ainsi qu'un agrandissement de chaque arborisation synaptique (Bailey and Chen, 1988a). Un autre type de mémoire a été étudié, la mémoire d'habituation à long terme qui est une forme d'apprentissage dans laquelle l'organisme cesse de répondre à un stimulus lorsque celui-ci lui a été présenté à plusieurs reprises. La mémoire d'habituation à long terme est associée à un élagage des connexions préexistantes avec une diminution du nombre et de la taille des zones actives ainsi qu'une diminution des vésicules au niveau des neurones sensoriels. Le cerveau ne pouvant pas héberger une croissance continue de nouvelles synapses, il semble avoir la capacité de supprimer les synapses vieilles et inappropriées. Ainsi, la mémoire est maintenue par une croissance et un renforcement des synapses appropriées et une élimination des synapses inappropriées (Xu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Bourne and Harris, 2011). La plasticité synaptique est également caractérisée par deux manifestations électrophysiologiques importantes : la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD). Les LTP et LTD sont des mécanismes cellulaires responsables de l'apprentissage hippocampique et de la mémoire (Bliss *et al.*, 2014). La LTP est induite par une libération présynaptique de glutamate par exocytose des vésicules synaptiques. C'est une augmentation persistante de l'intensité de la transmission synaptique induite par une stimulation brève et de haute fréquence, tandis que la LTD est une diminution persistante de l'intensité de la transmission synaptique induite par des épisodes plus longs de stimulation à basse fréquence. Plus l'ensemble synaptique est saturé par la potentialisation, plus ces synapses résistent à des potentialisations additionnelles. À l'inverse, plus la population de synapses est soumise à une dépression, plus les stimulations ultérieures vont pouvoir contrer cette dépression (Abraham and Bear, 1996; Abraham *et al.*, 2001). La plasticité synaptique a également été étudiée au niveau des épines dendritiques, notamment dans l'hippocampe. Les épines dendritiques jouent un rôle important dans la transmission synaptique puisqu'elles

constituent la surface de réception postsynaptique. Les dendrites sont le site majeur d'excitation des synapses et sont très diversifiées par leurs tailles et leurs formes. Cette diversité leur permet d'augmenter la surface totale postsynaptique. Ceci permet de former plus de connexions dans un volume compact (Harris and Kater, 1994). Les épines dendritiques contiennent de nombreuse protéines dont les récepteurs, les canaux ioniques, les protéines d'échafaudage, les molécules de signaux enzymatiques, les éléments du cytosquelette, et les protéines d'exocytose ou endocytose (Kennedy, 2000; Sheng and Hoogenraad, 2007; Harris and Weinberg, 2012). La stimulation d'un neurone présynaptique active à l'intérieur de celui-ci la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle les récepteurs postsynaptiques. La PKA initie l'augmentation de la libération de transmetteurs synaptiques à partir des neurones sensoriels présynaptiques et fournit le signal trans-synaptique. Cette libération spontanée active les récepteurs postsynaptiques (Jin *et al.*, 2012). Trois types de récepteurs au glutamate jouent des rôles importants dans la transmission du signal : les récepteurs métabotropiques (mGlu), les récepteurs N-methyl-D-aspartate (NMDA-R) et les récepteurs α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA-R). Les récepteurs mGlu sont classés en trois groupes distincts basés sur leur couplage à une protéine G et leur affinité avec leur substrat. Ils exercent des rôles distincts dans le sens où ils peuvent réguler la mémoire à court terme ainsi que la mémoire à long terme (Mukherjee and Manahan-Vaughan, 2013). Une fois activés au niveau postsynaptique, les récepteurs mGlu augmentent la production d'IP3 qui provoque la libération de calcium intracellulaire. Celui-ci induit l'insertion d'un nouveau AMPA-R et la réorganisation au niveau du neurone postsynaptique (Figure 1) (Jin *et al.*, 2012). Les AMPA-R interviennent dans la majorité des neurotransmissions excitatrices du système nerveux central (SNC). Ces récepteurs sont critiques pour presque tous les aspects de la fonction cérébrale, notamment l'apprentissage, la mémoire et la cognition (Henley and Wilkinson, 2013). Les AMPA-R sont des canaux ioniques qui s'activent par la fixation d'un ligand. Ils sont composés de différentes combinaisons de quatre sous-unités différentes (GLUR1 à 4). Ces récepteurs sont des protéines très mobiles qui subissent des translocations pour être recyclées et retirées des synapses (Henley *et al.*, 2011; Anggono and Huganir, 2012).

L'augmentation du nombre d'AMPA-R, ainsi que les changements dans leur composition ou propriété, participent à la LTP et à la LTD qui se produisent au niveau des synapses dans tout le SNC (Figure 1) (Malenka and Bear, 2004).

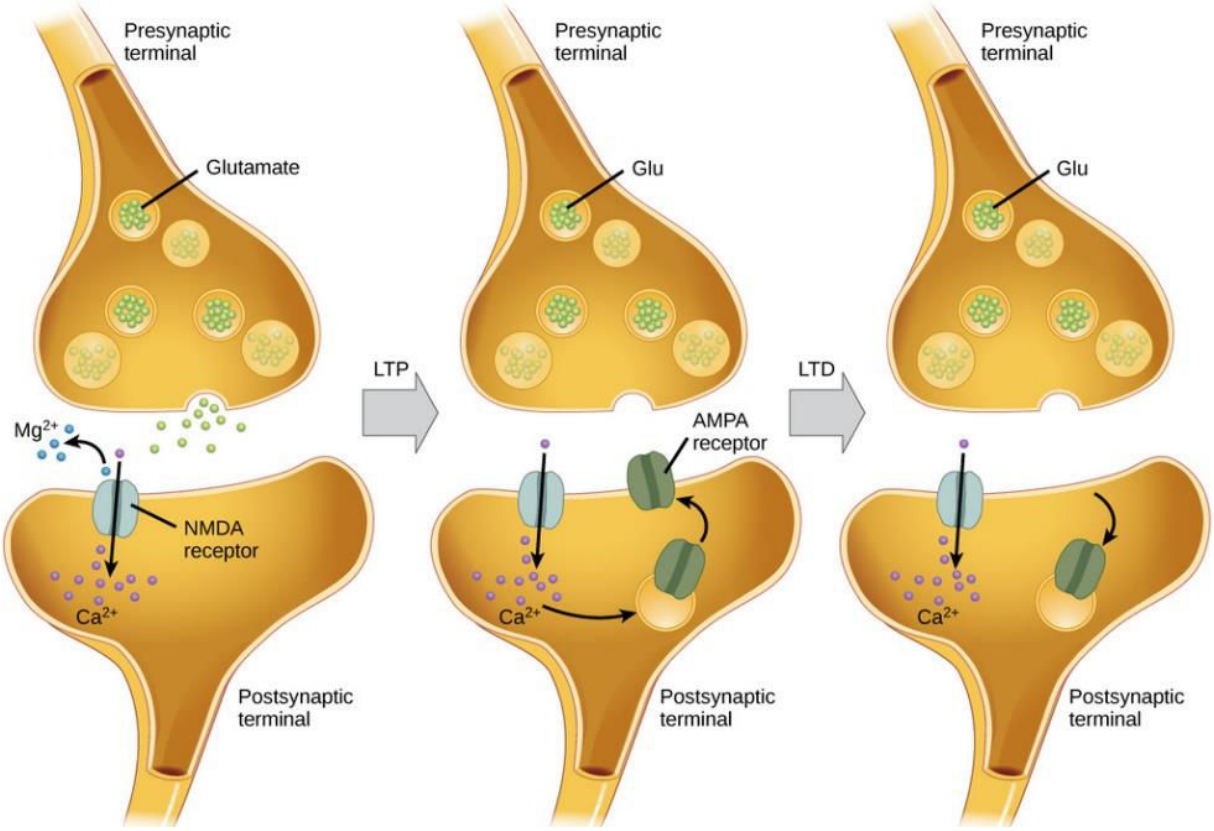


Figure 1 : Différentes formes de plasticité synaptique médiées par les récepteurs N-methyl-D-aspartate (NMDA-R) au glutamate d'après Boundless, 2015

L'entrée de calcium par les récepteurs postsynaptiques N-methyl-D-aspartate (NMDA-R) peut initier la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD). La LTP surgit lorsqu'une synapse est stimulée de façon répétée. Cette stimulation résulte en l'insertion de récepteurs α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA-R) supplémentaires dans la membrane postsynaptique. La fois suivante où le glutamate est libéré, il se fixe aux deux types de récepteurs : les NMDA-R et les nouveaux AMPA-R insérés. Ceci induit une dépolarisation de la membrane plus efficace. La LTD apparait lorsque peu de molécules de glutamate se fixent au NMDA-R. Le calcium qui passe par les NMDA-R induit l'endocytose des AMPA-R. Le neurone postsynaptique est alors moins réactif au glutamate libéré par le neurone présynaptique. Glu : glutamate ; Presynaptic terminal : terminaison présynaptique ; postsynaptique terminal : terminaison postsynaptique ; receptor : récepteur.

Enfin, la forme de plasticité synaptique la plus étudiée est induite par l'activation des NMDA-R postsynaptiques qui se traduit par des changements dans le nombre d'AMPA-R à la membrane (Morris *et al.*, 1986; Dudek and Bear, 1992). Les NMDA-R sont des canaux cationiques non spécifiques avec une forte perméabilité au calcium.

Lorsque le potentiel membranaire est au repos, ces canaux sont bloqués par les ions Mg^{2+}. Ils sont débloqués par la dépolarisation de la membrane (Figure 1) (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984). L'activation des NMDA-R nécessite la libération présynaptique de glutamate et la dépolarisation postsynaptique. L'entrée d'ions Na^{+} et Ca^{2+} induite par l'activation des NMDA-R mène à une nouvelle dépolarisation (Figure 1). Lorsque la concentration intracellulaire en Ca^{2+} atteint un seuil, les voies de transduction du signal sont alors initiées, induisant des changements dans la réponse synaptique (Henley and Wilkinson, 2013). De plus l'activation directe des NMDA-R, mais aussi des récepteurs mGlu, peut provoquer une LTD (Snyder *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004).

La plasticité synaptique peut être affectée par l'âge, le stress ou certaines pathologies. La plasticité synaptique et la mémoire sont particulièrement affectées dans les maladies neurodégénératives liées à l'âge et notamment dans la MA. Nous allons à présent décrire les différents aspects de cette pathologie.

B. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer

1. Les démences séniles

La démence est un syndrome évolutif ou chronique lié à une neurodégénérescence. Chez le sujet âgé, l'altération de la fonction cognitive est plus importante que celle attendue lors d'un vieillissement non pathologique. Elle est alors qualifiée de démence sénile. La démence affecte la mémoire mais également le raisonnement, l'orientation, la compréhension, le calcul, la capacité d'apprentissage, le langage et le jugement. Les démences peuvent donc affecter la qualité de vie des patients ainsi que celle de leur entourage (Berrios, 1987). La démence est l'une des causes principales de handicap et de dépendance parmi les personnes âgées dans le monde. D'après l'OMS, la démence touche 47,5 millions de personnes dans le monde, dont 58% vivent dans un pays à revenu faible ou intermédiaire. On estime, dans l'ensemble de la population, qu'entre 5 et 8% des personnes âgées de 60 ans et plus seront atteints de démence à un moment donné. Parmi les démences, la MA est la

pathologie la plus connue et la plus étudiée. L'*Alzheimer's association* estimait en 2011 que 60 à 80% des cas de démences étaient dus à la MA.

La MA a été décrite pour la première fois par Alois 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 accompagnés de troubles du comportement, d'une perte progressive du langage et d'une désorientation. *Post mortem*, Alois Alzheimer observe une grande atrophie du cerveau de sa patiente et l'étude histopathologique du cerveau lui permet de décrire deux types de lésions : des enchevêtrements neurofibrillaires à l'intérieur des neurones et des plaques séniles autour des neurones (Figure 2). C'est en 1910 que la communauté scientifique décide de nommer cette démence « maladie d'Alzheimer », en référence au neuropsychologue l'ayant décrite pour la première fois (Selkoe, 2001). L'âge précoce de la patiente d'Alois Alzheimer laisse à présent penser que celle-ci était plutôt atteinte d'une forme familiale de la MA et non de la forme sporadique liée à l'âge. À l'heure actuelle, cette maladie a pris une telle ampleur qu'elle est considérée comme un problème majeur de santé publique au niveau mondial. De nombreuses études ont été réalisées depuis sa découverte afin de comprendre ses mécanismes moléculaires et cellulaires qui seront décrits dans cette partie, mais les connaissances fondamentales nécessitent encore d'être précisées pour trouver des solutions thérapeutiques efficaces afin de traiter cette maladie.

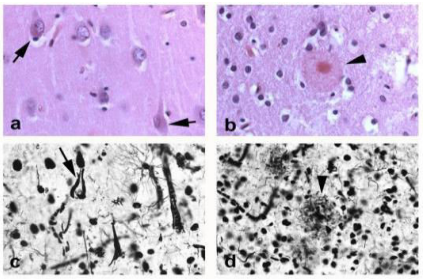


Figure 2 : Exemples de lésions histologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer mises en évidence par des techniques de colorations d'après Kövari *et al.*, 2011

a,b : hématoxyline et éosine ; c,d : imprégnation au nitrate d'argent. Enchevêtrements neurofibrillaires (a et c) et plaques séniles (b et d).

2. *Symptomatologie et évolution de la maladie d'Alzheimer*

La MA est décrite comme une démence se manifestant dans un premier temps par un déclin progressif de la mémoire, puis la gravité des symptômes augmente tout au long de la maladie jusqu'à l'invalidité du patient. Les premiers symptômes concernent la mémoire de travail avec une incapacité à retenir de nouvelles informations, puis d'autres zones cognitives sont touchées : la mémoire à long terme, l'orientation spatiale et temporelle, le langage, les fonctions exécutives (troubles de l'attention et incapacité de la personne à prendre des décisions, à planifier ou à raisonner) et enfin des troubles de reconnaissance ou agnosies. Le déclin cognitif est en général accompagné de changements d'humeur chez les patients atteints par la MA. Ces différents symptômes induisent des difficultés aussi bien dans les activités professionnelles et sociales que dans la vie quotidienne (Flicker *et al.*, 1984; Huff *et al.*, 1987; Bekris *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2014).

L'historique clinique du patient ainsi que des examens neurologiques et des tests neuropsychologiques sont nécessaires pour pouvoir diagnostiquer la MA. Un historique détaillé et l'évolution des symptômes sont décrits par le patient ainsi que par un tiers pour pouvoir suivre la progression de la maladie. Les tests neuropsychologiques, dont le plus couramment utilisé est le test MMSE (*Mini Mental State Examination*), permettent de diagnostiquer la MA au niveau clinique, mais le diagnostic ne peut être confirmé qu'avec l'étude histologique du cerveau réalisée *post mortem*. Le test MMSE consiste en un bref questionnaire qui permet de diagnostiquer le trouble cognitif et de déterminer la sévérité de ce trouble afin de suivre son évolution. Les scores de ce test vont de 0 à 30 points. Les scores supérieurs à 27 correspondent aux individus ne présentant aucun trouble cognitif. Les troubles cognitifs sont considérés comme légers pour des scores de 19 à 24, modérés de 10 à 18 et sévères en dessous de 9 (Jacqmin-Gadda *et al.*, 1997; Aevarsson and Skoog, 2000; Chatfield *et al.*, 2007; Ballard *et al.*, 2011).

Les patients peuvent être atteints par la MA des décennies avant leur diagnostic. En effet la MA se développe progressivement avec une première phase préclinique dans laquelle les changements histopathologiques attribués à la MA commencent à se

développer. Les cliniciens décrivent ensuite une phase correspondant aux troubles cognitifs légers ou MCI (*Mild Cognitive Impairment*) dans laquelle les troubles cognitifs sont apparents mais insuffisants pour être diagnostiqués comme une démence. À l'heure actuelle, la moitié des personnes dont le diagnostic clinique MCI a été validé évolueraient vers la MA. Une fois le diagnostic de la MA réalisé, le patient entre dans la phase clinique de la MA dans laquelle le déclin cognitif s'aggrave jusqu'à l'incapacité et le décès du patient. Il est important de souligner que cette pathologie évolue de façon très différente d'un patient à l'autre. Ce polymorphisme empêche de prédire son évolution au fil des années, mais le test MMSE apporte des éléments permettant de suivre son évolution pour chaque patient (Figure 3) (Petersen *et al.*, 1999, 2001; Swerdlow, 2007). L'évolution clinique de la MA reflète des mécanismes moléculaires et cellulaires qui seront décrits ultérieurement dans cette thèse.

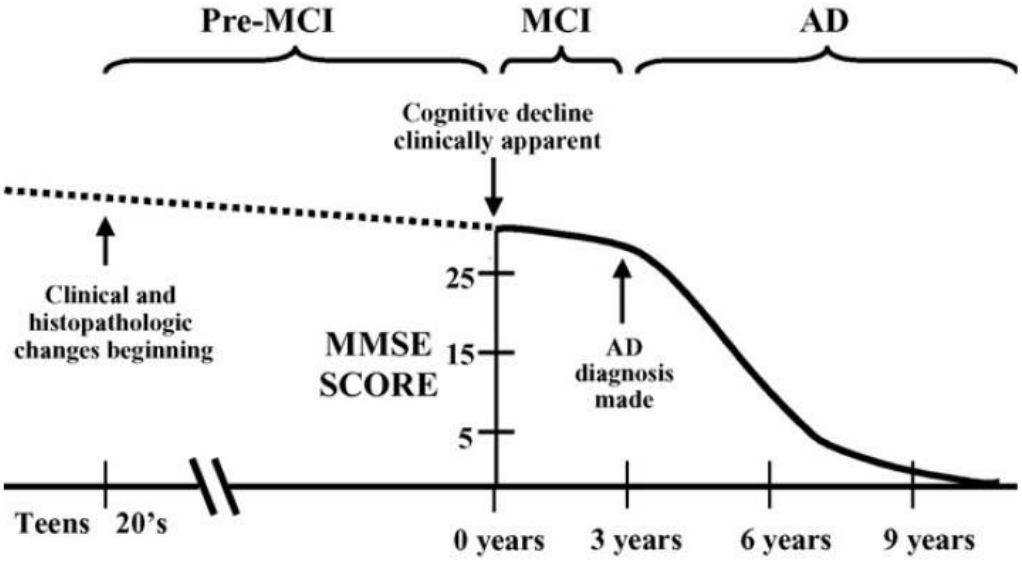


Figure 3 : Evolution du déclin cognitif chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer reflété par le score *Mini Mental State Examination* d'après Swerdlow, 2007

AD : *Alzheimer's Disease* (maladie d'Alzheimer) ; MCI : *Mild Cognitive Impairment* ; MMSE SCORE: score de *Mini Mental State Examination*.
AD diagnosis made : diagnostic de la maladie d'Alzheimer ; *clinical and histopathologic changes beginning* : début des changements cliniques et histopathologiques ; *cognitive decline clinically apparent* : déclin cognitif apparent au niveau clinique; *Teens 20's* : vingtaine d'années ; *years* : ans.

3. *Formes de la maladie d'Alzheimer*

Il existe deux formes connues de la MA : une forme sporadique et une forme familiale. La forme familiale ou forme précoce de la MA représente moins de 1% des cas (Blennow *et al.*, 2006). Elle peut survenir entre 30 et 65 ans, mais plus souvent entre 40 et 50 ans (Swerdlow, 2007). La forme familiale a un mode de transmission autosomique dominant. Des mutations sur trois gènes sont connues pour augmenter la production du peptide β-amyloïde (Aβ) dérivé de la protéine APP (*Amyloid Precursor Protein*) et pour être à l'origine de cette forme : le gène APP sur le chromosome 21, préséniline 1 sur le chromosome 14 et préséniline 2 sur le chromosome 1 (Goate *et al.*, 1991; Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). Il existe une autre forme de la MA dite « jeune », très marginale, pour laquelle aucun gène responsable n'a été identifié jusqu'à présent (Ngatcha-Ribert, 2004). La forme sporadique représente la majorité des cas de la MA et apparaît vers 65 ans. Le premier facteur de risque de cette forme de la MA est l'âge, avec une augmentation exponentielle de la prévalence avec l'âge (Swerdlow, 2007).

C. Acteurs moléculaires de la maladie d'Alzheimer

La MA est caractérisée par deux lésions au niveau du cerveau associées à une perte neuronale et synaptique importante : des plaques amyloïdes et des enchevêtrements ou dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Ces lésions sont formées par des agrégats insolubles de protéines : les plaques amyloïdes sont formées d'agrégats du peptide Aβ et les DNF sont composées de la protéine Tau hyperphosphorylée. Les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à ces deux types de lésions sont décrits dans ce paragraphe.

1. *La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires*

Tau est une protéine associée aux microtubules codée par le gène MAPT situé sur le chromosome 17 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 fœtale » 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 (Arendt *et al.*, 1998; Swerdlow, 2007; Liu and Götz, 2013). Le domaine C-terminal de la protéine Tau s'associe aux protéines α- et β-tubuline pour assembler les microtubules et réguler le transport axonal. La protéine Tau non phosphorylée joue un rôle critique dans la signalisation neuronale et le fonctionnement cellulaire normal puisqu'elle participe au transport axonal des organites cellulaires, des métabolites et des neurotransmetteurs (Weingarten *et al.*, 1975; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Nisbet *et al.*, 2015).

L'isoforme la plus longue de cette protéine contient 85 sites potentiels de phosphorylation dont 45 sérines, 35 thréonines et 5 tyrosines. La phosphorylation de Tau est régulée par un équilibre entre les activités de kinases et de phosphatases. Les kinases principales impliquées dans la phosphorylation de Tau sont CDK5 (*Cyclin-Dependent Kinase*), GSK3β *(Glycogen Synthase Kinase)* et ERK2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) (Arendt *et al.*, 1998; Ballard *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). La protéine Tau peut se phosphoryler de façon excessive dans certaines pathologies dont la MA, ce qui serait dû à une augmentation de l'activité kinase, une diminution de l'activité phosphatase, ou une combinaison des deux (Billingsley and Kincaid, 1997; Gong *et al.*, 2000). L'hyperphosphorylation de Tau induit une accumulation anormale de Tau dans le corps cellulaire et les dendrites et augmente sa capacité à s'assembler en filaments hélicoïdaux appariés. Ces filaments hélicoïdaux de Tau constituent les DNF que l'on retrouve chez les patients atteints par la MA. De plus, l'hyperphosphorylation de Tau 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 4) (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Kosik, 1990; Iqbal *et al.*, 1994; Velasco *et al.*, 1998; Nisbet *et al.*, 2015).

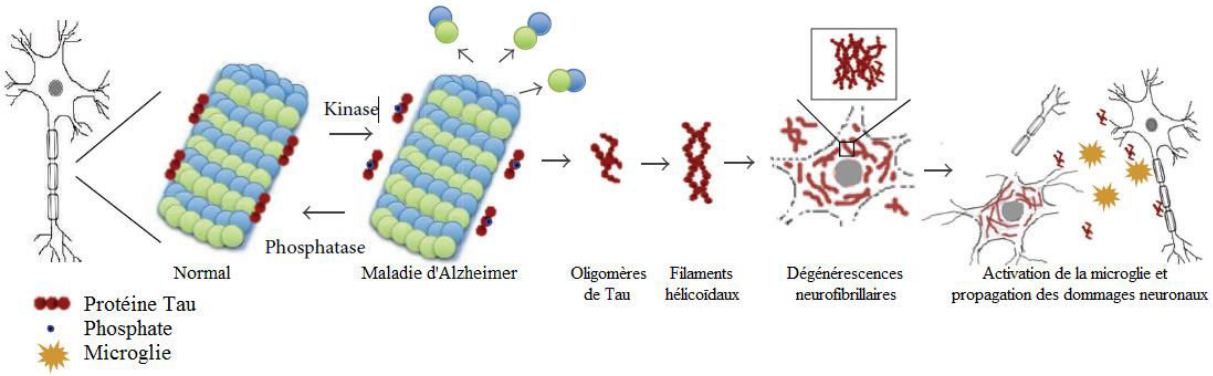


Figure 4 : Stabilité des microtubules, hyperphosphorylation de Tau et dégénérescences neurofibrillaires d'après Mokhtar et al., 2013

Dans les conditions physiologiques, la protéine Tau, non phosphorylée, stabilise les microtubules.
Dans la maladie d'Alzheimer, 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. Celles-ci 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.

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. Ainsi, le taux de DNF et leur localisation peuvent être corrélés avec l'évolution des symptômes de la MA. Les DNF peuvent être à l'origine d'altérations progressives des neurones (Braak and Braak, 1995, 1997; Silverman *et al.*, 1997).

Des études montrent que l'hyperphosphorylation de Tau et les DNF sont fortement liées à la cascade amyloïde décrite ci-après.

2. Le peptide β-amyloïde et les plaques amyloïdes

2.1. APP et libération du peptide Aβ

Le peptide Aβ provient du clivage de la protéine APP qui est une protéine transmembranaire et ubiquitaire concentrée surtout dans les synapses. Elle est impliquée dans l'adhésion cellulaire, dans la croissance des axones et des neurites, dans la migration cellulaire et dans la formation de synapses. La partie C-terminale de la protéine APP joue un rôle important dans l'expression des gènes et la survie des cellules neuronales. Les différentes fonctions de la protéine APP nécessitent que la

protéine soit présente sous forme non clivée mais également sous forme clivée (Allinquant *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 2003; Priller *et al.*, 2006; Zheng and Koo, 2006; Wesson *et al.*, 2011; Mokhtar *et al.*, 2013).

Le clivage de la protéine APP se fait par deux voies différentes : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique. Dans la voie non-amyloïdogénique, qui est la voie la plus courante dans les conditions physiologiques, APP est clivée dans un premier temps par une α-sécrétase qui appartient à la famille des *A Disintegrin And Metalloproteinase* (ADAM). Trois membres de cette famille ont une activité α-sécrétase : ADAM17, ADAM9 et ADAM10, et seule ADAM10 est essentielle pour le clivage α-sécrétase de la protéine APP. Ce clivage protéolytique libère le fragment sAPPα qui possède des effets neurotrophiques, neuroprotecteurs et d'amélioration de la mémoire. Le fragment C-terminal restant (C83) est ensuite clivé par une γ-sécrétase et libère le peptide P3 et le domaine intracellulaire d'APP ou *APP Intracellular Domain* (AICD) (Figure 5) (Esch *et al.*, 1990; Buxbaum *et al.*, 1998; Allinson *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2010). Dans la voie amyloïdogénique, la partie N-terminale d'APP est clivée par la β-sécrétase principale BACE1 (*Beta Site APP Cleaving Enzyme*) et libère le fragment sAPPβ qui, contrairement au fragment sAPPα, n'a aucun effet neuroprotecteur et jouerait même un rôle dans la mort neuronale. BACE1 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) sous forme immature et inactive, puis subit une maturation lors du transport vers la surface cellulaire. Comme dans la voie non-amyloïdogénique, le fragment C-terminal (C99) est ensuite coupé par la γ-sécrétase pour libérer le peptide Aβ et le fragment AICD (Figure 5) (Seubert *et al.*, 1993; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Capell *et al.*, 2000; Zheng and Koo, 2006; Zhang *et al.*, 2011). Il existe une compétition entre l'α-sécrétase et la β-sécrétase qui ont toutes les deux la protéine APP comme substrat. En effet ces deux enzymes ont des effets opposés : la β-sécrétase induit la production d'Aβ contrairement à l'α-sécrétase qui diminue sa production. Dans le cas de la MA, la balance entre les voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique est déplacée en faveur de la production d'Aβ. Une diminution d'ADAM10 et sAPPα a été montrée chez les patients Alzheimer,

ce qui reflète une altération de la voie non-amyloïdogénique. Outre l'augmentation de la production d'Aβ, sa clairance est diminuée chez les patients atteints par la MA, ce qui contribue également à une présence excessive du peptide Aβ dans la MA (Buxbaum *et al.*, 1998; Colciaghi *et al.*, 2002; Mawuenyega *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013b; Soldano and Hassan, 2014).

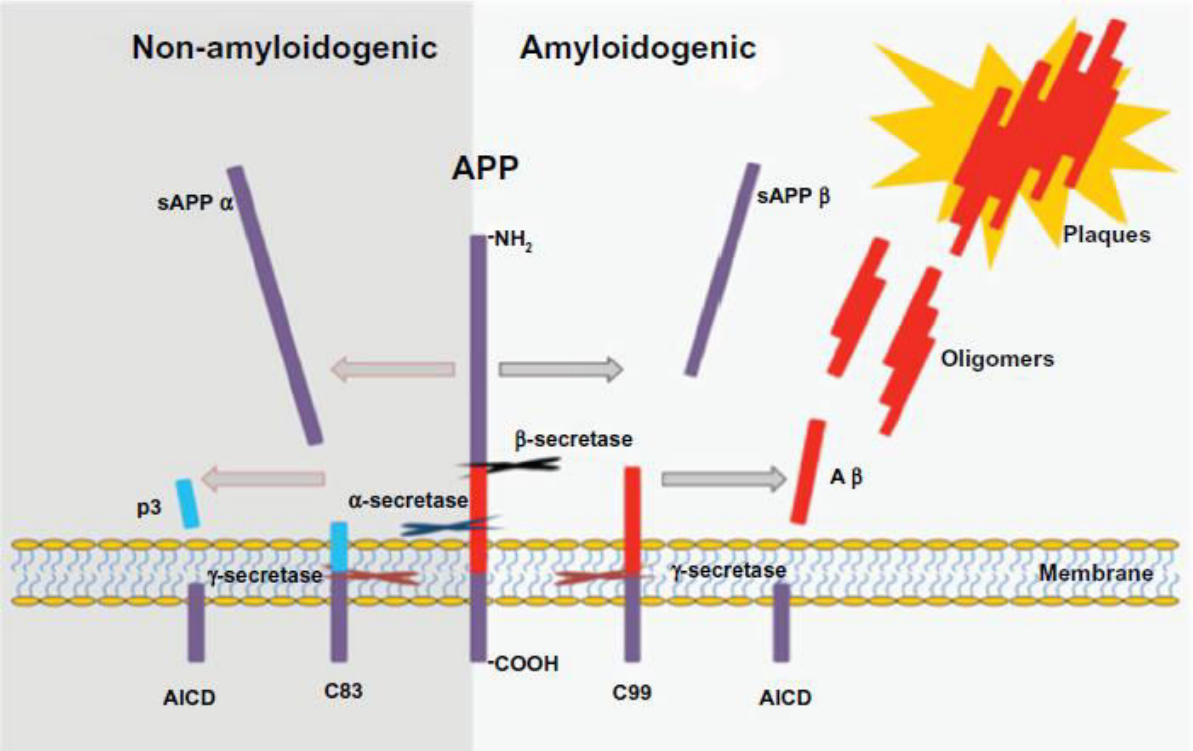


Figure 5 : Clivage protéolytique de la protéine *Amyloid Precursor Protein* par les enzymes α-, β- et γ-sécrétase : voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique d'après Chen et al., 2013b

AICD : *APP intracellular domain* ; APP : *Amyloid Precursor Protein ;* sAPPα et sAPPβ : fragments N-terminaux de la protéine APP

2.2. Formes du peptide Aβ

Le peptide Aβ est constitué de 39 à 43 acides aminés. La forme $A\beta_{1-40}$ est la forme la plus fréquente (environ 90%) et la forme $A\beta_{1-42}$, qui est la plus toxique, représente environ 10% des peptides Aβ présents *in vivo*. Dans les phases précoces de la MA, le ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ est déplacé en faveur du peptide $A\beta_{1-42}$ induisant une stabilité des espèces toxiques. Le peptide Aβ hydrophobe s'agrège pour former des dimères puis des oligomères et des fibrilles qui s'assemblent pour former des dépôts sphériques appelés plaques amyloïdes que l'on retrouve dans le cerveau des patients

atteints par la MA (Figure 5). Ces plaques subissent une maturation au cours de leur évolution : les plaques les moins matures sont qualifiées de plaques diffuses et sont formées d'agrégats amorphes et peu denses de peptides Aβ tandis que les plaques matures contiennent des agrégats très denses de peptide Aβ et sont associées à des phénomènes de neurodégénérescence et de réactivité astrogliale (Glenner and Wong, 1984; Spillantini *et al.*, 1990; Nisbet *et al.*, 2015).

Les oligomères du peptide Aβ peuvent aussi se trouver dans le plasma, le liquide céphalorachidien (LCR) et le cerveau des patients Alzheimer. On retrouve l'Aβ soluble dans les cerveaux sains mais en quantité six fois plus faible que dans le cerveau d'un patient Alzheimer (Kuo *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997). Plusieurs études ont démontré que c'est sous cette forme que le peptide Aβ est le plus toxique : un excès d'oligomères solubles du peptide Aβ induit une synaptotoxicité et une altération du réseau neuronal associées à une neuroinflammation et oxydation (Wesson *et al.*, 2011).

2.3. Peptide β-amyloïde et fonctions synaptiques

La première cible de la toxicité induite par l'Aβ est la synapse, et notamment le compartiment postsynaptique. La diminution de la densité synaptique est l'observation neuropathologique la plus corrélée avec le degré de démence dans la MA. En effet la perte synaptique est à l'origine du dysfonctionnement cognitif et survient de façon précoce dans l'hippocampe et le cortex. L'hippocampe est la structure cérébrale la plus affectée par la perte de protéines synaptiques tandis que le cortex occipital est la région la moins touchée. La sévérité des troubles cognitifs et l'altération de la fonction synaptique sont hautement corrélées avec le taux cortical des oligomères solubles du peptide Aβ aussi bien chez les patients que dans les modèles animaux de la MA. La perte synaptique n'est pas seulement due à la mort neuronale mais également au fait que les neurones perdent leur fonction synaptique. En effet, les oligomères de peptide Aβ secrétés par la cellule impactent les fonctions cognitives et le comportement en inhibant la réorganisation des synapses qui permettent l'apprentissage et la consolidation

de la mémoire. Les oligomères du peptide Aβ agissent également sur la fonctionnalité de la synapse : ils inhibent la LTP et induisent la LTD ce qui perturbe la transmission synaptique impliquée dans la mémorisation à long terme (Arendt *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Selkoe, 2002, 2008; Shankar *et al.*, 2008; Mokhtar *et al.*, 2013).

Les oligomères du peptide Aβ induisent le dysfonctionnement des synapses glutamatergiques en perturbant les récepteurs ionotropiques au glutamate. Ils potentialiseraient les NMDA-R extrasynaptiques et induiraient un flux calcique vers l'intérieur du neurone (Figure 6) (Bordji *et al.*, 2010; Dinamarca *et al.*, 2012; Kervern *et al.*, 2012). L'implication respective des deux sous-unités NR2A et NR2B des NMDA-R est discutée, certains auteurs attribuant un rôle critique à la sous-unité NR2A (Tackenberg *et al.*, 2013) et d'autres mettant en avant NR2B (Kervern *et al.*, 2012). Ce flux calcique entrant diminue la phosphorylation des AMPA-R synaptiques par la kinase II dépendante de la calmoduline liant le calcium et induit leur internalisation (Figure 6) (Zhao *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2006). La disparition des AMPA-R au niveau de la synapse, conjuguée à l'action des NMDA-R, résulte en une diminution de la LTP, une apparition de la LTD avec une perte des épines dendritiques, une diminution des protéines postsynaptiques importantes pour la structure de la synapse comme PSD95 (*Postsynaptic Density Protein* 95) puis une disparition de la synapse. Certains auteurs ont suggéré que l'action des oligomères de peptides Aβ sur les NMDA-R serait indépendante du flux calcique et donc de nature métabotropique, mais ces auteurs concluent à la même résultante sur l'induction d'une LTD (Tamburri *et al.*, 2013). Le glutamate pourrait provenir des astrocytes dont les récepteurs α7 nicotiniques seraient activés par les oligomères de peptide Aβ. Cela entrainerait un flux calcique entrant à l'intérieur du cytosol astrocytaire et la sécrétion de glutamate, activateur des NMDA-R neuronaux (Figure 6) (Talantova *et al.*, 2013). Enfin, l'activation des NMDA-R et l'inhibition des AMPA-R peuvent orienter le métabolisme de la protéine APP vers la production de peptide Aβ, favorisant ainsi l'évolution de la MA.

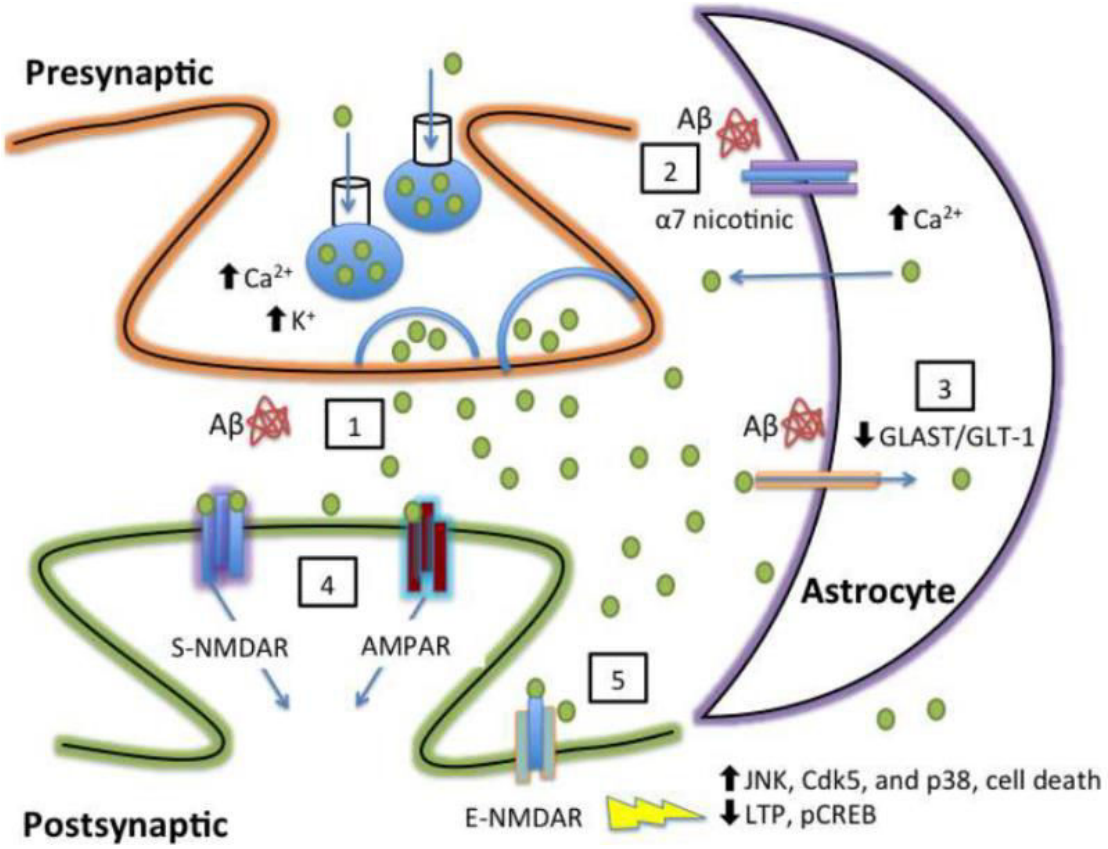


Figure 6 : Augmentation de la libération de glutamate médiée par le peptide β-amyloïde et excitotoxicité résultante d'après Rudy et al., 2015

1) Le peptide β-amyloïde (Aβ) augmente la libération présynaptique de glutamate.
2) Le peptide Aβ élève le calcium astrocytaire *via* la stimulation du récepteur nicotinique astrocytaire α7. Cela résulte en une libération du glutamate par des mécanismes inconnus.
3) Le peptide Aβ diminue la clairance du glutamate et prolonge le séjour du glutamate dans la synapse résultant en une diffusion du glutamate vers les astrocytes voisins.
4) L'activation prolongée des récepteurs N-methyl-D-aspartate (NMDA-R) et des récepteurs α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA-R) résulte en une augmentation du glutamate extracellulaire pouvant induire une internalisation des AMPA-R, résultant en une dépression synaptique.
5) Le glutamate active les récepteurs NMDA-R, résultant en une série d'évènements délétères pour la cellule dont la mort cellulaire.

Plus récemment les auteurs se sont intéressés à des mécanismes de toxicité des oligomères de peptide Aβ impliquant des composantes des récepteurs mGlu. Ainsi, les oligomères de peptide Aβ inhibent, dans les neurones du cortex préfrontal, la régulation des NMDA-R par le récepteur mGlu7 qui passe par des kinases dépendantes de p21 (Gu *et al.*, 2014). Cette inhibition de mGluR7 aboutit à l'induction d'un flux calcique entrant dans le neurone. Plusieurs travaux ont établi que le récepteur mGluR5 est un corécepteur avec la protéine prion pour les oligomères de peptide Aβ (Um *et al.*,

2013; Haas *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2014, 2015). Le récepteur mGluR5 formerait un complexe avec la protéine prion qui activerait, en présence d'oligomères de peptide Aβ, les phospholipases C (PLC) de type β par l'intermédiaire de la protéine Gαq couplée à mGluR5. L'activation de cette voie de signalisation aboutit à l'activation de la kinase Fyn.

Le peptide Aβ est un élément critique dans la pathogénèse de la MA. Voyons maintenant en quoi la cascade amyloïde est associée à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.

3. Comment Tau et β-amyloïde interagissent-t-ils ?

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de Tau dans la cascade amyloïde. Cependant les interactions entre Tau et Aβ ne sont pas complétement identifiées : trois hypothèses sont possibles. Des études *in vivo* ont montré qu'un excès d'Aβ dans le cerveau augmente le taux d'hyperphosphorylation de Tau et amplifie les DNF. À l'inverse, une immunothérapie dirigée contre le peptide Aβ diminue l'hyperphosphorylation de Tau. Cela laisse à penser que la cascade amyloïde est à l'origine de la toxicité induite par l'hyperphosphorylation de Tau : les enzymes β- et γ-sécrétases libèrent le peptide Aβ à partir d'APP qui forme des oligomères. La toxicité des oligomères Aβ induirait l'hyperphosphorylation de Tau, elle-même à l'origine des DNF et de la toxicité neuronale. Des études ont proposé plusieurs kinases qui seraient impliquées dans cette hyperphosphorylation, comme par exemple Cdk5, mais aucune n'a été confirmée (Figure 7) (Lewis *et al.*, 2001; Götz *et al.*, 2004a; Terwel *et al.*, 2008).

Il a également été montré que Tau et Aβ agissent sur différents composants du même système. Par exemple, Tau agit sur le complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale tandis que l'Aβ agit sur le complexe IV. Ils induisent tous les deux des dysfonctionnements de la respiration mitochondriale. Les deux protéines agissent de façon synergique en amplifiant la toxicité (Rhein *et al.*, 2009).

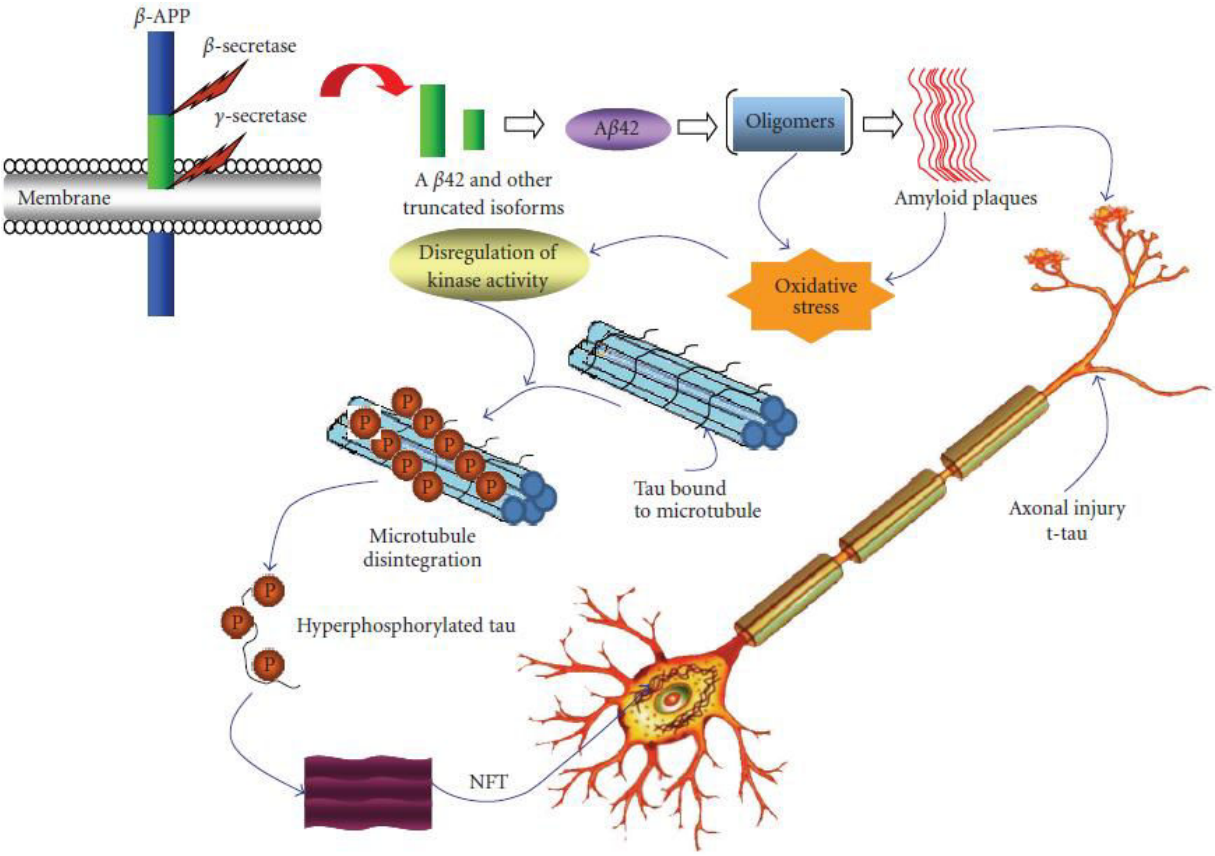


Figure 7 : Cascade pathologique de la maladie d'Alzheimer d'après Anoop *et al.*, 2010

Aβ42 and other truncated isoforms : peptide β-amyloïde1-42 et autres formes tronquées ; *amyloid plaques* : plaques amyloïdes ; *axonal injury t-tau* : lésion axonale induite par Tau ; *disregulation of kinase activity* : déréglement de l'activité kinase ; *hyperphosphorylated tau* : Tau hyperphosphorylée ; *microtubule disintegration* : déstructuration des microtubules ; *NFT* : enchevêtrements neurofibrillaires ; *oligomers* : oligomères du peptide Aβ ; *oxidative stress* : stress oxydant ; *Tau bound to microtubule* : fixation de Tau aux microtubules

Enfin, certaines études montrent que Tau a un rôle intermédiaire dans la toxicité induite par le peptide Aβ. La protéine Tau interagit avec la protéine kinase Fyn par son domaine de projection. Lorsque Tau est phosphorylée, elle s'accumule au niveau postsynaptique dans les dendrites où elle interagit avec Fyn. Une fois liée à Tau, la protéine Fyn phosphoryle la sous-unité 2B du NMDA-R qui se lie alors à la protéine PSD95. Le complexe NMDA-R/PSD95 est nécessaire pour induire une excitotoxicité et donc la sensibilité au peptide Aβ par l'intermédiaire du NMDA-R. Lorsque Tau est hyperphosphorylée, le complexe NMDA-R/PSD95 se forme de façon excessive et augmente la sensibilité au peptide Aβ. C'est ainsi par l'intermédiaire de la protéine Tau

via sa fixation à Fyn que l'Aβ induit une toxicité neuronale (Figure 8) (Lee *et al.*, 1998; Ittner *et al.*, 2010; Ittner and Götz, 2011; Nisbet *et al.*, 2015).

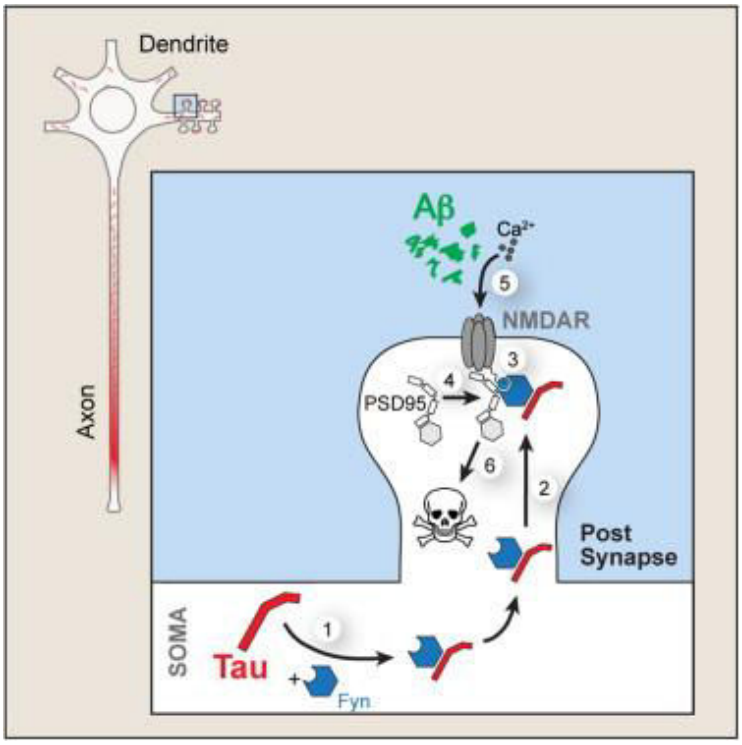


Figure 8 : Activation de l'excitotoxicité du récepteur au N-methyl-A-asparate induite par le peptide β-amyloïde suite à l'interaction des protéines Tau et Fyn d'après Ittner *et al.*, 2010

1) La protéine Tau interagit avec la protéine Fyn dans le corps cellulaire (soma) au niveau de la dendrite.
2) Le complexe Tau/Fyn se dirige vers l'épine dendritique.
3) Le complexe Tau/Fyn phosphoryle le récepteur N-methyl-A-asparate (NMDA-R).
4) NMDA-R se fixe au *Postsynaptic Density Protein 95* (PSD95).
5) Le complexe NMDA-R/PSD95 induit une excitotoxicité et sensibilise au peptide β-amyloïde (Aβ).

Dans la MA, ces différents processus de neurodégénérescence s'associent à des perturbations de l'environnement neuronal. L'inflammation chronique du SNC, que nous décrivons dans le paragraphe suivant, est un processus complexe étroitement lié à la MA. Une altération de l'homéostasie du calcium et la génération excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont aussi observées dans la MA.

D. La neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer

La neuroinflammation est l'activation du système immunitaire inné du cerveau. Sa fonction principale est de protéger le SNC contre les infections, les blessures et les maladies. Les récepteurs de l'immunité innée ou *Pattern-Recognition Receptors*

reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes exogènes et les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires. Ces récepteurs sont des récepteurs de type *Toll* ou des récepteurs *scavenger*. Cette défense est régulée par ces PPR, les phagocytes, le système de complément, les cytokines et les chémokines pour contrer l'infection ou la blessure et maintenir l'homéostasie des tissus. La réponse inflammatoire aigüe dans le SNC est causée par l'activation immédiate et innée des cellules gliales en réponse à un stimulus. Si ce stimulus persiste dans le temps, l'altération du SNC est cumulative et la réaction inflammatoire devient chronique. La neuroinflammation peut entrainer la mort des neurones environnants (Figure 9). Dans le cas de la MA, la réponse neuroinflammatoire se manifeste dans la phase précoce de la maladie, avant la perte neuronale (Streit *et al.*, 2004; Shastri *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2014).

1. Les cellules gliales

La réponse immunitaire innée du cerveau est assurée par deux types cellulaires propres au SNC : les astrocytes et les cellules microgliales qui sont inactives à l'état physiologique. En cas d'altération au niveau du SNC, ces cellules gliales sont activées par des stimuli. La microglie et les astrocytes jouent un rôle crucial dans l'immunité innée et leur activation est à l'origine de la libération d'acteurs pro-inflammatoires et d'éléments cytotoxiques (Figure 9). Ils reconnaissent l'Aβ fibrillaire grâce au récepteur *Toll* et perçoivent les oligomères et les fibrilles d'Aβ comme des corps étrangers, ces assemblages de peptide Aβ n'ayant jamais été rencontrés lors du développement du cerveau. Ces deux types cellulaires sont abondants dans l'environnement des plaques amyloïdes et des DNF que l'on retrouve dans la MA (Haga *et al.*, 1989; Mrak *et al.*, 1996; Simard *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2013; Hardy *et al.*, 2014).

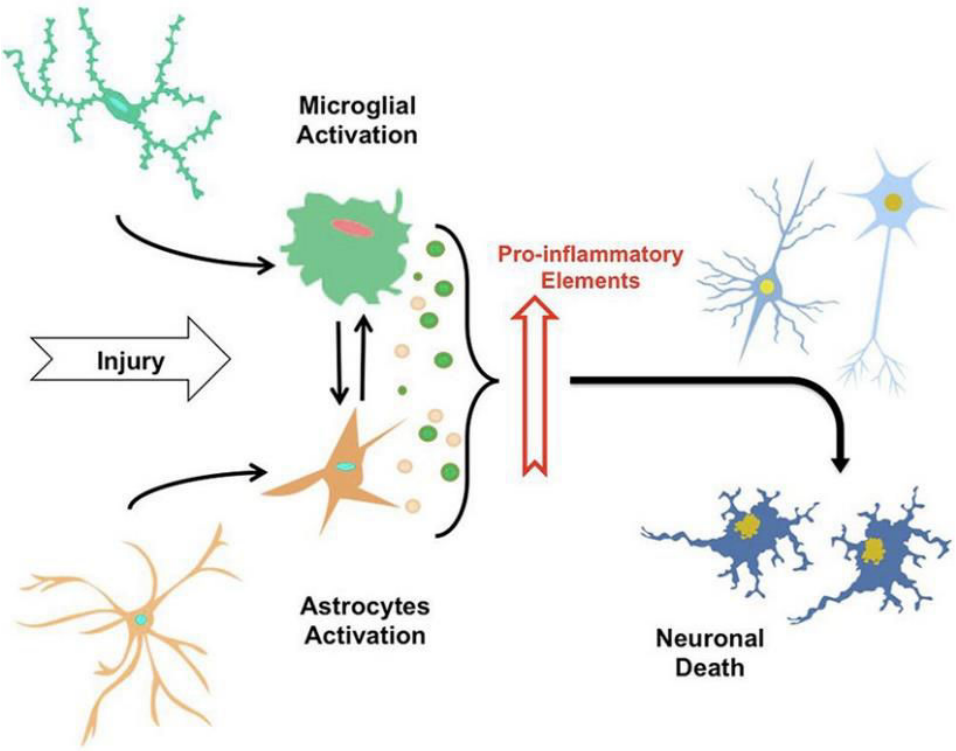


Figure 9 : Le processus neuroinflammatoire suite à une altération du cerveau d'après Morales et al., 2014

Une altération du cerveau induit l'activation des cellules microgliales et des astrocytes. Ces cellules libèrent des facteurs pro-inflammatoires qui peuvent être à l'origine d'une mort neuronale.

1.1. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC et représentent 25% du volume cérébral. On retrouve ces cellules dans toutes les régions du SNC mais leur morphologie est hétérogène selon l'endroit où elles se trouvent et ces différents types d'astrocytes induisent aussi des réactions différentes. Ce sont des cellules gliales spécialisées qui ont des fonctions variées : elles sont impliquées dans la synaptogenèse, la neurotransmission, l'élimination de toxiques et débris à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE), la régulation métabolique et la régulation de la balance des ions. Pendant la transmission synaptique, les astrocytes maintiennent l'homéostasie et le renouvellement du glutamate : 20% du glutamate passe dans le neurone, et le reste se dirige vers les astrocytes périsynaptiques. Ainsi le glutamate est éliminé par les astrocytes afin de prévenir l'excitotoxicité (Sherwood *et al.*, 2006; Verkhratsky *et al.*, 2010; Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011; Molofsky *et al.*, 2012; Zhang and Jiang, 2015).

Dans la MA, les astrocytes forment une barrière entre les neurones et les dépôts amyloïdes. Ils jouent aussi un rôle important dans la clairance et la dégradation de l'Aβ. Ils peuvent exprimer des protéines de dégradation de l'Aβ telles que la *matrix metalloproteinase* et la néprilysine. Mais pendant la neuroinflammation, les astrocytes subissent une transformation et acquièrent la capacité à générer l'Aβ. En effet ils expriment 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 Aβ. Lorsque les astrocytes sont exposés à des taux d'Aβ élevés pendant une longue période, ils perdent leur capacité à éliminer l'Aβ (Apelt *et al.*, 2003; Rossner *et al.*, 2005; Tang, 2009; Miners *et al.*, 2010; Thal, 2012).

Les astrocytes sont organisés en réseau et communiquent entre eux par des jonctions communicantes très nombreuses (Abbott *et al.*, 2006). Au niveau des vaisseaux cérébraux, ces jonctions sont serrées et les astrocytes interagissent avec les cellules endothéliales participant ainsi au maintien de la BHE qui joue un rôle crucial dans le maintien du système nerveux périphérique et dans l'homéostasie du SNC (Abbott *et al.*, 2006). Dans la MA, les cytokines inflammatoires induisent une perte des jonctions serrées et donc une perte de l'intégrité de la BHE. L'altération de la BHE et l'Aβ induisent mutuellement leurs effets : un dysfonctionnement de la BHE compromet la clairance d'Aβ ce qui provoque l'accumulation d'Aβ. Cette accumulation aggrave les atteintes des jonctions serrées et altère encore plus la BHE. Dans la MA, la BHE est plus vulnérable à l'inflammation (Steinman, 2013; Takeda *et al.*, 2013).

1.2. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales représentent 5 à 10% des cellules totales du SNC et se trouvent dans le cerveau, la moelle épinière, la rétine et le nerf optique. Elles sont abondantes dans l'hippocampe et la substance grise. Ces cellules ont un rôle clé dans le développement embryonnaire : elles peuvent sécréter des facteurs de croissance importants pour former le SNC et contribuent à la maturation, la régénération et la plasticité neuronale. Dans les conditions physiologiques, les cellules microgliales matures

sont inactives et ont une morphologie ramifiée (Hanisch and Kettenmann, 2007; Venneti *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2014).

En cas d'atteinte du SNC, les cellules microgliales sont activées lorsqu'elles détectent des signaux tels que des résidus de bactéries, de virus ou de champignons, des protéines endogènes anormales, des facteurs du complément, des anticorps, des cytokines ou des chémokines. Elles subissent alors un changement morphologique : le corps cellulaire devient plus large et la cellule prend une forme amiboïde (Figure 9). Elles ont alors une action de phagocytose détruisant les pathogènes et éliminant les débris délétères pour promouvoir la réparation des tissus et l'homéostasie. De nombreuses cellules de la microglie sont des cellules présentatrices d'antigènes et sont ainsi des cellules de l'immunité innée très spécifique. L'activation de la microglie induit rapidement une libération de cytokines ainsi que de chémokines et peut être à l'origine de la sécrétion de substances potentiellement cytotoxiques telles que les ERO, des dérivés de l'ARA, des cytokines ou des acides aminés excitatoires. Ainsi la microglie est la source principale de facteurs pro-inflammatoires dans le cerveau. La réponse microgliale dépend du type, de l'intensité et du contexte du stimulus. C'est un processus qui s'adapte au microenvironnement et se reconstruit continuellement, permettant à la microglie d'explorer l'environnement cérébral en quelques heures sans perturber la structure des neurones voisins (Olson and Miller, 2004; Block *et al.*, 2007; Colton and Wilcock, 2010; Harry and Kraft, 2012; Morales *et al.*, 2014; Zhang and Jiang, 2015). La microglie est fortement activée dans la MA bien avant la formation de plaques amyloïdes. L'Aβ fibrillaire et la protéine Tau phosphorylée activent la microglie induisant une réponse immunitaire et la libération de cytokines neurotoxiques. La microglie peut aussi interagir avec le peptide Aβ pour activer BACE1 et la γ-sécrétase, augmentant ainsi la production d'Aβ qui, à son tour, augmente la prolifération de la microglie. L'activation de la microglie est ainsi impliquée dans la mort neuronale et les déficits cognitifs dans la MA, et est associée aux dépôts d'Aβ. Les cellules microgliales jouent aussi un rôle dans la neuroprotection et dans l'élimination du peptide Aβ en secrétant des enzymes protéolytiques qui le dégradent comme l'*insulin-degrating*

enzyme, la *matrix metalloproteinase* ou la *plasminogen-plamin complexe* (Leissring *et al.*, 2003; Hanisch and Kettenmann, 2007; Rodríguez *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2014).

Dans la MA, ces capacités neuroprotectrices de la microglie seraient dépassées par l'accumulation de peptide Aβ. De plus, avec l'âge, la microglie perdrait sa capacité à phagocyter l'Aβ, ce qui diminuerait sa dégradation. L'activation de la microglie diminuerait progressivement dans la phase tardive de la MA avec la formation de plaques amyloïdes. Le rôle de la microglie serait différent selon les stades de la MA (Scheffler *et al.*, 2011; Zhang and Jiang, 2015).

2. Les médiateurs de l'inflammation

2.1. Les chémokines

Les chémokines agissent par chimiotactisme pour réguler la migration de la microglie ainsi que le recrutement des astrocytes lors de la neuroinflammation. Elles sont responsables de l'étendue de l'inflammation locale. Dans la MA, les chémokines et leurs récepteurs sont surexprimés au niveau du cerveau. Les chémokines jouent un rôle important dans le recrutement des cellules gliales vers le site des dépôts amyloïdes (Xia and Hyman, 1999; Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012).

2.2. Les cytokines

Les cytokines font partie des médiateurs de l'inflammation produits par les cellules gliales lors de leur activation. Elles agissent sur les cellules par l'intermédiaire d'un récepteur pour réguler leurs fonctions. Il existe plusieurs sortes de cytokines anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires, dont certaines sont impliquées dans la MA. Un phénomène de sélection entre les cytokines anti- et pro-inflammatoires permettant l'équilibre entre elles et la régulation de l'inflammation a été mis en évidence (Guerreiro *et al.*, 2012). Ce phénomène pourrait être impliqué dans la neuroinflammation observée dans la MA.

a) Les cytokines pro-inflammatoires

Le *Tumor Necrosis Factor* α (TNFα) joue un rôle central dans la cascade de production des cytokines lors de la réponse inflammatoire : les cellules gliales activées sécrètent le TNFα qui active à son tour les cellules de manière endocrine pour augmenter la production de cytokines. Dans les conditions physiologiques, le TNFα se trouve en faible quantité dans le cerveau mais la régulation de la production de TNFα est altérée dans la MA. En effet, dans la phase précoce de la MA, la quantité TNFα est augmentée chez les patients par rapport aux sujets sains du même âge. L'excès de TNFα augmente l'expression de BACE1 et l'activité de la γ-sécrétase, ayant pour conséquence une augmentation de la production d'Aβ (Yamamoto *et al.*, 2007; Zhang and Jiang, 2015).

Les interleukines (IL) sont des initiateurs importants de la réponse immunitaire. Elles agissent au début de la cascade inflammatoire. Comme les autres cytokines, elles sont sécrétées par les cellules gliales activées. L'IL-1 est une cytokine produite par la microglie. De la même façon que le TNFα, elle active à son tour les cellules gliales pour induire une production additionnelle d'IL-1 et la production de l'IL-6. L'isoforme IL-1β induit une production d'Aβ en modulant l'activité de la γ-sécrétase dans les neurones. La surproduction d'IL-1β augmente la synthèse de sAPPβ ainsi que la phosphorylation de Tau et l'apparition de DNF. IL-1β est donc impliquée dans la MA *via* la neuroinflammation, mais son mécanisme reste encore à déterminer (Ghosh *et al.*, 2013; Zhang and Jiang, 2015).

L'IL-6 est la cytokine majeure du SNC. Elle stimule et induit le recrutement des astrocytes et de la microglie pour libérer les cytokines pro-inflammatoires. Elle augmente la phosphorylation de la protéine Tau dans la MA (Raivich *et al.*, 1999; Quintanilla *et al.*, 2004; Erta *et al.*, 2012).

b) Les cytokines anti-inflammatoires

L'IL-10 est une des principales cytokines anti-inflammatoires. Elle joue un rôle important dans la survie cellulaire et l'homéostasie neuronale. Une exposition des

cellules gliales à l'IL-10 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires induites par l'Aβ mais l'IL-10 ne supprime pas les dépôts d'Aβ et ne parvient pas à induire la dégradation de l'$A\beta_{42}$. Dans le cas de la MA, la présence d'IL-10 dans les fluides périphériques est associée à l'atrophie du cerveau (Szczepanik *et al.*, 2001; Szczepanik and Ringheim, 2003; Leung *et al.*, 2013).

Le *Transforming Growth Factor* β (TGFβ) est également une cytokine anti-inflammatoire produite par plusieurs types cellulaires. Il est synthétisé comme précurseur inactif et doit être activé pour agir. Il intervient dans la synaptogenèse, la neurogénèse et la neuroprotection (Dobolyi *et al.*, 2012). Dans la neuroinflammation, il limite la production des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 et le TNFα. On retrouve des taux élevés de la forme TGFβ1 dans le plasma et le LCR ainsi que des niveaux élevés de l'expression de son ARNm avant l'apparition de démence chez les patients atteints par la MA (Zetterberg *et al.*, 2004; Motta *et al.*, 2007; Morimoto *et al.*, 2011).

3. La régulation de l'inflammation

La production et les effets neuroinflammatoires des cytokines font intervenir différentes cascades de signalisation et facteurs de transcription parmi lesquels figurent notamment la cascade des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) ainsi que les facteurs de transcription *Nuclear Factor* κB (NFκB) et *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* γ (PPARγ), eux aussi impliqués dans la MA.

Les MAPK participent à la régulation de la transcription, la biosynthèse des protéines, le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Cette famille de kinases comporte notamment les protéines ERK p42 et p44 ainsi que p38 et les JNK (*C-Jun N-ter Kinase*) (Krishna and Narang, 2008). Dans la MA, les JNK sont impliquées dans l'hyperphosphorylation de Tau, la régulation des oligomères du peptide Aβ et les déficits cognitifs (Sclip *et al.*, 2011; Orejana *et al.*, 2013). De plus, une accumulation d'Aβ induit l'activation des JNK qui, elles-mêmes, conduisent à la mort neuronale (Shoji *et al.*, 2000). Enfin, l'isoforme α de la MAPK P38 joue des rôles multiples dans

la MA selon le type cellulaire dans lequel elle est exprimée. La P38 microgliale joue un rôle majeur dans l'inflammation observée dans les cerveaux des patients atteints par la MA. La P38 astrocytaire régule l'excitotoxicité et la P38 neuronale induit la LTD affectant la plasticité synaptique, la phosphorylation de Tau et la formation de DNF (Munoz and Ammit, 2010).

NFκB est un facteur de transcription qui régule la production de cytokines. Dans les conditions basales, NFκB est un dimère de deux sous-unités p50 et p65. Il est immobilisé dans le cytosol par une sous-unité inhibitrice IκB. Celle-ci est phosphorylée puis dégradée par le protéasome (Zhang and Jiang, 2015). Une fois libéré, NFκB est alors transloqué dans le noyau où il va induire la transcription de gènes cibles impliqués dans la croissance des neurites ou à l'inverse dans l'apoptose neuronale (Mincheva-Tasheva and Soler, 2013). Dans la MA, NFκB est activé par la sécrétion des cytokines TNF et IL-1β, d'APP et d'Aβ (Barger and Mattson, 1996). Il est responsable de la surexpression du gène BACE1 entre autres, ce dernier induisant la production d'oligomères d'$A\beta_{1-42}$ (Valerio *et al.*, 2006; Buggia-Prevot *et al.*, 2008).

PPARγ appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones dont l'activité est régulée par les lipides et les métabolites des stéroïdes. Il contrôle l'expression des gènes liés à l'inflammation (Bensinger and Tontonoz, 2008). Dans les conditions physiologiques, PPARγ est peu exprimé dans le SNC. L'expression de PPARγ est élevée dans la MA (de la Monte and Wands, 2006). Son activation au niveau de la microglie permet de diminuer l'expression de cytokines inflammatoires et de gènes pro-inflammatoires contrebalançant leur induction par NFκB (Combs *et al.*, 2000; Zhang and Jiang, 2015).

La neuroinflammation est un processus très complexe mettant aussi en jeu d'autres acteurs moléculaires tels que les ERO ainsi que les dérivés de l'ARA que nous décrirons en détails dans la deuxième partie de cette synthèse bibliographique. Le rôle de la neuroinflammation dans la MA nécessite d'être précisé mais il est évident que c'est un processus important dans cette pathologie. Il a d'ailleurs été montré dans des études rétrospectives que les traitements anti-inflammatoires pouvaient avoir un effet

bénéfique dans la MA. Chez l'Homme, un traitement à long terme avec un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) est associé à une diminution du risque de développer la MA ainsi qu'une progression plus lente de la MA. Dans les modèles animaux de la MA, que nous aborderons dans le paragraphe suivant, des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (COX) -1 ont montré une amélioration des déficits de mémoire et une diminution des dépôts amyloïdes et de la phosphorylation de Tau (Choi *et al.*, 2013). L'ibuprofène a également permis de diminuer les plaques amyloïdes et les marqueurs de la neuroinflammation (Rich *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 2000).

E. Les modèles animaux

Les modèles animaux ont pour but d'étudier les maladies humaines pour comprendre leur mécanisme, trouver des cibles thérapeutiques et tester des médicaments dirigés contre ces maladies. Bien souvent, les modèles ne parviennent pas à reproduire les symptômes tout en mimant le mécanisme complet de la pathologie, il faut choisir entre ces différents aspects et utiliser le modèle le plus pertinent pour les objectifs de l'étude.

Dans le cas de la MA, quelques espèces développent de manière spontanée des plaques amyloïdes et une pathologie liée à Tau qui peuvent être accompagnées d'un déclin cognitif, mais ces espèces sont peu utilisées en recherche pour des raisons de disponibilité, d'économie et d'éthique. Parmi ces modèles spontanés, le chien représente un modèle intéressant pour les maladies neurodégénératives, et pour la MA en particulier. En effet, le chien produit une forme d'Aβ_{1-42} identique à la forme humaine et a été utilisé en recherche préclinique pour étudier des régimes antioxydants, l'immunothérapie anti-amyloïde et l'enrichissement comportemental (Cotman and Head, 2008; Sarasa and Pesini, 2009). Les rongeurs représentent l'essentiel des animaux utilisés en recherche mais ne développent pas les spécificités histopathologiques de la MA. C'est pourquoi des modèles de la MA ont été créés par les chercheurs pour pouvoir étudier cette pathologie sur les rongeurs. Certains modèles ont été induits par des lésions de régions spécifiques du cerveau impliquées dans la MA comme

l'hippocampe ou certaines régions du cortex. Ces modèles ont permis d'élargir nos connaissances sur les mécanismes neurologiques liés aux altérations de la mémoire (Gray and McNaughton, 1983; Glenn *et al.*, 2003; Sloan *et al.*, 2006). Les perturbations des neurotransmetteurs jouent un rôle important dans la physiopathologie de la MA. En effet, des perturbations des récepteurs de type cholinergiques ont été induites de manière pharmacologique par un antagoniste, la Scopolamine, ce qui a permis d'augmenter les connaissances sur cet aspect de la MA (Sunderland *et al.*, 1986; Ebert and Kirch, 1998). Enfin, des modèles ont été induits chimiquement pour mimer les aspects inflammatoires, métaboliques et neurodégénératifs de la MA. Par exemple, la perfusion de lipopolysaccharides ou de cytokines inflammatoires induisent une neuroinflammation. Dans les années 1990, l'apparition de modèles murins transgéniques ont permis aux chercheurs de développer de nouveaux modèles de MA prenant en compte un aspect plus global de la pathologie contrairement aux modèles précédemment cités qui se focalisaient sur des aspects spécifiques et isolés. Des modèles d'injection du peptide Aβ ont également été développés afin d'étudier précisément la cascade amyloïde. Ces deux types de modèles sont décrits ci-dessous.

1. Les modèles murins transgéniques de la maladie d'Alzheimer

Les premiers modèles murins transgéniques de la MA ont été développés dans le milieu des années 1990 et sont des souris exprimant la protéine APP humaine. Le modèle PDAPP exprime la protéine APP humaine avec la mutation indienne V717F induite par le promoteur *Platelet-Derived Growth Factor* β. 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; Hsiao *et al.*, 1996; Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997). On retrouve chez ces souris des dépôts progressifs de peptide Aβ produisant des plaques diffuses et neuritiques, une atrophie de l'hippocampe, une astrocytose et une microgliose (qui sont des modifications de la forme et de la fonction des cellules gliales), des altérations des neurotransmetteurs et des atteintes synaptiques, cognitives et du comportement. Ces

modèles ont des profils neuropathologiques caractéristiques de la MA, ce qui confirme le rôle central de la protéine APP et du peptide Aβ dans la MA. Cependant ces modèles ne développent pas les DNF que l'on trouve chez les patients Alzheimer (Van Dam and De Deyn, 2011).

La découverte des mutations des présénilines 1 et 2 dans la forme familiale de la MA a conduit au développement de modèles transgéniques PSEN1 et PSEN2. Bien que ces souris présentent une augmentation du ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, elles ne développent pas de plaques amyloïdes ni de DNF, et montrent peu de désordres cognitifs et comportementaux. Ces modèles ont surtout servi au développement d'un modèle croisé APP/PSEN, dont le ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ est augmenté et la pathologie liée à l'Aβ amplifiée par rapport aux modèles APP (McGowan *et al.*, 2006; Van Dam and De Deyn, 2011).

Des modèles de mutations ou d'extinction de gènes pour la protéine Tau ont été développés. Les souris ayant une extinction du gène n'ont montré aucune altération. En revanche un croisement entre les souris ayant une mutation pour APP et les souris ayant une mutation pour Tau augmente les dépôts amyloïdes et induit une apparition de DNF et une perte neuronale que l'on ne retrouvait pas chez les souris APP (Götz *et al.*, 2004b; Ribé *et al.*, 2005).

Enfin, il a été développé un modèle combinant trois mutations : la mutation de la protéine APP, la mutation de la protéine Tau, et la mutation de la préséniline 1. Ce modèle, nommé 3xTg-AD, développe les plaques amyloïdes avant les DNF avec une évolution équivalente à la MA en plus de l'inflammation, du dysfonctionnement synaptique et du déclin cognitif (Oddo *et al.*, 2003; Van Dam and De Deyn, 2011).

2. Les modèles d'injection du peptide β-amyloïde

Quelle que soit sa forme, la MA est caractérisée par une accumulation d'Aβ due à un déséquilibre entre la production et la dégradation d'Aβ. Cet aspect de la MA peut être mimé par des injections intracérébrales ou intracérébroventriculaires (ICV) du peptide Aβ dans le cerveau des rongeurs. L'administration peut être aiguë avec une injection unique ou plusieurs injections faites à l'aide d'une canule, ou continue avec

une canule accompagnée d'une pompe osmotique. Ces dernières permettent de mimer la nature progressive de la MA. Une injection directe d'Aβ induit des déficits mnésiques et d'apprentissage qui sont évalués par des tests comportementaux. La sévérité de ces troubles dépend de l'espèce injectée du peptide Aβ injectée et de sa concentration, du solvant utilisé pour diluer l'Aβ, de l'état d'agrégation du peptide Aβ, de la durée et du site d'injection et du temps entre l'injection et les tests de comportement. L'accumulation d'Aβ est généralement associée à une inflammation, une activation de la microglie, un stress oxydant et une perte de cellules au niveau de l'injection (Harkany *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2005). Ces modèles d'injection d'Aβ permettent d'étudier la sensibilité des souris à la toxicité du peptide Aβ indépendamment de son processus de production. Ils permettent d'administrer une quantité et une espèce définies d'Aβ. Contrairement aux modèles transgéniques où les symptômes apparaissent en plusieurs mois, ces modèles d'injection permettent d'obtenir des résultats en quelques semaines.

Il existe de nombreux modèles d'injection d'Aβ. Le peptide Aβ étant l'élément principal de la physiopathologie de la MA, c'est ce type de modèle animal que nous utilisons dans notre laboratoire pour étudier la MA. Nous avons vu précédemment que l'espèce toxique de ce peptide était l'$A\beta_{1-42}$ et que c'est principalement sous la forme d'oligomères solubles qu'il induit sa toxicité dans la MA. Notre modèle murin de la MA consiste donc en une injection unique d'oligomères solubles d'$A\beta_{1-42}$. L'injection de ces oligomères se fait par voie ICV, ce qui permet à l'Aβ d'atteindre rapidement l'hippocampe qui est la première zone du cerveau atteinte dans les phases précoces de la MA. Ce modèle est décrit en détail dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

Ces modèles animaux permettent d'étudier les différents aspects de la physiopathologie de la MA, ainsi que de tester les molécules thérapeutiques. Nous allons maintenant aborder brièvement les différentes approches thérapeutiques qui ont été développées pour traiter la MA.

F. Approches thérapeutiques et préventives de la maladie d'Alzheimer

1. *Approches thérapeutiques*

Les traitements symptomatiques existent depuis le milieu des années 1990. Les inhibiteurs de cholinestérase permettent d'augmenter les capacités cognitives et modèrent les troubles comportementaux. La Mémantine®, qui est un antagoniste du NMDA-R, améliore la performance et la fonction cognitive des patients tout en prévenant l'agitation et leur comportement agressif. Les effets de ces traitements sont modérés et agissent à court terme, mais la combinaison des deux traitements permet d'améliorer leurs effets bénéfiques. Des antipsychotiques et des antidépresseurs sont également utilisés pour contrer les troubles de l'humeur chez les patients. Cependant, les bénéfices des antipsychotiques sont modérés et leurs effets secondaires ne permettent pas de les utiliser à long terme tout comme le bénéfice des antidépresseur qui est très limité (Birks and Harvey, 2006; Loy and Schneider, 2006; McShane *et al.*, 2006; Gauthier *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2009).

L'autre approche thérapeutique pour la MA est d'agir sur les éléments de sa physiopathologie. La première option a été d'agir sur la cascade amyloïde. Les inhibiteurs de γ-sécrétase, qui permettent de diminuer la production d'Aβ, ont atteint la phase III de l'essai clinique, mais les effets bénéfiques du Tarenflurbil® n'étaient pas significatifs. Certaines molécules inhibent l'agrégation de l'Aβ. L'immunothérapie anti-amyloïde permet d'augmenter la clairance de l'Aβ et améliorent le comportement des souris transgéniques. D'autres approches consistent à neutraliser les effets de Tau ou agir sur la neuroinflammation (Schenk *et al.*, 1999; Green *et al.*, 2009; Ballard *et al.*, 2011; Selkoe, 2011).

2. *Approches préventives*

À ce jour, les traitements accessibles aux patients atteints par la MA sont des traitements symptomatiques et ne permettent pas d'inverser la pathologie. Les approches thérapeutiques n'étant pas encore efficaces, il est nécessaire d'agir en amont de la maladie et d'explorer les facteurs de risque de la MA pour mettre en place des

stratégies préventives. Certains facteurs comme l'âge, le sexe ou la génétique ne sont pas modulables. En revanche nous pouvons agir sur les facteurs environnementaux, et notamment sur notre alimentation. Il a été démontré que des perturbations du métabolisme et de la signalisation lipidique, et notamment des perturbations dans la biodisponibilité des AGPI, sont impliquées dans les phases précoces de la MA. C'est pourquoi il est important d'étudier l'impact des lipides alimentaires sur cette pathologie.

2.1. Les facteurs de risque généraux

La MA étant une maladie chronique liée à l'âge, elle est souvent associée à d'autres pathologies. Plusieurs études ont montré un lien entre le diabète de type II et la MA, qui sont toutes deux associées à des dépôts amyloïdes (Sridhar *et al.*, 2015). L'obésité, l'hypertension et l'inflammation chronique sont aussi des pathologies associées à un risque accru de développer la MA (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

Le sexe a été 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). Le rôle des hormones sexuelles avec l'âge chez la femme a été suggéré par certains auteurs qui avancent des effets bénéfiques d'un traitement hormonal au moment de la ménopause (Li and Singh, 2014; Young and Pfaff, 2014). Mais cela reste très discuté et l'influence des différences de niveaux d'éducation chez les hommes et les femmes dans les anciennes générations peut être une explication alternative.

Enfin, le niveau d'éducation, l'activité intellectuelle et la pratique sportive influent aussi sur le risque d'être atteint par la MA. Cette pathologie est moins fréquente chez les personnes ayant un niveau d'instruction élevé ou une activité intellectuelle importante. Il en est de même pour les personnes ayant une activité sportive régulière. Ces activités auraient pour effet de stimuler et préserver les capacités cognitives, apportant une « réserve cognitive » permettant une meilleure adaptation à la neurodégénérescence et une réduction des symptômes de la MA. D'autre part, le niveau de vie et l'environnement de la personne peuvent influencer le risque d'être

atteint de la MA. Par exemple, une personne isolée présente un risque important de développer la MA (Sharp and Gatz, 2011).

2.2. Les facteurs de risque génétique

Contrairement à la forme familiale de la MA, la forme sporadique n'est pas associée à des mutations de gènes mais elle peut tout de même être influencée par certains gènes. 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. Le gène de l'APOE se situe sur le chromosome 19 et il existe 3 allèles différents pour ce gène: APOE2, APOE3 et APOE4. Une personne porteuse d'une copie de l'allèle APOE4 présente 2 à 3 fois plus de risque d'avoir la MA, et ce risque est multiplié par 5 ou plus lorsque l'individu porte 2 copies de l'allèle APOE4. Il faut cependant noter que les individus porteurs de l'allèle APOE4 ne développent pas tous la MA et que les patients atteints par la MA ne portent pas nécessairement l'allèle APOE4 (Corder *et al.*, 1993; Kuusisto *et al.*, 1994; Swerdlow, 2007).

Au début des années 2000, des centaines d'études ont cherché à mettre en évidence le rôle d'autres gènes dans la MA, mais seul le gène SORL1 (*Sortilin-Related Receptor*) s'est révélé être impliqué dans cette pathologie. D'autres gènes ont par la suite été liés à la MA comme par exemple les gènes 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). La grande majorité des gènes qui ont été associées à la MA sont en fait impliqués dans le métabolisme lipidique ce qui suggère un rôle important de ce métabolisme et des désordres qui y sont liés (Poirier *et al.*, 2014).

Dans cette première partie, nous avons détaillé les aspects cliniques et les mécanismes cellulaires et moléculaires liés à la MA. La deuxième partie de la synthèse bibliographique sera consacrée à l'ARA, un AGPI fortement lié à cette pathologie.

II. L'acide arachidonique et les fonctions cérébrales

Dans la première partie de cette synthèse bibliographique consacrée à la MA, nous avons décrit cette pathologie comme une maladie de la mémoire, et par conséquent une maladie de la synapse, ayant une composante inflammatoire. L'ARA, qui est le deuxième AGPI du cerveau, est un neuromédiateur important ainsi qu'un acteur de l'inflammation. En raison de ces propriétés, l'ARA joue un rôle essentiel dans les fonctions cérébrales et est fortement impliqué dans la physiopathologie de la MA. Nous nous intéresserons dans cette deuxième partie à ces deux aspects de l'ARA.

A. L'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé

Les acides gras (AG) sont les constituants majeurs des différentes classes de lipides. Dans l'organisme, les lipides sont principalement stockés sous forme de triglycérides, qui sont constitués de trois AG liés à un glycérol par des liaisons ester (Figure 10). On peut également retrouver les AG estérifiés sous forme de phospholipides dont les glycérophospholipides, composés d'un glycérol estérifié par deux AG et d'un acide phosphorique lié à une fonction alcool déterminant la classe de phospholipides (Figure 10), et les sphingophospholipides, composés d'un AG, de la sphingosine et un acide phosphorique. Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes cellulaires dont les propriétés dépendent fortement du type d'AG constituant les phospholipides (Castleden, 1969; Flatt, 1995; Burri *et al.*, 2012).

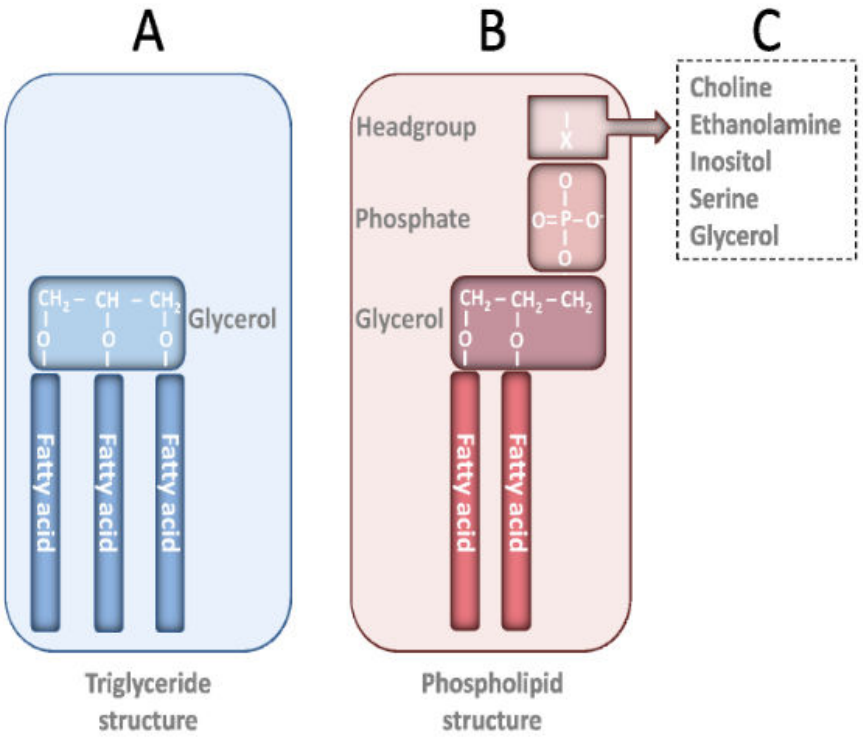


Figure 10 : Structure des triglycérides et phospholipides d'après Burri et al., 2012

Les AG sont des acides carboxyliques aliphatiques dont la chaîne carbonée peut contenir 4 à 36 atomes de carbones. Chaque AG est caractérisé par la longueur de sa chaîne carbonée et le nombre de doubles liaisons qu'il contient. La nomenclature biochimique définit les AG en fonction de la longueur de la chaine carbonée (x), du nombre de doubles liaisons (y) et de la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthylée (z) : Cx:y ω-z (ou n-z). Les propriétés physicochimiques des AG dépendent du nombre de doubles liaisons qu'ils contiennent. La fluidité de la membrane augmente avec le nombre de doubles liaisons présentes dans l'AG. Il existe trois types d'AG, classés selon le nombre de doubles liaisons qu'ils possèdent. Les AG saturés ne possèdent pas de double liaison, et les principaux AG saturés sont les acides palmitique avec 16 atomes de carbone (C16:0) et stéarique avec 18 atomes de carbone (C18:0) (Figure 11) (Emken, 1994; Mensink *et al.*, 1994). Les AG monoinsaturés possèdent 1 seule double liaison, le principal étant l'acide oléique (C18:1 ω-9) (Figure 11). Enfin, les AGPI possèdent plusieurs doubles liaisons et sont séparés en deux groupes : les ω-3 dont la première double liaison se situe sur le 3e carbone (Figure 11)

et les ω-6 dont la première double liaison se situe sur le 6e carbone (Chong and Ng, 1991). L'ARA est le principal AGPI de type ω-6 dans les membranes cellulaires. Il est composé de 20 atomes de carbone et quatre doubles liaisons (C20:4 ω-6) (Figure 12). Il peut être synthétisé à partir d'un précurseur fourni par l'alimentation comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Une fois dans la cellule, l'ARA peut être incorporé dans la membrane plasmique ou métabolisé mais il peut également agir directement sous forme non estérifiée en tant que messager cellulaire. Le paragraphe suivant sera consacré aux enzymes impliquées dans la mobilisation de l'ARA au niveau des membranes plasmiques.

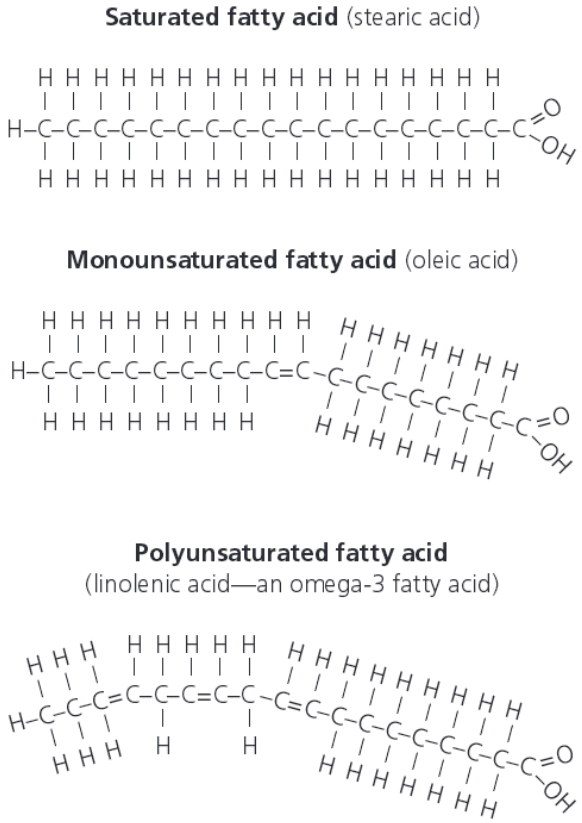


Figure 11 : Structure moléculaire des acides gras d'après White, 2009

Linolenic acid-an omega-3 fatty acid : acide linoléique- un acide gras ω-3 ; *monounsaturated fatty acid* : acide gras monoinsaturé ; *oleic acid* : acide oléique ; *polyunsaturated fatty acid* : acide gras polyinsaturé ; *saturated fatty acid* : acide gras saturé ; *steraric acid* : acide stéarique.

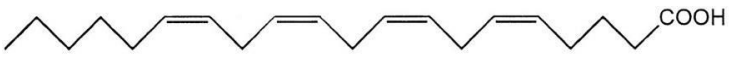


Figure 12 : Structure de l'acide arachidonique d'après Jiang et al., 1999

B. Les acteurs de la mobilisation cellulaire de l'acide arachidonique

Comme nous le verrons ci-dessous, l'ARA non estérifié module la fonction synaptique à plusieurs niveaux et peut être converti par plusieurs voies enzymatiques en de nombreux métabolites. Ceux-ci peuvent influencer les fonctions cérébrales et/ou le développement d'une neuroinflammation. La libération de l'ARA à partir des phospholipides est indispensable à ses fonctions et à sa conversion enzymatique. À l'inverse, l'ARA non estérifié peut être réincorporé dans les phospholipides afin de limiter ses niveaux intracellulaires et préserver les fonctions cellulaires (Vaswani and Ledeen, 1987; Farooqui *et al.*, 2000). Les phospholipases A_2 (PLA_2) hydrolysent les phospholipides pour libérer un ARA ou un autre AG ainsi qu'un lysophospholipide. Le lysophospholipide libéré ainsi qu'un nouvel arachidonyl-CoA (coenzyme A) formé par une acyl-CoA synthétase sont pris en charge par une lysophospholipide acyltransférase (LPLAT) pour former un nouveau glycérophospholipide, constituant de la membrane. C'est ce qu'on appelle le cycle de Lands (Figure 13).

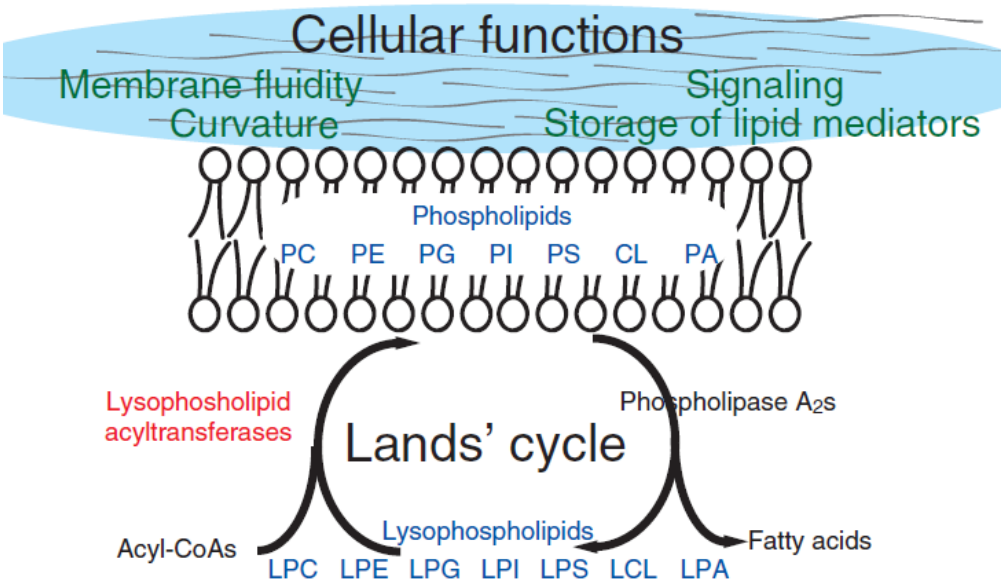


Figure 13 : Réorganisation des phospholipides membranaires dans le cycle de Lands d'après Shindou *et al.*, 2013

La régulation du cycle de Lands est importante pour l'organisation des phospholipides membranaires qui déterminent la fluidité et la courbure de la membrane ainsi que la signalisation cellulaire et le stockage des médiateurs lipidiques. Elle permet

également de contrôler l'accumulation d'AG dans le cerveau. C'est pourquoi il est important d'étudier les enzymes acyl-CoA synthétases et LPLAT qui contrôlent le niveau de lysophospholipides et d'ARA non estérifiés et peuvent potentiellement assurer la réincorporation de ce dernier dans les membranes, et notamment dans les membranes neuronales (Lands, 2000; Shindou *et al.*, 2013).

1. La phospholipases A_2 cytosolique : libération de l'acide arachidonique

Les PLA_2 clivent spécifiquement les liaisons ester en position sn-2 des phospholipides pour libérer un AG et un lysophospholipide (Farooqui *et al.*, 2000). Plus de 30 enzymes ont été identifiées à ce jour et on distingue 5 types de PLA_2 : les PLA_2 secrétées ($sPLA_2$), les PLA_2 cytosoliques ($cPLA_2$), les PLA_2 calcium-indépendantes ($iPLA_2$), les PLA_2 lysosomales et les *Platelet Activating Factor Acetylhydrolases* (Schaloske and Dennis, 2006). La $cPLA_2$ présente un intérêt particulier puisqu'elle libère préférentiellement l'ARA (Yamashita *et al.*, 1997). La $cPLA_2$ possède un domaine N-terminal calcium-dépendant qui cible les phosphatidylcholine (PC) dans le golgi et le RE (Sun *et al.*, 2010). Cette enzyme clive de façon sélective les PC contenant de l'ARA qui est majoritairement réacylé dans les phospholipides tandis qu'une petite quantité d'ARA est métabolisée. La $cPLA_2$ est activée par phosphorylation ou par la concentration calcique intracytosolique. Une fois activée, la $cPLA_2$ est transportée du cytosol vers la membrane, où elle interagit avec son substrat (Sanchez-Mejia and Mucke, 2010). La $cPLA_2$ est exprimée de façon constitutive dans les neurones et son activité est particulièrement importante dans les neurones d'hippocampe (Sanchez-Mejia *et al.*, 2008).

Des études ont montré que la $cPLA_2$ a un rôle dans la croissance des neurites et les fonctions excitatrices neuronales liées aux NMDA-R (Shen *et al.*, 2007b; Shelat *et al.*, 2008). Un modèle de souris transgéniques $cPLA_2^{-/-}$ a été développé pour étudier le rôle de la $cPLA_2$ dans le SNC, mettant en évidence une fonction dans la neuroinflammation, l'ischémie cérébrale, la maladie de Parkinson et la MA (Bosetti, 2007). Ainsi, une augmentation de l'expression de la $cPLA_2$ a été mise en

évidence dans l'hippocampe de patients atteints par la MA (Colangelo *et al.*, 2002; Bosetti, 2007). Des études *in vitro* ont démontré que les oligomères du peptide Aβ induisaient une libération d'ARA associée à une relocalisation de la $cPLA_2$ dans la membrane plasmique (Kriem *et al.*, 2005; Shelat *et al.*, 2008). En outre, l'inhibition de la $cPLA_2$ dans des cultures de neurones corticaux primaires prévient la neurotoxicité induite par le peptide Aβ et l'inactivation du gène $cPLA_2$ chez la souris préserve la mémoire et les marqueurs synaptiques des altérations induites par le peptide Aβ (Kriem *et al.*, 2005; Sanchez-Mejia *et al.*, 2008; Desbène *et al.*, 2012). En revanche, la production importante de peptide Aβ dans le cerveau de souris Tg2776 se traduit par la présence d'un taux important d'ARA non estérifié et d'eicosanoïdes pro-inflammatoires, qui sont diminués quand ces souris sont croisées avec les souris $cPLA_2^{-/-}$ (Sanchez-Mejia *et al.*, 2008). Ces études prouvent le rôle crucial de la $cPLA_2$ dans la MA. D'autre part, un certain niveau d'activation de la $cPLA_2$ et de libération d'ARA est nécessaire au bon fonctionnement synaptique. La $cPLA_2$ serait notamment impliquée dans l'induction de la LTD dans le cervelet (Mashimo *et al.*, 2008). Enfin, la $cPLA_2$ peut affecter la fluidité et la perméabilité membranaire. En effet, un déficit en $cPLA_2$ provoque des changements dans l'architecture membranaire et augmente la rigidité de la membrane (Qu *et al.*, 2013). Des changements de morphologie ont été observés dans les neurones corticaux de souris $cPLA_2^{-/-}$, ce qui montre que la $cPLA_2$ et l'ARA jouent un rôle important dans la maturation des neurones corticaux (Qu *et al.*, 2013).

2. Les acyl-CoA synthétases

Chez les mammifères, les AG doivent obligatoirement être activés en acyl-CoA pour être estérifiés et incorporés dans les phospholipides ou autres lipides. La synthèse d'acyl-CoA est catalysée par une acyl-CoA synthétase à partir d'AG, d'adénosine triphosphate (ATP) et du CoA (Figure 14) (Cho *et al.*, 2000). La classification des acyl-CoA synthétases se base sur la longueur des AG qu'elles activent préférentiellement. Les acyl-CoA synthétases à courte chaine agissent sur les AG de 2 à 4 carbones ; les acyl-CoA synthétases à chaine moyenne activent les AG de 4 à 12 carbones ; les acyl-CoA synthétases à longue chaine (ACSL) sont spécifiques des AG de 12 à 22

carbones (Soupene and Kuypers, 2008). Cinq isoformes d'ACSL ont été identifiées (ACSL1, 3, 4, 5 et 6) chez l'humain, la souris et le rat. Parmi ces ACSL, l'ACSL4 utilise préférentiellement l'ARA comme substrat (Cho *et al.*, 2000; Kan *et al.*, 2014).

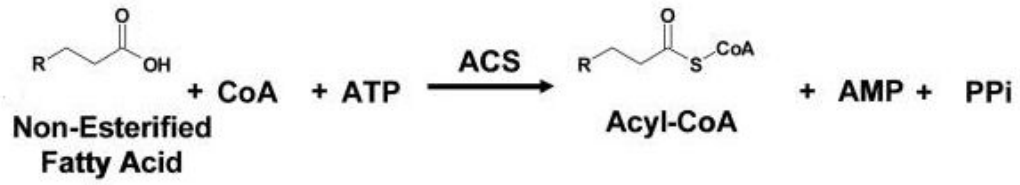


Figure 14 : Activation d'un acide gras en acyl-CoA par une acyl-CoA synthétase d'après Clark et al., 2010

ACS : acyl-CoA synthétase ; AMP : adénosine monophosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; CoA : coenzyme A ; PPi : pyrophosphate inorganique.

L'ACSL4 est une enzyme fortement exprimée dans les tissus stéroïdogènes tels que les glandes surrénales, les ovaires et les testicules mais également dans le cerveau, notamment dans l'hippocampe et le cervelet (Kang *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2000; Kan *et al.*, 2014). L'ACSL4 est une protéine membranaire se trouvant principalement au niveau des membranes associées aux mitochondries, des membranes des peroxisomes et des microsomes qui sont des fragments de membranes du RE (Meloni *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013). Dans les cellules fibroblastiques et corticosurrénaliennes, l'ACSL4 semble être une enzyme clé dans la régulation de la libération d'ARA et est impliquée dans le maintien d'espèces PC contenant de l'ARA ainsi que dans la synthèse d'espèces phosphatidylinositol (PI) (Cornejo Maciel *et al.*, 2005; Küch *et al.*, 2014; Kuwata *et al.*, 2014).

Une isoforme d'ACSL4 spécifique du cerveau a été mise en évidence et possède 41 acides aminés de plus que l'isoforme présente dans les autres tissus (Cho, 2012). L'ACSL4 est impliquée dans le développement des cellules neuronales, leur différenciation et la croissance d'épines dendritiques (Meloni *et al.*, 2009; Cho, 2012). Il a également été montré que cette enzyme régule le transport des vésicules synaptiques et serait donc requise pour le développement, la fonction et la transmission synaptique (Liu *et al.*, 2011). Enfin, ACSL4 joue un rôle important dans le fonctionnement normal du cerveau, notamment la mémoire et l'apprentissage. En effet une mutation du gène

ACSL4, situé sur le chromosome X, serait lié au syndrome du retard mental lié à l'X (Cao *et al.*, 2000). ACSL4 joue également un rôle dans les cancers du sein, du colon et du foie où elle est surexprimée. Elle participe au contrôle de l'agressivité du cancer du sein et à l'inhibition de la croissance tumorale (Maloberti *et al.*, 2010; Orlando *et al.*, 2012).

Peu d'études ont étudié la régulation de l'enzyme ACSL4. L'effet de l'ARA sur l'ACSL4 est controversé. Une étude a montré qu'un apport exogène en ARA diminuait l'expression de la protéine ACSL4 sans affecter la transcription du gène. L'ARA induirait également la dégradation d'ACSL4 en augmentant son ubiquitination (Kan *et al.*, 2014). À l'inverse, l'augmentation de la libération d'ARA et de sa concentration intracellulaire activerait l'ACSL4 pour diminuer cette concentration d'ARA et prévenir la synthèse excessive de ses métabolites (Cho *et al.*, 2000; Cho, 2012). D'autres études ont mis en évidence que l'ACSL4 était régulée par des phosphorylations. Lorsque l'ACSL4 est phosphorylée par la PKA, son activité est augmentée ; lorsqu'elle est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC), son activité est diminuée. La tyrosine phosphatase SHP2 serait également impliquée dans la phosphorylation et la régulation de l'ACSL4 : l'inhibition de SHP2 réduit le niveau protéique d'ACSL4 tandis que sa surexpression augmente l'ACSL4 (Cooke *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013). Enfin, une étude récente a mis en évidence un nouveau mécanisme de régulation de l'expression d'ACSL4 *via* PPARδ dans les tissus et les cellules hépatiques. En effet l'activation de PPARδ augmente l'ARNm et la protéine ACSL4 et une diminution de PPARδ diminue spécifiquement l'expression d'ACSL4 (Kan *et al.*, 2015).

3. Les lysophospholipide acyltransférases

Une fois activés sous la forme d'acyl-CoA, l'ARA est pris en charge par les LPLAT. Les LPLAT catalysent le transfert des AG entre un acyl-CoA donneur et un lysophospholipide accepteur pour former un glycérophospholipide qui comporte le plus souvent un AG saturé ou monoinsaturé en position sn-1 et un AGPI en position sn-2 et constitue l'élément majeur des membranes (Yamashita *et al.*, 1997; Hishikawa *et al.*, 2008; Shindou *et al.*, 2013). Les LPLAT ont été détectées dans de nombreux tissus et

sont fortement liées aux membranes plasmatiques et aux microsomes (Yamashita *et al.*, 1997). Ces enzymes sont très diverses et encore mal caractérisées. Il existe plusieurs types de LPLAT ou *Membrane-Bound O-Acyltransferases* (MBOAT) dont les noms font référence à la classe de phospholipide formé : lysophosphatidylcholine acyltransférase (LPCAT), lysophosphatidylinositol acyltransférase (LPIAT), lysophosphatidylethanolamine acyltransférase (LPEAT) et lysophosphatidylsérine acyltransférase (LPSAT). Chacune de ces LPLAT a une préférence pour différents acyl-CoA ce qui contribue à la diversité des membranes. Parmi ces LPLAT, deux ont montré une spécificité pour l'ARA : la LPCAT3 (ou MBOAT5) et la LPIAT1 (ou MBOAT7) (Yamashita *et al.*, 1997; Hishikawa *et al.*, 2008).

La LPCAT3 possède une activité acyltransférase vers les lysophosphatidylcholine (LPC), lysophosphatidylethanolamine (LPE) et lysophosphatidylsérine (LPS) avec une préférence pour l'accepteur LPC mais n'a aucune activité vers les lysophosphatidylinositol (LPI) (Shindou *et al.*, 2013; Zarini *et al.*, 2014). Cette enzyme a également montré une préférence de substrat pour les acyl-CoA tels que l'oleoyl-CoA, le linoleoyl-CoA et l'arachidonyl-CoA, avec une spécificité plus forte pour l'arachidonoyl-CoA (Hishikawa *et al.*, 2008; Pérez-Chacón *et al.*, 2010). En effet l'induction de LPCAT3 atténue le taux d'ARA libre en augmentant l'incorporation d'ARA dans les phospholipides membranaires et notamment dans les PC (Eto *et al.*, 2012). L'ARA est l'AG majeur des PC dans de nombreuses cellules et la LPCAT3 est l'enzyme principale dans la voie de réorganisation des phospholipides (Hishikawa *et al.*, 2008). La LPCAT3 se trouve dans le RE et est fortement exprimée dans le foie ainsi que dans le pancréas, le tissu adipeux et le cerveau (Yamashita *et al.*, 2014).

La LPIAT1 utilise spécifiquement les LPI comme accepteurs d'acyl et l'arachidonoyl-CoA comme donneur d'acyl pour former des PI contenant l'ARA (Yamashita *et al.*, 2014; Zarini *et al.*, 2014). Cette enzyme est localisée dans les membranes associées aux mitochondries et l'inactivation du gène LPIAT1 réduit le taux d'ARA dans les PI et PI phosphates. Elle induit une atrophie du cortex et de l'hippocampe chez la souris et limite la croissance des neurites sur modèle *in vitro*

(Hashidate-Yoshida *et al.*, 2015). Ainsi l'enzyme LPIAT1 est impliquée dans l'incorporation de l'ARA dans les PL et joue un rôle dans le développement neuronal.

Les enzymes de mobilisation de l'ARA et l'ARA lui-même incorporé aux membranes jouent un rôle crucial dans l'architecture et le bon fonctionnement des membranes. Voyons maintenant quels effets l'ARA non estérifié peut avoir sur la fonction synaptique.

C. Rôle de l'acide arachidonique dans la fonction synaptique

1. L'acide arachidonique : un messager rétrograde

L'ARA non estérifié est impliqué dans de nombreuses fonctions neuronales comme l'induction de la survie cellulaire ou l'augmentation de la croissance des neurites (Katsuki and Okuda, 1995). L'ARA est également impliqué dans la plasticité synaptique, dont la LTP est un élément clé. L'induction d'une LTP nécessite une activation des NMDA-R au glutamate et l'entrée consécutive de calcium dans la cellule postsynaptique (Williams, 1996). Elle induit une libération d'ARA libre accompagnée d'une augmentation de l'activation de PLA_2 dans la phase initiale de la LTP puis de la PLC dans les phases plus tardives (Clements *et al.*, 1991). Plusieurs études ont confirmé l'association entre libération d'ARA et activation des NMDA-R dans le SNC des mammifères et ont suggéré que l'ARA jouait un rôle de messager rétrograde (Pellerin and Wolfe, 1991; Volterra *et al.*, 1992; Bazan *et al.*, 1997). Les messagers rétrogrades sont générés par le neurone postsynaptique et maintiennent la libération de neurotransmetteurs pour stimuler les changements synaptiques tels que la LTP (Bazan *et al.*, 1997). Une étude récente a apporté des éléments confirmant cette hypothèse (Schmitz *et al.*, 2014). L'accumulation calcium-dépendante d'ARA dans la membrane présynaptique joue un rôle central dans la libération de glutamate et les effets persistants de l'ARA sont liés au maintien de la LTP (Freeman *et al.*, 1990). L'ARA stimule la LTP et augmente la sécrétion de glutamate dans les étapes tardives de la LTP (Williams *et al.*, 1989; Lynch and Voss, 1990; Nishizaki *et al.*, 1999). La libération d'ARA par la $cPLA_2$ est même nécessaire à la LTP puisqu'une inhibition de la $cPLA_2$ inhibe la LTP (Su *et al.*, 2013).

L'ARA inhibe la recapture des neurotransmetteurs tels que le glutamate et l'acide γ-aminobutyrique (GABA) pour amplifier la transmission synaptique (Katsuki and Okuda, 1995; Roseth *et al.*, 1998). Enfin, l'ARA module l'ouverture des canaux ioniques, inhibant par exemple les courants potassiques voltage-dépendant au niveau postsynaptique (Katsuki and Okuda, 1995; Angelova and Müller, 2009). Ces différentes études indiquent que le messager rétrograde ARA stimule la LTP, mais une autre étude a montré au contraire que l'ARA induirait une LTD (Bolshakov and Siegelbaum, 1995). L'induction de la LTD nécessite à la fois un influx d'ions calciques dans les neurones par des canaux voltage-dépendants et une activation des récepteurs mGlu. L'expression de cette LTD est présynaptique et nécessite l'action du messager rétrograde ARA. En effet une libération d'ARA stimule la LTD mais une interruption de la libération d'ARA inhibe la LTD (Bolshakov and Siegelbaum, 1995). L'ARA agirait par l'intermédiaire des AMPA-R pour induire la LTD (Kovalchuk *et al.*, 1994). Des études plus récentes ont montré que l'ARA, par son rôle de messager rétrograde, participerait à la formation de nouvelles synapses. En effet l'ARA induit la croissance et la stabilisation de terminaisons synaptiques en profitant d'une voie axonale préexistante favorisant la croissance (Schmidt, 2004). La formation de nouvelles connexions synaptiques nécessite un complexe de polarité essentiel pour l'organisation du cytosquelette dans la formation initiale d'axones, le complexe PAR3, PAR6 et PKC atypique (PKCa). La PKCa de ce complexe peut être activée par le messager rétrograde ARA (Schmidt *et al.*, 2014).

2. L'acide arachidonique : un acteur de l'exocytose

L'exocytose est un évènement cellulaire dans lequel des vésicules chargées fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire. Cette fusion de vésicules est impliquée dans des processus biologiques variés tels que la croissance cellulaire, la réparation de la membrane cellulaire, le recyclage de transporteurs membranaires et la libération de molécules de signalisation telles que les neurotransmetteurs ou les hormones. La communication neuronale nécessite un nombre suffisant de vésicules chargées de neurotransmetteurs, prêtes à

fusionner avec la membrane. Plusieurs protéines sont impliquées dans la sécrétion de neurotransmetteurs *via* la fusion de vésicules synaptiques.

2.1. Protéines impliquées dans l'exocytose

Les protéines *Soluble N-Ethylmaleimide-Attachment Receptor* (SNARE) et Sec1/Munc18 (SM) sont des protéines indispensables pour la fusion de vésicules avec la membrane plasmique (Toonen and Verhage, 2007). Chez les mammifères, les protéines SNARE vésiculaires synaptobrévine-2 ou *Vesicle Associated Membrane Protein-2* (VAMP-2) et les protéines SNARE membranaires SNAP25 (*Synaptosome-Associated Protein of 25 kDa*) et syntaxines interagissent ensemble pour former le complexe SNARE (Rizo and Südhof, 2002; Jahn and Scheller, 2006). Ce complexe SNARE permet la fusion des vésicules contenant des messagers chimiques avec la membrane plasmique et est essentiel pour l'exocytose des vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteurs, étape cruciale pour la transmission synaptique (Figure 15). Il a été montré que la syntaxine-1 est étroitement liée à la plasticité neuronale et à la consolidation de la mémoire (Fujiwara *et al.*, 2006).

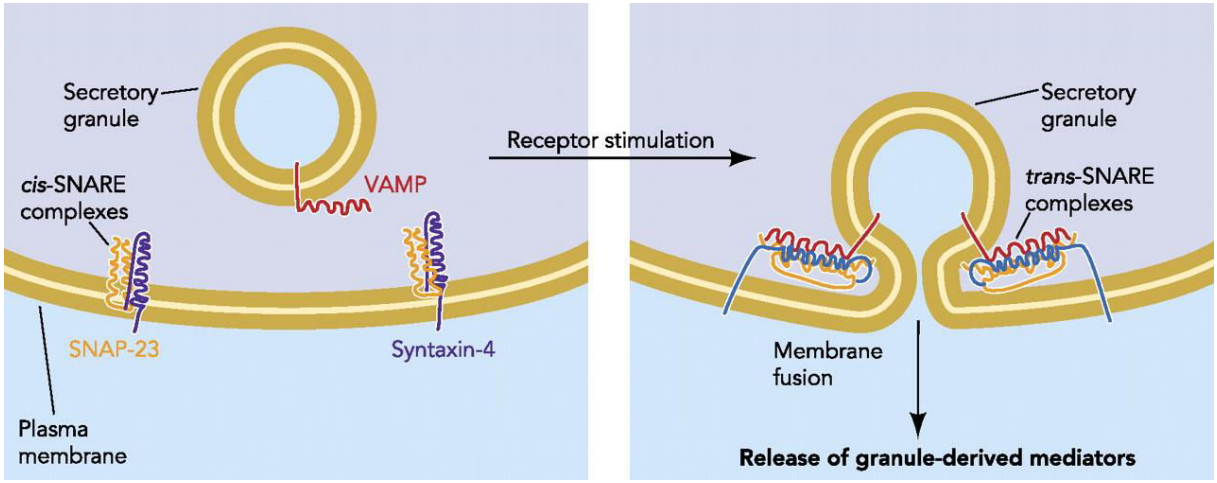


Figure 15 : Formation du complexe *Soluble N-Ethylmaleimide-Attachment Receptor* (SNARE) par l'interaction entre la protéine SNARE vésiculaire et les protéines SNARE membranaires permettant l'exocytose d'après Stanley and Lacy, 2010

SNAP : *Synaptosome-Associated Protein* ; SNARE : *Soluble N-Ethylmaleimide-Attachment Receptor* ; VAMP : *Vesicle Associated Membrane Proteins.*

Les protéines SM sont également des facteurs centraux de la fusion membranaire et se fixent aux syntaxines dans le cerveau. La protéine Munc18-1 est exprimée de façon prédominante dans le cerveau, notamment au niveau des axones et des membranes neuronales, et joue un rôle essentiel pour la transmission synaptique en contrôlant chaque étape de l'exocytose (Toonen and Verhage, 2003, 2007). Munc18-1 interagit avec les syntaxines-1 et -3 ainsi qu'avec les complexes SNARE (Toonen and Verhage, 2007). La protéine Munc18-1 peut se fixer à la syntaxine-1 par trois modes de fixation. Le premier mode de fixation consiste en une fixation de Munc18-1 à la syntaxine-1 monomérique qui se trouve dans une conformation « fermée ». Le faisceau de trois hélices α en N-terminal de la protéine syntaxine-1 se replie sur l'hélice α en C-terminal (Misura *et al.*, 2000). Ce faisceau composé de 4 hélices est alors englobé par la protéine Munc18-1, ce qui permet de maintenir la syntaxine-1 dans une conformation fermée et inactive (Figure 16). La syntaxine-1 ainsi fixée à Munc18-1 ne peut pas se fixer aux protéines synaptobrévine-2 et SNAP25 et s'engager dans le complexe SNARE (Misura *et al.*, 2000; Voets *et al.*, 2001; Rizo and Südhof, 2002; Latham *et al.*, 2007). Le dimère Munc18-1/syntaxine-1 permet de stabiliser ces deux protéines pendant leur transport cellulaire (Toonen *et al.*, 2005; Connell *et al.*, 2007). Une fois à proximité de la membrane cible, un autre mode de fixation est utilisé : la fixation de la séquence N-terminale des protéines SM à la séquence N-terminale apparentée de la syntaxine-1 (Rickman *et al.*, 2007). Enfin, les protéines SM, dont Munc18-1, se fixent au complexe SNARE dans la bicouche lipidique de la membrane (Figure 16) (Zilly *et al.*, 2006). La protéine Munc18-1 contrôle toutes les étapes de sécrétion des neurotransmetteurs, de la formation des vésicules à la création du pore transmembranaire (Toonen and Verhage, 2007). Munc18-1 contrôle le nombre de vésicules liées à la membrane, prêtes pour la fusion membranaire (Voets *et al.*, 2001; Weimer *et al.*, 2003; Toonen *et al.*, 2006). Le dimère Munc18-1/syntaxine-1 est requis pour organiser l'arrimage des vésicules au niveau de la membrane cible et limite leur mobilité (Toonen *et al.*, 2006). Après l'arrimage des vésicules, la syntaxine-1 se détache de Munc18-1 pour se fixer à la protéine SNAP25 et former un complexe SNARE avec la protéine synaptobrevine-2. C'est l'étape de préfusion des vésicules. Munc18-1 peut

alors se fixer au complexe SNARE déjà formé pour induire la fusion des vésicules avec la membrane (Shen *et al.*, 2007a). La protéine Munc18-1 agit avec Munc13-1 pour réguler les sécrétions synaptiques. Certaines vésicules ont une libération rapide induite par une stimulation faible alors que d'autres sont plus réticentes à fusionner avec la membrane. La phosphorylation de Munc18-1 par la PKC et l'activation de Munc13-1 par le diacylglycérol (DAG) sont requises pour réapprovisionner les vésicules réticentes à la fusion mais n'amplifient pas l'amorçage des vésicules plus disposées à fusionner (Latham *et al.*, 2007). Ainsi Munc18-1 joue un rôle central dans la transmission synaptique *via* l'exocytose des vésicules synaptiques.

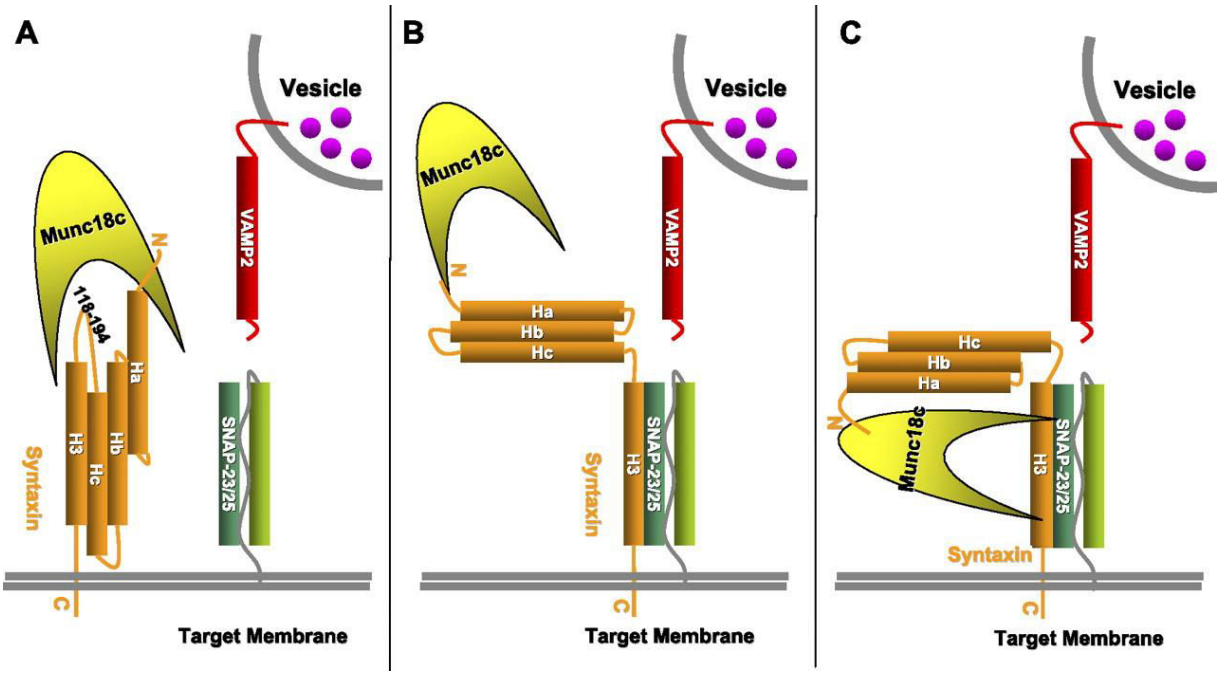


Figure 16 : Modèle d'intéraction entre la protéine Munc18 et la syntaxine d'après Jewell *et al.*, 2010

A) Munc18 non stimulé, maintenant la syntaxine dans une conformation « fermée » empêchant la syntaxine de participer au complexe soluble *N-Ethylmaleimide-Attachment Receptor* (SNARE) et inhibant ainsi l'exocytose.
B) Munc18 stimulé reste lié à la syntaxine dans une conformation « ouverte » lui permettant de participer au complexe SNARE.
C) Munc18 interagit avec le complexe SNARE.

2.2. Rôle de l'ARA dans l'exocytose

Les lipides sont particulièrement impliqués dans le phénomène d'exocytose. Les protéines SNARE, engagées dans la fusion membranaire, sont sensibles à la présence de certains AGPI et notamment à la présence d'ARA, mais les AG saturés n'ont aucun

impact sur ces protéines (Rickman and Davletov, 2005; Darios and Davletov, 2006; Connell *et al.*, 2007). Munc18-1 et la syntaxine-1 sont les premières protéines impliquées dans l'exocytose et identifiées comme des cibles de l'ARA. L'ajout d'ARA au niveau de la membrane synaptique suffit à potentialiser la formation du complexe SNARE (Latham *et al.*, 2007). L'ARA est capable d'activer les syntaxines même lorsqu'elles sont associées à Munc18-1, ce qui permet d'engager la syntaxine-1 dans le complexe SNARE sans abolir l'association Munc18-1/syntaxine-1 (Figure 16) (Rickman and Davletov, 2005; Connell *et al.*, 2007). Cela autorise l'interaction de la protéine Munc18-1 avec le complexe SNARE (Figure 16). La syntaxine-1 nécessite la présence d'ARA pour être totalement activée et accélérer l'assemblage du complexe SNARE. Ainsi, l'ARA peut stimuler les synapses actives au niveau de la membrane présynaptique en influençant la formation du complexe SNARE (Latham *et al.*, 2007). Cet assemblage, en présence de Munc18-1, peut être induit également par l'ajout de PLA_2 au niveau de la membrane synaptique (Brown *et al.*, 2003). Des études ont montré que les PLC et phospholipases D (PLD) sont également impliquées dans la fusion des vésicules. En effet, l'activation de la PLC potentialise l'exocytose tandis que l'inhibition de la PLC bloque l'exocytose des vésicules synaptiques (Davletov *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2007). Une corrélation a été montrée entre l'activation de la PLD1 et l'exocytose. En effet, l'inactivation de la PLD1 inhibe l'exocytose tandis que la surexpression de PLD1 augmente le phénomène d'exocytose dans les cellules neuroendocrines (Vitale *et al.*, 2001). Le rôle de cette PLD dans l'exocytose est médié par l'acide phosphatidique généré par la PLD1 qui stimule la fusion des vésicules sécrétrices avec la membrane plasmique médiée par les protéines SNARE (Bader and Vitale, 2009; Mendonsa and Engebrecht, 2009). L'action locale des phospholipases sur les phospholipides membranaires permet d'obtenir une concentration transitoire en ARA forte au niveau de la membrane, suffisante pour stimuler l'interaction entre les SNARE (Brash, 2001).

Un autre complexe protéique, le complexe TIP30 composé de trois protéines TIP30, ACSL4 et endophiline B1, joue un rôle important dans la fusion des vésicules

dans l'endocytose (Zhang *et al.*, 2011). Composé de l'ACSL4 qui est spécifique de l'ARA, ceci confirme l'implication de cet AG dans la fusion membranaire. Le complexe TIP30 est capable de transférer des groupes arachidonoyl sur l'acide phosphatidique, produisant de nouvelles espèces lipidiques capables d'induire un contact étroit entre les membranes, facilitant ainsi leur fusion (Zhang *et al.*, 2011).

Outre ses fonctions de messager rétrograde et de régulateur de l'exocytose, l'ARA est connu pour être impliqué dans l'inflammation. En effet, de nombreux métabolites de l'ARA sont des médiateurs de l'inflammation, c'est pourquoi le prochain paragraphe est consacré au métabolisme de l'ARA et aux rôles physiologiques de ses métabolites.

D. Les dérivés de l'acide arachidonique : eicosanoïdes et endocannabinoïdes

L'ARA non estérifié est converti en une série de métabolites, appelés eicosanoïdes car ils possèdent tous 20 carbones, par des enzymes qui agissent les unes sur les produits des autres. Ces synthèses successives ont été encore dénommées sous le terme de cascade de l'ARA. Une fois libéré à partir de la position sn-2 des phospholipides membranaires par les PLA_2, l'ARA est métabolisé par trois types d'enzymes dont il est le substrat majeur : les COX, les lipoxygénases (LOX) et la cytochrome P450 époxygénase (CYP EPOX). Les COX catalysent la formation de prostaglandines (PG) et thromboxanes (TX), les LOX catalysent la formation de leucotriènes (LT) et lipoxines et la CYP EPOX produit l'acide époxyeicosatriénoïque (EET) (Figure 17) (Funk, 2001; Stables and Gilroy, 2011; Meirer *et al.*, 2014). Ces dérivés de l'ARA ont tous des fonctions liées à l'inflammation, c'est pourquoi un excès d'ARA sous forme non estérifiée est impliqué dans l'inflammation chronique que l'on retrouve dans de nombreuses pathologies telles que les maladies métaboliques, cardiovasculaires et neurodégénératives. L'ARA peut également être libéré à partir de phospholipides membranaires par d'autres phospholipases, les PLC et PLD. L'ARA libéré est alors métabolisé en des composés particuliers, les endocannabinoïdes, qui ont

également des fonctions biologiques importantes dans la réponse immunitaire et la fonction synaptique et ont montré un intérêt dans la MA.

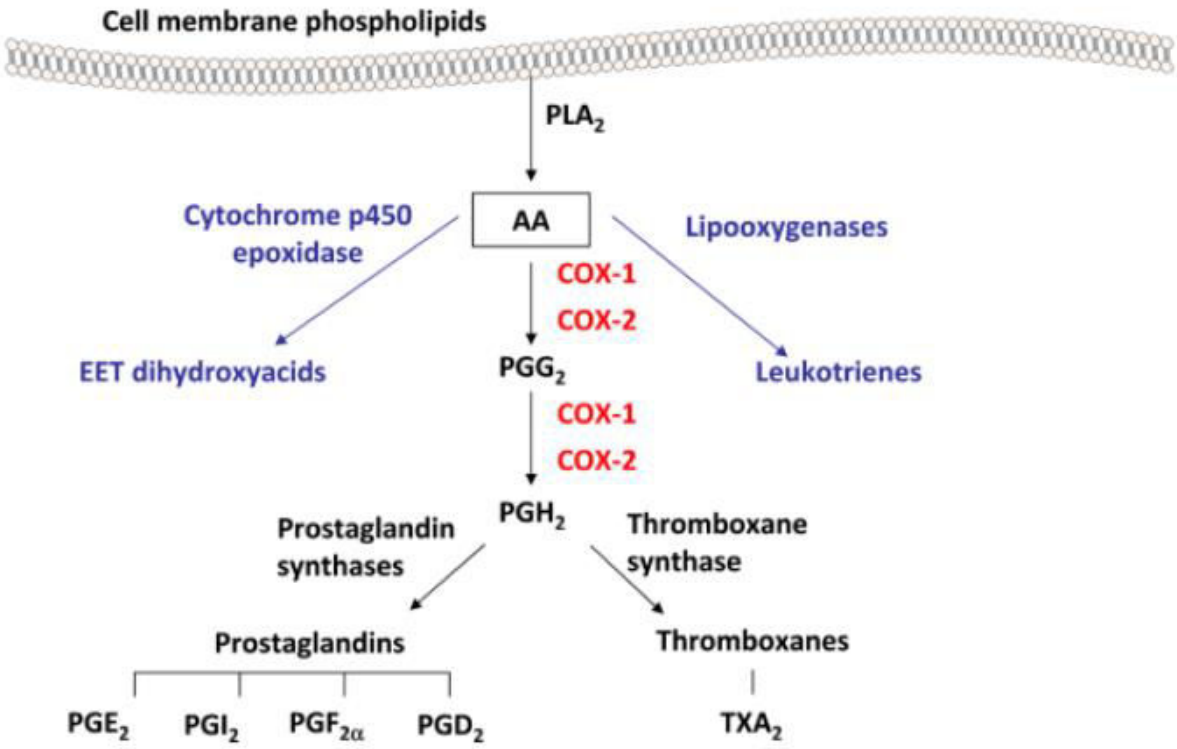


Figure 17 : Métabolisme de l'acide arachidonique et synthèse des eicosanoïdes d'après Aïd and Bosetti, 2011

AA = acide arachidonique ; COX = cyclo-oxygénase ; EET = époxyeicosatriénoïque ; PG = prostaglandine ; TX = thromboxane.

1. La voie des cyclo-oxygénases

Les COX sont des enzymes liées à la membrane qui jouent un rôle central dans la cascade de l'inflammation. Bien que ces enzymes convertissent l'acide γ-linolénique, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), leur substrat préféré est l'ARA (Phillis *et al.*, 2006). Elles transforment l'ARA en prostanoïdes bioactifs. Les COX sont des enzymes bifonctionnelles possédant deux sites catalytiques. La première fonction oxygénase ajoute deux molécules d'oxygène à l'ARA pour former la PGG_2 instable qui est ensuite transloquée au deuxième site catalytique ayant une fonction peroxydase et transformant la PGG_2 en PGH_2, plus stable (Figure 17) (Kulmacz, 1998; Chandrasekharan and Simmons, 2004; Aïd and Bosetti, 2011; Rink and Khanna, 2011). La PGH_2 est ensuite métabolisée en PG active ou en TXA_2 par des

prostanoïde synthases spécifiques du type cellulaire et tissulaire. Ces prostanoïde synthases sont : la PGE_2 synthase (PGES), la prostacyclin synthase ou PGI_2 synthase, la PGD_2 synthase (PGD2S), la $PGF_{2\alpha}$ synthase et TX synthase, chacune pouvant posséder plusieurs isoformes (Jakobsson *et al.*, 1999; Milatovic *et al.*, 2011; Meirer *et al.*, 2014). Les produits de ces enzymes sont des prostanoïdes (ou PG), médiateurs lipidiques dont les fonctions biologiques variées peuvent parfois être antagonistes (Pecchi *et al.*, 2009). Les PG exercent leur action de façon spécifique au type cellulaire *via* divers récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) situés à la surface des cellules. Neuf RCPG ont été mis en évidence : DP1 et DP2 fixant la PGD_2, EP1 à 4 fixant la PGE_2, FP fixant la $PGF_{2\alpha}$, IP fixant la PGI_2 et TP fixant la TXA_2 (Funk, 2001; Hirata and Narumiya, 2011; Stables and Gilroy, 2011; Woodward *et al.*, 2011). Les fonctions biologiques de ces prostanoïdes associés à leurs RCPG seront détaillées ultérieurement.

Il existe trois isoformes de COX : les COX-1, COX-2 et COX-3. La COX-1 et la COX-2 contiennent 60% d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés et catalysent les mêmes réactions. Ce sont des homodimères situés dans les membranes du RE et du noyau qui diffèrent par leurs gènes, leurs mécanismes de régulation, leur localisation et leur fonction (Smith *et al.*, 2000; Aïd and Bosetti, 2011). Les sites actifs des COX-1 et COX-2 diffèrent par des résidus valine aux positions 434 et 523 dans la COX-1 remplacés par des résidus isoleucine dans la COX-2. Cela confère à la COX-2 un site actif plus large et plus flexible permettant une plus grande production d'eicosanoïdes lorsque la concentration en ARA est faible (Kurumbail *et al.*, 1996; Phillis *et al.*, 2006; Rink and Khanna, 2011). La COX-3 est un variant de la COX-1 que l'on trouve chez le chien et le rat dont le rôle est peu connu (Phillis *et al.*, 2006). Dans le cerveau, les COX-1 et COX-2 sont constitutivement exprimées. Dans les conditions physiologiques, la COX-1 se trouve dans la microglie et les cellules périvasculaires alors que la COX-2 se trouve au niveau des dendrites postsynaptiques et des terminaisons excitatoires, en particulier dans le cortex et l'hippocampe (Yermakova *et al.*, 1999; Hoozemans *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; García-Bueno *et al.*, 2009). La COX-1 est

exprimée de façon constitutive dans la plupart des cellules et permet le maintien des fonctions physiologiques de base et l'homéostasie dans la synthèse des PG. Elle est impliquée dans la production de prostanoïdes dans la phase initiale de l'inflammation aiguë tandis que la COX-2 est surexprimée quelques heures après (Hao and Breyer, 2007; Smyth *et al.*, 2009; Milatovic *et al.*, 2011). La COX-2 est un élément clé dans la réponse inflammatoire aiguë et joue un rôle important dans de nombreux processus physiopathologiques. Elle peut avoir des effets aussi bien protecteurs que toxiques sur les neurones selon le stimulus primaire et la cible. C'est une enzyme induite dans la majorité des tissus par des stimuli inflammatoires et elle est considérée comme la seule isoforme capable de propager la réponse inflammatoire (Smyth *et al.*, 2009; Andreasson, 2010; Milatovic *et al.*, 2011; Rink and Khanna, 2011; Meirer *et al.*, 2014). La COX-2 est également impliquée dans l'activité synaptique, la LTP, la LTD et la consolidation de la mémoire (Hewett *et al.*, 2006; Stefanovic *et al.*, 2006). La COX-2, contrairement à la COX-1, peut oxygéner les endocannabinoïdes qui correspondent à une voie métabolique importante dans les neurones pour réguler les transmissions synaptiques excitatives (Slanina and Schweitzer, 2005).

2. La voie des lipoxygénases

Les LOX sont des enzymes dioxygénases monomériques dont il existe quatre isoformes. La classification est basée sur la position du carbone sur lequel elles oxydent l'ARA : la 5-LOX, la 8-LOX, la 12-LOX et la 15-LOX. Elles varient par leur gène, leur séquence en acides aminés et leur distribution tissulaire mais leur site actif est conservé (Aparoy *et al.*, 2008; Rink and Khanna, 2011). Seulement trois formes se trouvent dans le cerveau (les 5-, 12- et 15- LOX) et la 12-LOX est la plus abondante (Hambrecht *et al.*, 1987). L'oxydation de l'ion ferreux (Fe^{2+}) en ion ferrique (Fe^{3+}) active l'enzyme LOX qui va former l'acide hydroperoxyeicosatetraénoïque (HPETE) à partir de l'ARA (Figure 18) (Hammarberg *et al.*, 2001; Rink and Khanna, 2011). Le HPETE est très réactif et est métabolisé en composés plus stables dont l'acide hydroxyeicosatetraénoïque (HETE) et les LT (Figure 18) (Rinaldo-Matthis and Haeggström, 2010; Haeggström and Funk, 2011; Meirer *et al.*, 2014). La 5-LOX est une

enzyme clé de la cascade des LT dont elle catalyse deux étapes dans leur biosynthèse des LT. La seconde étape d'oxydation catalysée par la 5-LOX, et non par les autres LOX, est la synthèse d'un époxyde intermédiaire ou époxyleucotriène LTA_4 à partir du 5-HPETE. Dans cette deuxième étape, la 5-LOX est activée par la *5-LOX Activating Protein* (FLAP) qui est une protéine membranaire homotrimérique (Figure 18) (Rouzer *et al.*, 1986; Phillis *et al.*, 2006; Rinaldo-Matthis and Haeggström, 2010, 2010; Meirer *et al.*, 2014). Le LTA_4 est un intermédiaire fortement instable qui est facilement hydrolysé en LTB_4 par la LTA_4 hydrolase (LTA_4H) ou bien est conjugué avec le glutathion par la LTC_4 synthase pour produire le LTC_4. Le LTC_4 peut être transporté en dehors de la cellule par la protéine MRP1 (*Multidrug-Resistance-Associated Protein*) et métabolisé en LTD_4 et LTE_4 (Figure 18) (Samuelsson, 1983; Radmark *et al.*, 1984; Haeggström and Funk, 2011; Rink and Khanna, 2011; Meirer *et al.*, 2014). Le niveau intracellulaire de Ca^{2+} régule la translocation de la 5-LOX à partir du cytosol vers la membrane nucléaire ainsi que son activation (Rakonjac *et al.*, 2006; Rinaldo-Matthis and Haeggström, 2010). Les LT fonctionnent *via* des RCPG dont 4 récepteurs ont été clonés : deux aux Cystéinyl-LT (Cys-LT), c'est-à-dire à LTC_4, LTD_4 et LTE_4 (Cys-LT1 et Cys-LT2) et deux au LTB_4 (BLT1 et BLT2) (Figure 18). Le LTB_4 a une forte affinité pour le récepteur BLT1 exprimé dans les cellules inflammatoires (Meirer *et al.*, 2014). Les rôles physiologiques de la voie de synthèse des LT, de la même façon que la voie de synthèse des prostanoïdes, seront abordés dans le paragraphe suivant.

3. La voie cytochrome P450 époxygénase

L'enzyme CYP EPOX est liée à la membrane et localisée dans le foie, le cerveau, le rein, le poumon, le cœur et le système cardio-vasculaire (Meirer *et al.*, 2014). Dans le cerveau, la CYP EPOX est exprimée plus fortement dans les astrocytes voisins (Peng *et al.*, 2004). Elle métabolise l'ARA en insérant un atome d'oxygène au niveau d'une des doubles liaisons de l' pour former les EET (Rink and Khanna, 2011). Les EET sont peu stables et sont rapidement hydrolysés par l'époxyde hydrolase soluble en acide dihydroxyeicosatriénoïque (DiHETE).

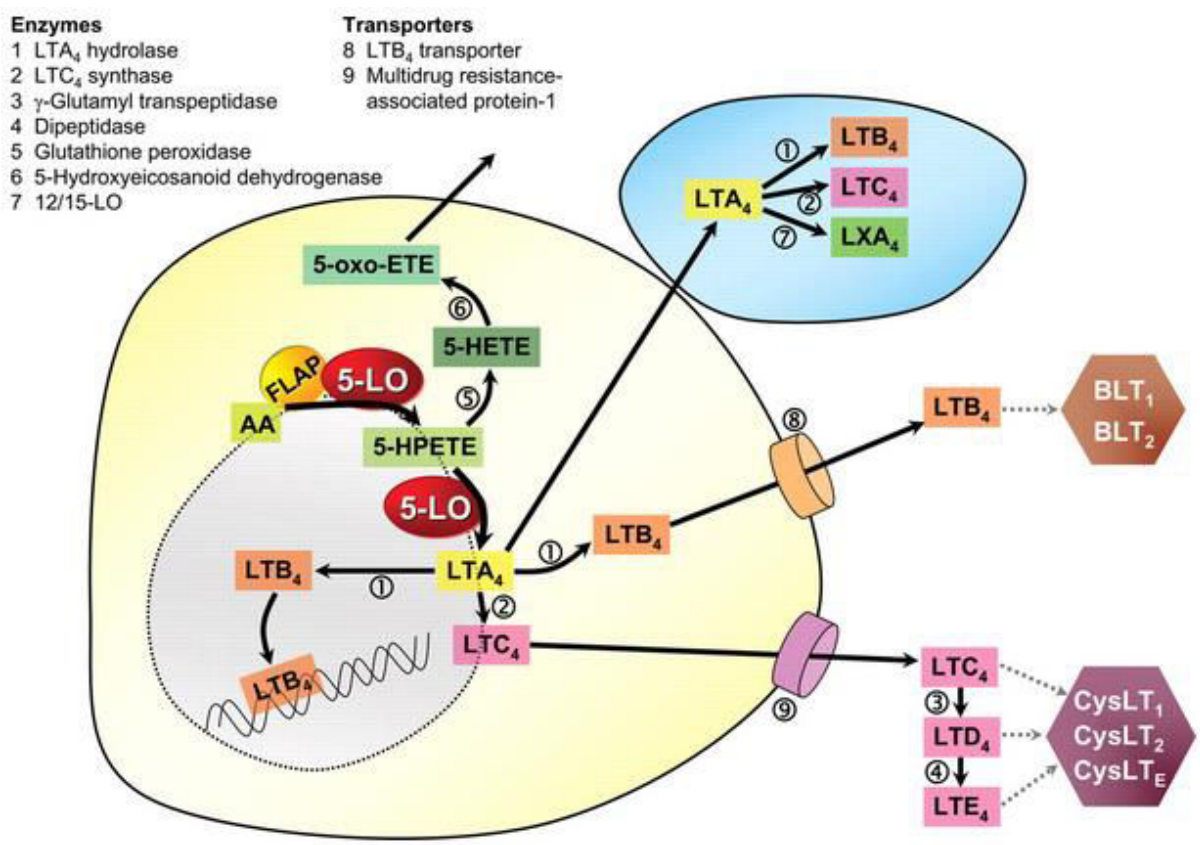


Figure 18 : Biosynthèse des leucotriènes par la voie des lipoxygénases d'après Poeckel and Funk, 2010

AA = acide arachidonique ; FLAP = *five-lipoxygénase activating protein ; ETE* = eicosatetraénoïque ; *HETE* = hydroxyeicosatetraénoïque ; HPETE = hydroperoxyeicosatetraénoïque ; LO = lipoxygénase ; LT = leucotriène ; LX = lipoxine.

4. La synthèse des endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes sont des composés lipidiques, dérivés de la dégradation des phospholipides membranaires. Les endocannabinoïdes ne sont pas stockés dans la cellule et sont produits en réponse à l'activation des cellules immunitaires ou à la dépolarisation de la membrane neuronale (Koppel and Davies, 2008). Deux types de récepteurs aux cannabinoïdes, qui sont des RCPG, ont été caractérisés : les récepteurs CB1 et CB2. À l'origine, ces récepteurs ont été identifiés comme étant des récepteurs au Δ^9-tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC), composé psychoactif du cannabis. Le récepteur CB1 est exprimé abondamment dans le SNC tandis que le récepteur CB2 est plus abondant au niveau périphérique dans les cellules immunitaires (Koppel and Davies, 2008). D'autres récepteurs peuvent fixer les cannabinoïdes, tels que le récepteur GPR55, les récepteurs PPARα et PPARγ et le *transient receptor potential vanilloid-1*

(Aso and Ferrer, 2014). Les endocannabinoïdes les plus représentés sont l'anandamide ou arachidonoylethanolamine (AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) (Piomelli, 2003). Ces deux endocannabinoïdes diffèrent par leurs fonctions et également par leur synthèse et leur dégradation. Leur dégradation produit et élève les taux d'ARA non estérifié.

4.1. L'anandamide

L'anandamine est synthétisée par l'action successive de deux enzymes. Dans un premier temps, l'enzyme *Calcium-Dependent Transacylase* (CDTA) transfère l'AG d'un phospholipide membranaire sur l'amine de la tête polaire d'une PE pour produire le précurseur de l'AEA, la N-arachidonoyl PE (NAPE) (Cadas *et al.*, 1996). Dans un second temps, l'enzyme *NAPE-selective PLD* convertit la NAPE en anandamide (Schmid *et al.*, 1983; Okamoto *et al.*, 2004). L'AEA est hydrolysée en ARA et ethanolamine par la *Fatty Acid Amide Hydrolase* (FAAH) fortement exprimée dans le SNC et associée aux membranes intracellulaires (Ahn *et al.*, 2008). L'anandamide peut également être dégradée par la monoacylglycérol lipase (MAGL), mais cette voie de dégradation est minoritaire par rapport à celle de la FAAH (Di Marzo *et al.*, 1994).

4.2. L'arachidonoylglycérol

Le 2-AG est l'endocannabinoïde le plus abondant du cerveau : sa concentration est 200 fois plus élevée que celle de l'AEA (Stella *et al.*, 1997). Il contient une chaine ARA estérifiée à la position sn-2 du glycérol (Ueda *et al.*, 2011). La voie de synthèse principale du 2-AG commence par l'hydrolyse d'un PI contenant l'ARA par une PLC PI-spécifique. Le DAG formé voit son second AG en dehors de l'ARA hydrolysé par la diacylglycérol lipase (DAGL) qui produit le 2-AG (Sugiura *et al.*, 2006). La voie majeure de dégradation du 2-AG consiste en une hydrolyse du 2-AG en ARA et glycérol par la MAGL (Dinh *et al.*, 2002; Blankman *et al.*, 2007). Le fragment arachidonoyl du 2-AG peut également être oxygéné par la COX-2 pour former des glyceryl PG ou par les LOX pour former des dérivés hydroperoxy de 2-AG (Kozak and Marnett, 2002; Rouzer and Marnett, 2008).

E. Rôles physiologiques et implication dans la MA des métabolites de l'acide arachidonique

1. Les prostanoïdes

1.1. La prostaglandine D_2

Au niveau périphérique, la PGD_2 possède des effets de vasodilatation et de relaxation des muscles lisses (Moncada and Vane, 1978; Giles and Leff, 1988). La PGD_2 joue des rôles complexes et opposés dans le système immunitaire. Elle induit une inflammation générée par les mastocytes tandis que son métabolite, la 15-desoxy-Δ(12-14)-PGJ_2 (15-d-PGJ_2), est anti-inflammatoire. En effet la 15-d-PGJ_2 est capable d'inhiber la signalisation de NFκB (Lewis *et al.*, 1982; Straus *et al.*, 2000; Trivedi *et al.*, 2006). La PGD_2 est la PG la plus abondante dans le cerveau des mammifères (Narumiya *et al.*, 1982). Il existe deux PGD2S, la *lipocalin-like synthase* ou protéine béta-trace et la PGD2S de type hématopoïétique. La PGD2S *lipocalin-like* est fortement exprimée dans le SNC ainsi que dans l'appareil génital masculin. Elle présente des propriétés de liaison de ligands lipophiles comme les rétinoïdes et les hormones thyroïdiennes en plus de son activité enzymatique et est considérée comme une protéine majeure du LCR (Urade and Hayaishi, 2000). En outre La PGD2S *lipocalin-like* et son produit la PGD_2 jouent un rôle majeur dans la régulation physiologique du sommeil (Qu *et al.*, 2006) mais la PGE_2 et les récepteurs EP interviennent aussi dans le cycle du sommeil notamment en cas d'inflammation (Oishi *et al.*, 2015). L'implication de la PGD_2 ou de la PGE_2 dans les troubles du sommeil observés dans la MA n'a pas fait l'objet d'étude jusqu'à présent. La PGD2S de type hématopoïétique, est, dans le SNC, exprimée dans les cellules microgliales et voit son niveau d'expression augmenter dans ces cellules chez les souris modèles de MA et chez les patients affectés par la MA (Mohri *et al.*, 2007). La stimulation des récepteurs DP1 et DP2 améliore la fonction de la BHE et protège les neurones (Liang *et al.*, 2005; Milatovic *et al.*, 2011). Il a été montré que la synthèse de la PGD_2 est plus importante dans le cortex frontal de patients Alzheimer par rapport aux patients contrôles. De plus, la PGD2S et le récepteur DP1 sont surexprimés dans la microglie et les astrocytes au

niveau des plaques séniles chez les patients Alzheimer ainsi que chez un modèle murin de la MA (Iwamoto *et al.*, 1989; Mohri *et al.*, 2007). La PGD2S est un facteur apoptotique majeur dans la MA et joue ainsi un rôle important dans le développement de démence chez les patients atteints par la MA (Maesaka *et al.*, 2013).

1.2. La prostaglandine E_2

La PGE_2 est la PG la plus largement produite dans l'organisme humain et est impliquée dans les fonctions reproductrice, métabolique, immunitaire et neuronale (Milatovic *et al.*, 2011). Au niveau périphérique, la PGE_2 est impliquée dans la vasodilatation, la formation de mucus au niveau du tractus gastro-intestinal et la bronchodilatation dans le système respiratoire (Orehek *et al.*, 1973; Moncada and Vane, 1978; Wolfe *et al.*, 1999). Le rôle de cette PG est complexe car elle a aussi bien des effets pro- et anti-inflammatoires, induit une relaxation et une constriction des muscles lisses ainsi que des effets toxiques et protecteurs (Walch *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2004; Takadera *et al.*, 2004; Andrade da Costa *et al.*, 2009). La PGE_2 est responsable des symptômes de l'inflammation tels que les rougeurs, le gonflement et la douleur (Meirer *et al.*, 2014). Elle régule la prolifération et l'apoptose des lymphocytes ainsi que la production de cytokines (Harris *et al.*, 2002; Legler *et al.*, 2010). Dans le cerveau, la PGE_2 diminue l'activation de la microglie et ainsi la toxicité neuronale secondaire à l'activation de la microglie en diminuant le taux de cytokines pro-inflammatoires lors d'une inflammation du cerveau (Caggiano and Kraig, 1998; Zhang and Rivest, 2001). Certaines études ont aussi montré que la PGE_2 était impliquée dans la plasticité synaptique, agissant en aval des messagers postsynaptiques sur la LTP en se fixant sur les récepteurs EP2 et EP3. Une altération de la signalisation liée au récepteur EP2 serait à l'origine d'un dysfonctionnement de la LTP dans l'hippocampe, lié à des perturbations cognitives et émotionnelles que l'on retrouve dans la schizophrénie (Akaneya, 2008; Savonenko *et al.*, 2009). Une augmentation de la concentration de PGE_2 a été mesurée dans le LCR des patients affectés par la MA ainsi que chez les patients atteints de MCI par rapport à des patients contrôles (Montine *et al.*, 1999; Combrinck *et al.*, 2006). Il a été également montré que la PGES-

1 microsomale, (mPGES-1), qui est stimulée par les agents inflammatoires et coopère avec la COX-2 pour la synthèse de la PGE_2 (Girardet *et al.*, 2011), était impliquée dans la MA. Cette enzyme, et uniquement cette PGES, est induite dans la MA et son expression est associée aux plaques amyloïdes aussi bien dans le cortex de patients Alzheimer que chez la souris Tg2576. Chez ce modèle murin de la MA, une inactivation de la mPGES-1 diminue la prolifération microgliale autour des plaques séniles et atténue les déficits d'apprentissage. Ces observations montrent que la PGES-1 est induite dans la MA et joue un rôle dans sa physiopathologie (Akitake *et al.*, 2013). La signalisation de la PGE_2 peut être médiée par différents récepteurs, ce qui peut expliquer les rôles variés de la PGE_2. Les rôles spécifiques de ces récepteurs EP1 à 4, tous présents dans le cerveau, ont été étudiés dans la MA. La suppression du récepteur microglial EP2 diminue le taux d'Aβ dans le cortex de souris. De plus la signalisation de la PGE_2 *via* le récepteur EP2 augmente la sécrétion d'Aβ dans le modèle murin de la forme familiale de la MA APPSwe-PS1ΔE9 (Liang *et al.*, 2005; Keene *et al.*, 2010). La voie de signalisation COX/PGE_2 *via* le récepteur EP2 a été impliquée dans le développement préclinique de la MA puisque la délétion du récepteur EP2 restaure la clairance microgliale d'Aβ, supprime l'inflammation et ses effets délétères, et prévient l'altération synaptique et de la mémoire (Johansson *et al.*, 2015). L'inactivation du récepteur EP3 chez le modèle APPSwe-PS1ΔE9 a montré une diminution de l'induction de gènes pro-inflammatoires, du stress oxydant, de la production d'Aβ et de l'altération des protéines présynaptiques. EP3 a ainsi un rôle pro-inflammatoire, pro-amyloïde et synaptotoxique dans le développement de la MA (Shi *et al.*, 2012). Enfin, l'inactivation du récepteur EP4 au niveau microglial augmente l'expression de gènes inflammatoires et augmente le dépôt d'Aβ dans les phases précoces de la MA chez la souris APPSwe-PS1ΔE9 mais pas dans sa phase tardive. Ceci suggère une perte précoce de l'effet anti-inflammatoire et bénéfique du récepteur RP4 dans le développement préclinique de la MA pouvant contribuer à sa progression (Woodling *et al.*, 2014).

1.3. La prostaglandine $F_{2\alpha}$

La $PGF_{2\alpha}$ joue un rôle majeur dans la reproduction, la fonction rénale, l'hypertrophie cardiaque et la régulation de la pression intraoculaire (Meirer *et al.*, 2014). Elle a également un effet bronchoconstricteur et est impliquée notamment dans l'asthme (Fish *et al.*, 1984). La $PGF_{2\alpha}$ est associée aux maladies inflammatoires aigües et chroniques ainsi qu'à la migration des leucocytes dans le modèle expérimental d'inflammation chez le rat (Milatovic *et al.*, 2011). Concernant la MA, une étude clinique récente a révélé chez des patients un taux élevé en 15-keto-dihydro-$PGF_{2\alpha}$, un métabolite de la $PGF_{2\alpha}$, ceci reflétant une biosynthèse importante de $PGF_{2\alpha}$ dans la MA (Zhuang *et al.*, 2013).

1.4. La prostacycline

La prostacycline, ou PGI_2, a des propriétés vasodilatatrices, anti-thrombotiques et anti-inflammatoires (Vane and Botting, 1995). Elle a des effets bénéfiques lors d'un traumatisme cérébral : chez le rat, elle diminue le volume de la lésion et augmente le flux de sang cortical (Bentzer *et al.*, 2001, 2003). Chez l'homme, l'infusion de PGI_2 à des doses physiologiques augmente l'oxygénation et diminue les lésions cellulaires après un traumatisme cérébral (Grande *et al.*, 2000).

1.5. Le thromboxane A_2

Le TXA_2 est un activateur puissant de plaquettes, un vasoconstricteur et un bronchoconstricteur (Milatovic *et al.*, 2011). Ses fonctions opposées à celles de la PGI_2 rendent la balance PGI_2/TXA_2 cruciale pour le maintien de la fonction vasculaire (Dogné *et al.*, 2005). Dans le cerveau, la TXA_2 joue un rôle de neuromédiateur et son taux endogène augmente lors d'une ischémie ou en conditions hypotensives (Yalcin *et al.*, 2005). Seulement quelques études ont montré un lien entre la TXA_2 et la MA. Une injection d'Aβ chez le rat a induit une augmentation du taux de TXA_2 et a montré que le peptide Aβ altérait la fonction neuronale par la perte de neurones et *via* la TXA_2 (Yagami *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que l'activation du récepteur TXA_2-prostanoid induit une augmentation de la production d'Aβ (Soper *et al.*, 2012).

2. *Les leucotriènes*

Les LT sont des médiateurs lipidiques paracrines qui régulent la réponse immunitaire innée et jouent un rôle dans les maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme ou l'athérosclérose. Les Cys-LT participent à la réaction d'hypersensibilité (Meirer *et al.*, 2014). Ils ont un effet vasoconstricteur et sont impliqués dans la bronchoconstriction (Michelassi *et al.*, 1982). Le niveau total de LT s'accumule dans le cerveau et le LCR des mammifères après une ischémie cérébrale (Rao *et al.*, 1999). Le LTB_4 est un agent chimiotactique pour les cellules de l'inflammation telles que les neutrophiles, éosinophiles et macrophages et il propage l'inflammation et le stress oxydant (Flamand *et al.*, 2007; Rink and Khanna, 2011). Plusieurs études ont montré que la 5-LOX est impliquée dans la MA : une inhibition *in vitro* de la 5-LOX diminue la formation d'Aβ et une activation de la 5-LOX augmente la formation d'Aβ (Firuzi *et al.*, 2008). Il a été montré que la 5-LOX est surexprimée dans la MA et qu'elle régule la formation endogène d'Aβ (Chu and Praticò, 2011). Récemment, des études ont cherché à mettre en évidence quel LT était responsable de ces effets induits par la 5-LOX. Le LTB_4 serait le médiateur de la 5-LO : il induit une augmentation de la sécrétion d'Aβ, et augmente également l'expression de la protéine γ-sécrétase (Amtul *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2014). Le récepteur Cys-LT1 est également impliqué dans la MA : un traitement en $A\beta_{1-42}$ sur des neurones primaires de souris ainsi qu'une injection intrahippocampique d'$A\beta_{1-42}$ augmente l'expression de ce récepteur, et l'inactivation de ce récepteur *in vitro* supprime la neurotoxicité de l'Aβ (Tang *et al.*, 2014).

3. *Les acides époxyeicosatriénoïques*

Les EET sont des médiateurs lipidiques autocrines et paracrines qui agissent *via* des RCPG de surface cellulaire encore peu connus (Meirer *et al.*, 2014). Les EET ont des propriétés anti-inflammatoires au niveau de l'endothélium en diminuant la production des cytokines induites par le NFκB (Node *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2013). Ils ont également des effets antihypertenseurs et diminuent l'agrégation des plaquettes pour maintenir une homéostasie vasculaire (Imig, 2012). Enfin, les EET protègent les neurones et les astrocytes de la mort cellulaire induite par une ischémie (Rink and

Khanna, 2011). Les EET, produits de la CYP EPOX, sont neuroprotecteurs. Une incubation avec le peptide Aβ chez le rat diminue la production d'EET et DiHETE dans le cortex. L'Aβ diminue également la production d'EET et DiHETE dans des astrocytes et neurones en culture. Ces résultats montrent que l'Aβ diminue l'activité époxygénase (Sarkar *et al.*, 2011). Une étude récente a montré dans une population chinoise que le polymorphisme du gène CYP2J2 peut être associé à un risque plus important de développer la MA (Yan *et al.*, 2015). Ainsi l'activité époxygénase du CYP serait impliquée dans la MA.

4. Les endocannabinoïdes

Le récepteurs aux cannabinoïdes CB1 est le récepteur le plus abondant dans le SNC et est exprimé au niveau du cortex, de l'hippocampe et du cervelet dans les neurones et les cellules gliales (Pertwee, 1997). Il est localisé dans les terminaisons nerveuses, où il module les neurotransmissions excitatrices et inhibitrices, et également au niveau périphérique où il joue un rôle dans la balance énergétique et le métabolisme (Silvestri and Di Marzo, 2013). Les endocannabinoïdes agissent comme des messagers rétrogrades *via* le récepteur présynaptique CB1 pour atténuer les courants calciques et inhiber la libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate, la sérotonine et le GABA. Ils sont associés à la LTP et la LTD, et sont ainsi impliqués dans la plasticité synaptique et le maintien des fonctions cérébrales telles que la mémoire et l'apprentissage (Wilson and Nicoll, 2002; Gerdeman and Lovinger, 2003; Bahr *et al.*, 2006; Iremonger *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2013). Un excès d'AEA peut altérer la fonction neuronale par son action sur le récepteur CB1. La protéine *Fatty Acid Binding Protein* 5 (FABP5) induit l'hydrolyse de l'AEA en ARA, diminuant la quantité d'AEA dans le cerveau. Une extinction du gène de cette protéine chez la souris provoque une accumulation d'AEA dans le cerveau et des altérations de l'apprentissage et de la mémoire basées sur les fonctions de l'hippocampe. Cela indique que la FABP5 régule les fonctions cognitives de l'hippocampe par son action sur l'AEA (Yu *et al.*, 2014). L'endocannabinoïde exogène Δ^9-THC induit des troubles de la mémoire proches de ceux qu'on retrouve dans la MA (Koppel and Davies, 2008). Les altérations

synaptiques et cognitives induites par le Δ^9-THC sont associées à une induction de la COX-2 médiée par le récepteur CB1. Une inhibition de la COX-2 limite la sous-expression des récepteurs au glutamate, l'internalisation du glutamate et l'altération des épines dendritiques des neurones de l'hippocampe induites par le Δ^9-THC (Chen *et al.*, 2013a). L'autre récepteur aux cannabinoïdes, le CB2, est localisé dans les cellules immunitaires périphériques. Dans le SNC, il se trouve principalement dans la microglie (Maresz *et al.*, 2007; Cabral and Griffin-Thomas, 2009). Les cannabinoïdes ont un impact sur la prolifération des cellules microgliales *via* le CB2 (Carrier *et al.*, 2004; Shoemaker *et al.*, 2005). Les lésions neuronales augmentent la production d'endocannabinoïdes qui participent à un mécanisme de défense contre la toxicité (Stella *et al.*, 1997; Marsicano *et al.*, 2003). La stimulation de CB2 avec des cannabinoïdes a un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire. Les cannabinoïdes suppriment en effet la production de cytokines pro-inflammatoires *via* le récepteur CB2 (Cabral and Dove Pettit, 1998; Klein *et al.*, 1998; Klein, 2005). Le 2-AG a la capacité d'induire la migration de nombreux types cellulaires dont les cellules B et les éosinophiles *via* le CB2, c'est donc un agent chimiotactique (Jordà *et al.*, 2002). Enfin, dans des conditions inflammatoires, les agonistes du récepteur CB2 diminuent la perméabilité de la BHE en augmentant l'expression des protéines des jonctions serrées (Ramirez *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont affirmé que les endocannabinoïdes avaient un rôle dans la MA. Une altération de la composition et de la signalisation des endocannabinoïdes a été mise en évidence *post mortem* dans des cerveaux de patients atteints par la MA (Aso and Ferrer, 2014). Cependant le rôle du récepteur CB1 dans la MA est ambigu : certaines études ont montré une réduction de l'expression de CB1 dans le cortex et les neurones distants des plaques séniles (Ramirez *et al.*, 2012; Solas *et al.*, 2013) tandis que d'autres études n'ont montré aucun changement dans l'expression, la distribution et la disponibilité de CB1 dans le cortex et l'hippocampe dans la MA (Mulder *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2014). Le rôle de CB2 dans la MA est plus clair avec une augmentation dans les cerveaux de patients Alzheimer correspondant principalement à l'expression de

ce récepteur dans la microglie située autour des plaques séniles (Ramirez *et al.*, 2012; Solas *et al.*, 2013). Le niveau d'expression de CB2 a également été corrélé avec le taux d'Aβ et de dépôts amyloïdes, mais pas avec le statut cognitif des patients (Solas *et al.*, 2013). Les taux plasmatiques d'AEA et 2-AG ne varient pas entre les patients Alzheimer et leurs contrôles (Koppel *et al.*, 2009) mais l'analyse *post mortem* des cerveaux des patients Alzheimer montre une diminution d'AEA dans le cortex frontal et temporal par rapport aux contrôles (Jung *et al.*, 2012). Les effets des cannabinoïdes sur la MA ont été étudiés par plusieurs équipes de recherche. Les cannabinoïdes induisent une neuroprotection contre la toxicité du peptide Aβ, augmentant la viabilité des neurones et diminuant l'altération de la mémoire induite par l'Aβ (van der Stelt *et al.*, 2006; Ruiz-Valdepeñas *et al.*, 2010; Harvey *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013a; Janefjord *et al.*, 2014). Les cannabinoïdes exogènes inhibent *in vitro* l'hyperphosphorylation de la protéine Tau *via* le récepteur CB1 (Esposito *et al.*, 2006; Aso and Ferrer, 2014). Ces différentes études montrent très clairement que les cannabinoïdes exercent un rôle bénéfique sur les différents aspects de la MA, c'est pourquoi ils représentent une cible intéressante dans le traitement de la MA.

Pour conclure cette partie sur l'ARA, celui-ci, ses enzymes de mobilisation et ses dérivés ont de nombreux rôles dans le cerveau et interviennent dans la MA par différentes voies. Certains effets sont positifs et nécessaires aux fonctions synaptiques mais d'autres peuvent induire une neurotoxicité à l'origine de maladies neurologiques ou neurodégénératives. Un apport en ARA est indispensable pour le SNC mais un excès en ARA peut nuire aux fonctions cérébrales. L'ARA étant un AG essentiel apporté par l'alimentation, le régime alimentaire pourrait être à l'origine d'un déséquilibre entre les effets bénéfiques et délétères de l'ARA. La troisième et dernière partie de cette synthèse bibliographique sera consacrée aux impacts de l'alimentation sur la quantité d'ARA apportée au cerveau et leurs conséquences.

III. L'alimentation dans la maladie d'Alzheimer

Dans les pays occidentaux, la composition des régimes alimentaires a subi des changements conséquents depuis les révolutions industrielles et agricoles après la seconde guerre mondiale. Les produits riches en lipides et sucres simples tels que le glucose ou le saccharose étant devenus plus accessibles et moins onéreux, le taux de lipides a augmenté au détriment des fibres et sucres complexes tels que l'amidon ou les polysaccharides issus de fruits, légumes et féculents. La consommation de graisses animales, initialement associée à des apports importants en AG saturés, a également augmenté de façon significative (Drewnowski, 2000; Nielsen *et al.*, 2002; Francis and Stevenson, 2013). Ces tendances ont été exacerbées avec l'apparition de l'alimentation de type *fast food*. L'augmentation de la prévalence de l'obésité dans les sociétés occidentales ainsi que celle des maladies cardiovasculaires et métaboliques a d'abord été associée à l'excès d'AG saturés, à travers leur influence sur la cholestérolémie et la résistance à l'insuline. C'est pourquoi dès le début des années 1970 les recommandations alimentaires ont orienté les consommateurs vers une alimentation comportant une proportion plus importante d'AG mono- et polyinsaturés (Abete *et al.*, 2010; Kanoski and Davidson, 2011; Francis and Stevenson, 2013; Hsu and Kanoski, 2014). Les graisses saturées d'origine animale dans les ajouts alimentaires directs (beurre, margarine, huile) ont été en partie remplacées par les AGPI d'origine végétale. Les huiles végétales les plus communes et les moins coûteuses, notamment les huiles de maïs, de tournesol et de soja, sont riches en acide linoléique (LA) mais contiennent peu d'AGPI de type ω-3 (Cordain *et al.*, 2002, 2005; Ailhaud *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2011). L'huile de poisson est une source importante de DHA, qui est l'AGPI de type ω-3 le plus abondant dans le cerveau (Linder *et al.*, 2005). Par ailleurs, une partie importante de l'alimentation n'est plus préparée directement par le consommateur à partir de produits bruts mais provient de préparations collectives et/ou industrielles contenant des AGPI ω-6. En outre, la consommation de viande, maintenue à un niveau élevé, apporte principalement des AGPI de type ω-6 et notamment plus d'ARA que de précurseurs. Enfin, une certaine

partie de la population consomme des compléments alimentaires riches en ω-6 préconisés pour augmenter la masse musculaire (Blasbalg *et al.*, 2011). L'apport en ARA dans un régime occidental se situerait entre 200 et 1000 mg/jour, bien que certains auteurs indiquent des apports quotidiens inférieur à 150 mg, et proviendrait principalement de la viande, des œufs et des produits laitiers mais aussi du poisson (Mann *et al.*, 1995; Sioen *et al.*, 2007). Les apports en LA seraient de 10 à 20 g/jour et représenteraient 85% des apports d'AGPI ω-6 (Mann *et al.*, 1995; Rett and Whelan, 2011). Ainsi, le régime occidental actuel est caractérisé par un déséquilibre alimentaire entre les AGPI de type ω-3 et ω-6 en faveur des ω-6. Actuellement, il existe un débat important sur l'influence des apports alimentaires en ω-6 sur la composition cellulaire en AG, les rôles physiologiques de cette classe d'AGPI et leurs effets pathologiques. De ce débat pourrait découler des recommandations alimentaires concernant le niveau des apports en AGPI ω-6 (omega-6 debate ABSBMB today 2012). Des études ont supposé que l'augmentation des apports alimentaires en ω-6 pouvait être à l'origine d'une augmentation des taux cellulaires d'ARA, au moins jusqu'à un certain niveau d'apports (Mann et al., 1995; Rett and Whelan, 2011). Ces taux d'ARA apportés par l'alimentation ont été mis en cause dans le développement de certaines pathologies ayant une forte composante inflammatoire mais cet AGPI et ses précurseurs sont aussi nécessaires à un bon développement dans les premières années de la vie, notamment au niveau cérébral. L'influence de l'alimentation serait modulée par certains caractères génétiques comme le niveau d'activité désaturase (Martinelli *et al.*, 2009). Les répercussions des apports en AGPI de type ω-6 sur les maladies neurodégénératives sont actuellement en pleine émergence. Afin de mieux comprendre cet aspect, nous allons exposer ci-dessous les mécanismes connus de compétition potentielle entre les ω-6 et les ω-3 au niveau de leur synthèse et de leur incorporation cérébrale. Nous aborderons ensuite l'état de la littérature sur la place des apports alimentaires en ARA et autres AGPI ω-6 par rapport à ceux du DHA et d'AGPI ω-3 dans l'évolution de la MA ou d'autres maladie neurodégénératives.

A. Synthèse des acides gras polyinsaturés à partir des précurseurs : une compétition entre les ω-6 et les ω-3

Les AGPI ω-3 et ω-6 ne peuvent pas être synthétisés *de novo* à partir des AG saturés ou des ω-9 par l'Homme. En ce sens, ce sont des AG essentiels (Hansen and Burr, 1946). Les apports alimentaires en AGPI les plus longs comme l'ARA (ω-6), l'EPA et le DHA (ω-3) sont complétés, en fonction des besoins de l'organisme et de l'importance de ces apports, par une synthèse à partir de leurs précurseurs. Ceux-ci, respectivement le LA et l'acide α-linolénique (ALA), sont présents de façon plus abondante dans l'alimentation que leurs dérivés. Une fois ingérés et absorbés, ces précurseurs sont convertis en AGPI à plus longue chaine après avoir subi alternativement des désaturations et élongations (Minich *et al.*, 1997). Cette synthèse des AGPI à longue chaine se fait notamment dans le foie. Il est estimé que 2/3 des apports en DHA au cerveau proviennent du foie, le dernier tiers provenant de la synthèse par les astrocytes (Nouvelot *et al.*, 1986; Moore, 2001). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques : les désaturases qui retirent des hydrogènes et augmentent le nombre de liaisons de l'AG gras, et les élongases qui ajoutent un ou plusieurs carbones à la chaîne carbonée de l'AG (Figure 19) (Pawlosky and Salem, 2004). Les mêmes enzymes sont utilisées pour la synthèse des AGPI à longue chaine de type ω-6 et ω-3. Bien que les Δ5 et Δ6 désaturases aient une affinité plus importante pour les AGPI de type ω-3, les précurseurs d'ω-3 et ω-6 peuvent entrer en compétition dans le processus d'élongation-désaturation lorsque l'apport en LA est trop important (Bourre *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2015).

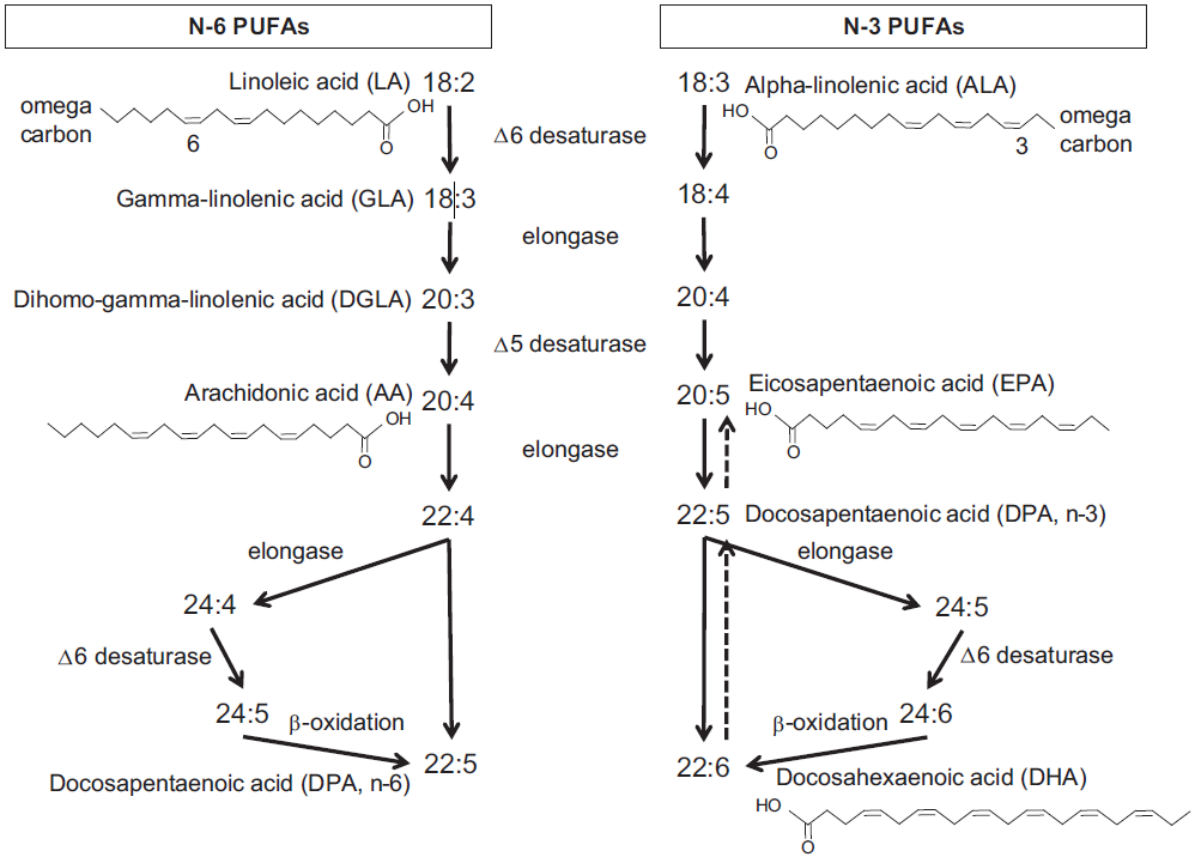


Figure 19 : Synthèse d'acides gras polyinsaturés à longue chaine à partir de leurs précurseurs essentiels
d'après Liu *et al.*, 2015

Les données ci-dessus permettent de comprendre en partie l'effet d'un déséquilibre alimentaire entre les AGPI ω-3 et ω-6 indiqué par de nombreuses études. Une augmentation du précurseur des AGPI de type ω-6, le LA, inhibe la désaturation de l'ALA, précurseur des ω-3, au niveau hépatique. Le DHA et les ω-3 sont alors en compétition avec les ω-6 dans la voie des désaturations/élongations et notamment pour l'activité de la Δ6 désaturase (Rahm and Holman, 1964; Bézard *et al.*, 1994; Sprecher *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 2013). Les besoins en LA sont seulement de 1 à 2% de l'énergie. Lorsque cet apport dépasse 3%, la voie des désaturases est saturée et cela empêche la formation de DHA et des autres ω-3 (Bourre *et al.*, 1990; Bézard *et al.*, 1994; Novak *et al.*, 2008). Ce déséquilibre dans la synthèse des ω-6 et ω-3 à longue chaine au niveau du foie est à l'origine d'une sécrétion plasmatique en ω-3 réduite par rapport à la sécrétion en ω-6. Cette perturbation est alors retrouvée dans les apports d'AGPI au niveau du cerveau : la présence d'ARA et acide docosapentaénoïque (DPA)

de type ω-6 est augmentée tandis que les ω-3 principaux, le DHA et l'EPA, sont réduits. Ainsi un excès de LA ou une restriction en ω-3 dans l'alimentation diminue la présence en ω-3 et induit une assimilation excessive en ω-6 dans le cerveau (Bourre *et al.*, 1990; Arbuckle *et al.*, 1994; Novak *et al.*, 2008). Inversement, une alimentation riche en ALA pendant le développement permet d'avoir une quantité de DHA optimale au niveau de la membrane (Du *et al.*, 2012). En outre une alimentation appauvrie en ω-6 diminue la quantité d'ω-6 et d'ARA retrouvée dans le cerveau par rapport à une alimentation adéquate contenant 10 fois plus de LA. Cette diminution en ω-6 au niveau du cerveau est contrebalancée par une augmentation du taux d'ω-3 (Igarashi *et al.*, 2009, 2012; Kim *et al.*, 2011). Ces différents éléments indiquent non seulement une compétition entre les ω-6 et les ω-3 dans la synthèse des AGPI à longue chaine à partir de leurs précurseurs mais aussi une propagation du déséquilibre ω-6/ω-3 alimentaire jusqu'au SNC.

Les lipides alimentaires sont composés à 95% de triglycérides. Leur digestion commence dans l'estomac et se poursuit dans l'intestin où ils sont absorbés par les entérocytes sous forme de monoacylglycérol (Minich *et al.*, 1997; Phan and Tso, 2001). Les lipides sont remodelés au niveau de l'intestin et du foie puis sont sécrétés dans la circulation sanguine où ils sont transportés par des lipoprotéines de différentes densités (Phan and Tso, 2001; Coleman and Lee, 2004; Pawlosky and Salem, 2004; Shi and Cheng, 2009). La lipoprotéine lipase libère des AG à partir des lipoprotéines, qui sont liés à 99% à une protéine plasmatique, l'albumine. La quantité d'AG libres disponibles pour le cerveau et les autres tissus est donc très faible (Schwenk *et al.*, 2010; Mitchell and Hatch, 2011). Le cerveau est un organe particulier séparé de la circulation sanguine par la BHE qui le protège des macromolécules présentes dans le sang. Cela rend l'incorporation des lipides dans le cerveau plus difficile que dans les autres tissus. L'importation des AG dans le cerveau et leur incorporation dans les cellules du SNC font appel à des mécanismes complexes qui font l'objet du prochain paragraphe.

B. Approvisionnement du cerveau en acides gras polyinsaturés

Les lipides représentent 50% de la masse sèche du cerveau dont environ 30% sont des AGPI, molécules de signalisation et composants membranaires essentiels. Le cerveau est capable de synthétiser peu d'AG non essentiels, c'est pourquoi la plupart des AG proviennent de la circulation sanguine (Dhopeshwarkar and Mead, 1973; Watkins *et al.*, 2001; Hamilton, 2007; Mitchell *et al.*, 2009). La BHE représente une barrière physique entre le sang et l'environnement extracellulaire du cerveau. Elle est composée de 3 types cellulaires : les cellules endothéliales des microvaisseaux, les péricytes et les astrocytes par l'intermédiaire de leurs prolongements (ou pieds) (Figure 20). Les capillaires cérébraux diffèrent des capillaires périphériques par la présence de jonctions serrées très développées (Brightman and Reese, 1969; Saunders, 1977). Elle a une fonction protectrice empêchant l'entrée dans le cerveau de molécules potentiellement nocives provenant du sang et permet l'élimination de produits venant du cerveau vers la périphérie. Les protéines ne peuvent pas passer la BHE, c'est pourquoi les AG doivent être dissociés des protéines plasmatiques pour entrer dans le cerveau (Dhopeshwarkar and Mead, 1973; Hawkins and Davis, 2005; Mitchell and Hatch, 2011).

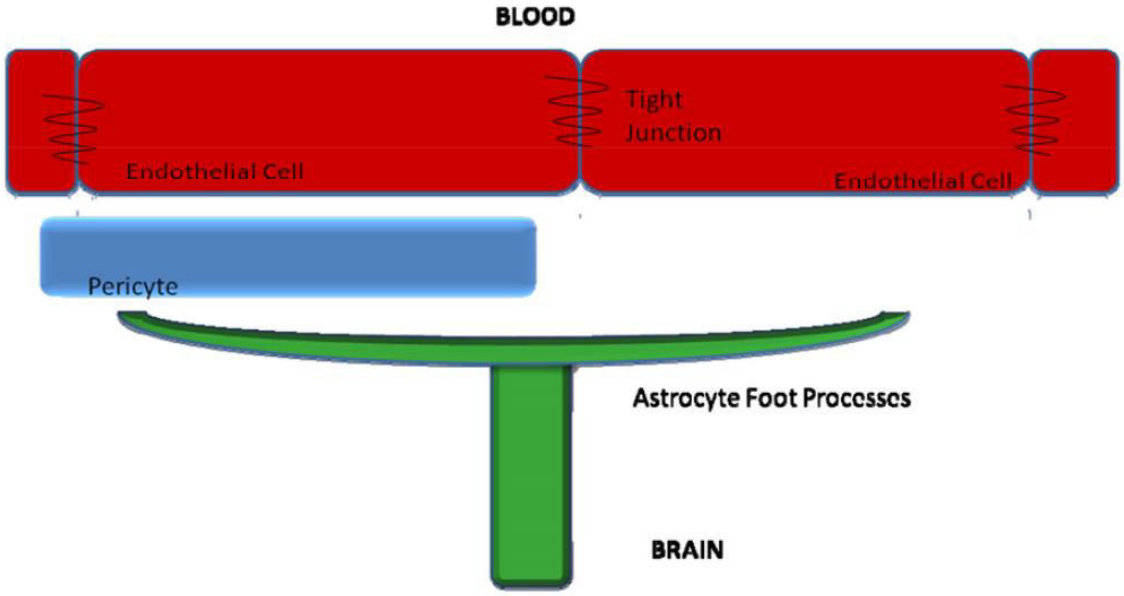


Figure 20 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique composée des cellules endothéliales, des péricytes et des prolongements des astrocytes
d'après Mitchell and Hatch, 2011

1. Le transport des acides gras vers le cerveau

Le mécanisme d'import des AG dans les cellules et notamment à travers la BHE est encore mal connu et fait l'objet de débats, c'est pourquoi différents modèles ont été proposés (Figure 21). Deux voies principales de transport des AG à travers la bicouche membranaire sont possibles : la diffusion passive, qui consiste en un mécanisme de flip flop indépendant des protéines, ou le transport aidé par des transporteurs protéiques exprimés au niveau intracellulaire ou membranaire (Figure 21) (Cupp *et al.*, 2004; Chabowski *et al.*, 2007; Hamilton, 2007; Kampf and Kleinfeld, 2007; Mitchell *et al.*, 2011). La diffusion passive est fortement dépendante du caractère lipophile et de la taille moléculaire de l'AG diffusé. Les AG ayant moins de 12 carbones traversent plus facilement la double couche lipidique membranaire tandis que les AG à plus longue chaine sont moins solubles et passent plus difficilement. Le degré de saturation des AG semble aussi jouer un rôle important dans le transport des AG à travers la BHE (Kamp *et al.*, 2003; Mitchell and Hatch, 2011). Des études soutiennent les deux hypothèses mais la voie médiée par les protéines est maintenant considérée comme la voie principale. Elle permet de réguler l'entrée des AG dans les cellules, contrairement à la voie de diffusion passive dépendante uniquement du gradient d'AG. Ainsi, elle assure l'incorporation d'AG lorsque la concentration extracellulaire est trop faible et sélectionne les types d'AG assimilés (Glatz *et al.*, 2010; Schwenk *et al.*, 2010). Il existe plusieurs classes de protéines de transport d'AG dont la *Fatty Acid Translocase* / CD36 qui peut agir seule ou en association avec les transporteurs membranaires FABP 1 à 9, les *Fatty Acid Transport Proteins* 1 à 6 (FATP1-6) et les cavéolines -1, -2 et -3 (Stremmel *et al.*, 1985; Harmon and Abumrad, 1993; Schaffer, 2002; Doege and Stahl, 2006). La spécificité de ces diverses protéines pour les différents AG et particulièrement pour les AGPI devrait faire l'objet d'études supplémentaires mais il ne semble pas y avoir un système de transport exclusif pour un AGPI particulier contrairement au cas du *Major Facilitator Super Family Domain Containing 2a* (Mfsd2a) et du DHA.

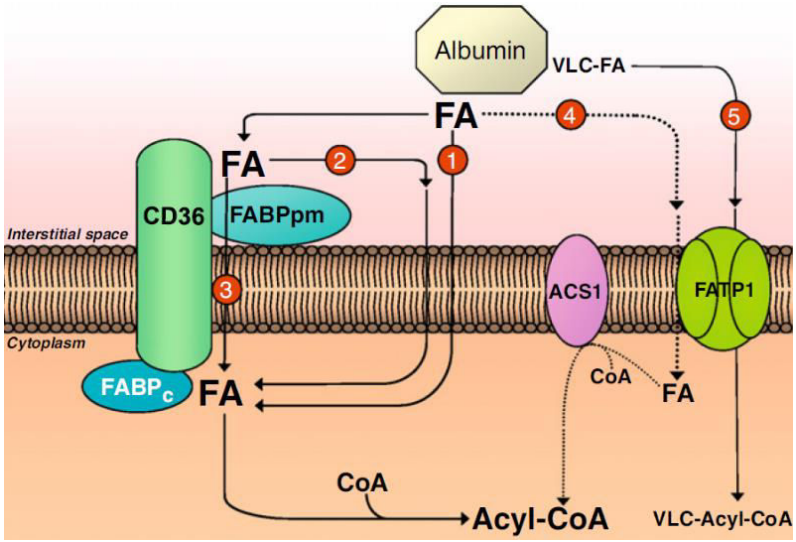


Figure 21 : Représentation schématique des voies de transport d'acides gras à travers la membrane plasmique d'après Schwenk et al., 2010

1) Diffusion passive
2) CD36, en association ou non avec la FABPpm (*plasma membrane-associated Fatty Acid Binding Protein*), retient les acides gras à la surface cellulaire pour augmenter leur concentration locale et donc amplifier la diffusion passive.
3) CD36 transporte elle-même les acides gras à travers la membrane. Une fois à l'intérieur de la membrane, les acides gras sont liés à la FABPc (*cytoplasmique Fatty Acid Binding Protein*) avant d'être métabolisés ou de participer aux voies de signalisation.
4) Une faible proportion d'acides gras est transportée par les FATP (*Fatty Acid Transport Proteins*) avant d'être activés par une acyl-CoA synthétase (ACS1) et convertis en acyl-CoA esters.
5) Les acides gras à très longue chaine (plus de 22 carbones) sont transportés préférentiellement par les FTAP et directement convertis en acyl-CoA esters à très longue chaine par l'action synthétase des FATP.

Deux études récentes ont mis en évidence le rôle du transporteur Mfsd2a dans le transport du DHA à travers la BHE (Zhao and Zlokovic, 2014). La première étude a montré que le Mfsd2a était exprimé dans la BHE et plus spécifiquement dans l'endothélium cérébral. Cette étude montre que le Mfsd2a est nécessaire à la formation et au maintien de l'intégrité de la BHE (Ben-Zvi *et al.*, 2014). La deuxième étude s'est intéressée au rôle de Mfsd2a dans le transport de molécules essentielles pour les fonctions neuronales à travers la BHE. Cette étude a montré que les souris Mfsd2a$^{-/-}$ avaient un taux réduit de DHA dans le cerveau accompagné d'une perte neuronale dans l'hippocampe et le cervelet, des dysfonctionnements neurologiques et comportementaux et d'une réduction de la taille du cerveau, suggérant un rôle du Mfsd2a dans le transport du DHA vers le cerveau (Nguyen *et al.*, 2014). Ainsi deux rôles opposés du Mfsd2a ont été mis en évidence, illustrant deux fonctions opposées

de la BHE : le Mfsd2a facilite le transport des lipides essentiels au développement et au bon fonctionnement du cerveau à travers les jonctions serrées de la BHE tout en empêchant le transport de macromolécules à travers la cellule par le biais de vésicules (Figure 22) (Betsholtz, 2014). Les taux d'ARA dans les phospholipides des souris Mfsd2a$^{-/-}$ ne sont pas abaissés mais augmentés. Ainsi le Mfsd2a apparaît également comme un transporteur exclusif du DHA et non pas de l'ARA ou d'un autre AG (Nguyen *et al.*, 2014). Enfin, un point important de cette étude précise que le Mfsd2a transporte le DHA dans le cerveau à travers la BHE uniquement sous forme de LPC et non pas d'un AG libéré à partir d'un triglycéride (Figure 22) (Nguyen *et al.*, 2014). Ceci pourrait expliquer les résultats de certaines études montrant une meilleure incorporation du DHA délivré sous forme de phospholipides plutôt que de triglycérides (Liu *et al.*, 2014). L'existence d'un transporteur spécifique pour l'ARA sous forme estérifiée dans un phospholipide reste inconnue.

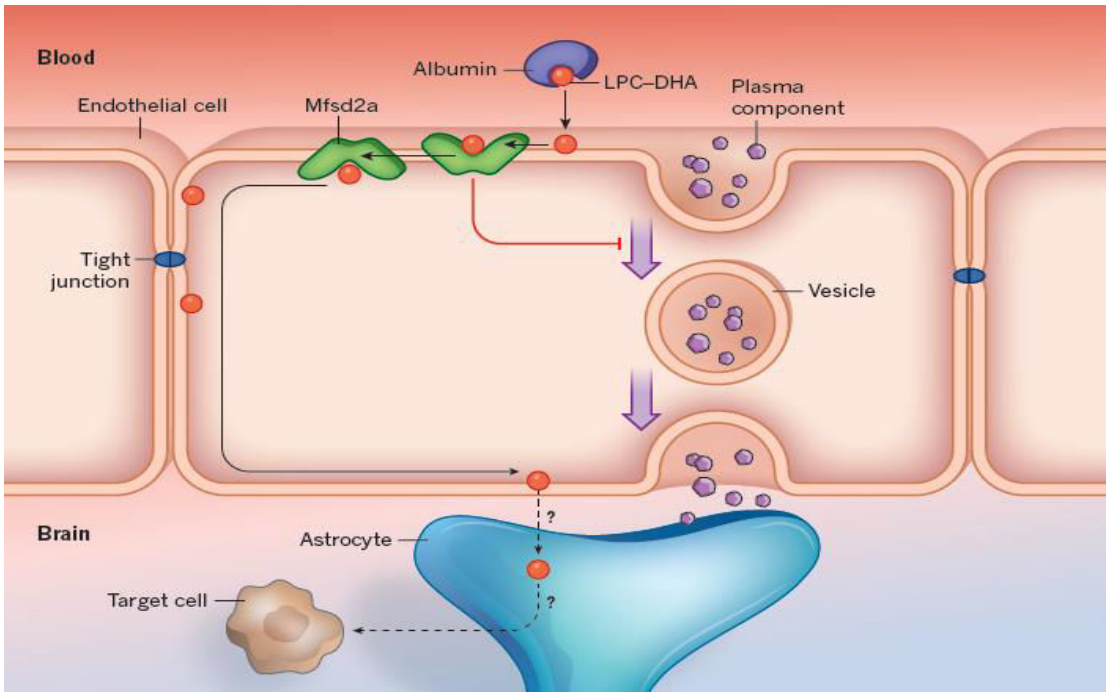


Figure 22 : Rôles du *Major Facilitator Super Family Domain Containing 2a* (Mfsd2a) dans le transport à travers la barrière hémato-encéphalique d'après Betsholtz, 2014

Le *Lysophosphatidylcholin-Docosahexaenoic Acid* (LPC-DHA) est lié à l'albumine dans le plasma et s'en détache lorsqu'il approche de la barrière hémato-encéphalique. Le LPC-DHA est adsorbé par le feuillet lipidique externe de la membrane et se lie au Mfsd2 qui le transfère au niveau du feuillet lipidique interne de la membrane. Le Mfsd2 supprime la transcytose dans les cellules endothéliales, transport par lequel les composants plasmatiques sont transférés à travers la cellule dans des vésicules.

Ces études ont mis en évidence la première étape de passage du DHA à travers la BHE, mais le passage du DHA des cellules endothéliales de la BHE vers le cerveau n'est pas encore compris, en particulier le transport intercellulaire des AG dans lequel les lipoprotéines cérébrales pourraient jouer un rôle important.

Le renouvellement cérébral du DHA et de l'ARA est lent, avec une demi-vie estimée de 1 à 2 semaines. Dans le cerveau, 3 à 5% d'ARA estérifié et 2 à 8% de DHA estérifié sont remplacés quotidiennement par les AGPI provenant du plasma et 0,3% de l'ARA est remplacé chaque jour au sein même du cerveau (Rapoport *et al.*, 2001). Ce renouvellement des AGPI étant lent, il nécessite peu d'apports extérieurs. Au niveau du plasma, la concentration en AGPI non estérifiés est faible mais leur taux d'incorporation dans le cerveau est suffisant pour compenser les pertes d'AGPI (Rapoport *et al.*, 2001). C'est pourquoi les supplémentations alimentaires peuvent réguler le contenu du SNC en AGPI et aider à traiter les pathologies impliquant un déséquilibre ω-6/ω-3 même si les quantités d'AGPI ω-3 ou ω-6 traversant la BHE sont faibles.

2. Incorporation des AGPI ω-3 et ω-6 dans les membranes cérébrales

Au niveau du cerveau et notamment dans les neurones, on trouve peu de triglycérides. Les AG se dirigent donc vers les phospholipides et les glycolipides. Les AGPI arrivés sous forme non estérifiée dans le cerveau sont rapidement activés en acyl-CoA par les acyl-CoA synthétases comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre précédent à propos de l'ARA. C'est sous cette forme que les AG pourront être incorporés dans les lipides cérébraux et notamment dans les phospholipides membranaires. Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes biologiques. Chaque type cellulaire est composé des différentes classes de glycérophospholipides tels que l'acide phosphatidique, les PC, les phosphatidylethanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS), les PI, le phosphatidylglycerol et la cardiolipine (Yamashita *et al.*, 2014). Dans les années 1950, des études ont montré que les glycérophospholipides étaient dans un premier temps synthétisés *de novo* (Kennedy and Weiss, 1956). Par la suite, il a été montré que les glycérophospholipides subissent un cycle d'acylation/désacylation connu sous le nom de

cycle de Lands permettant la réorganisation des membranes (Figure 13) (Lands, 1958). La synthèse *de novo* et le cycle de Lands utilisent les acyl-CoA comme donneurs pour former des glycérophospholipides. Dans la synthèse *de novo*, le *lysophosphatidic acid* est formé à partir du glycérol-3-phosphate par une glycérol-3-phosphate acyltransférase puis converti en acide phosphatidique par une *lysophosphatidic Acid Acyltransferase* (LPAAT). Deux types de glycérides sont alors formés à partir de l'acide phosphatidique. L'un des deux est le DAG converti en triacylglycérol (TAG), PC, PS et PE (Figure 23). L'autre est le cytidine diphosphate DAG qui est modifié pour former les PI, phosphatidylglycérol, cardiolipine ou PS (Coleman and Lee, 2004; Shindou *et al.*, 2009).

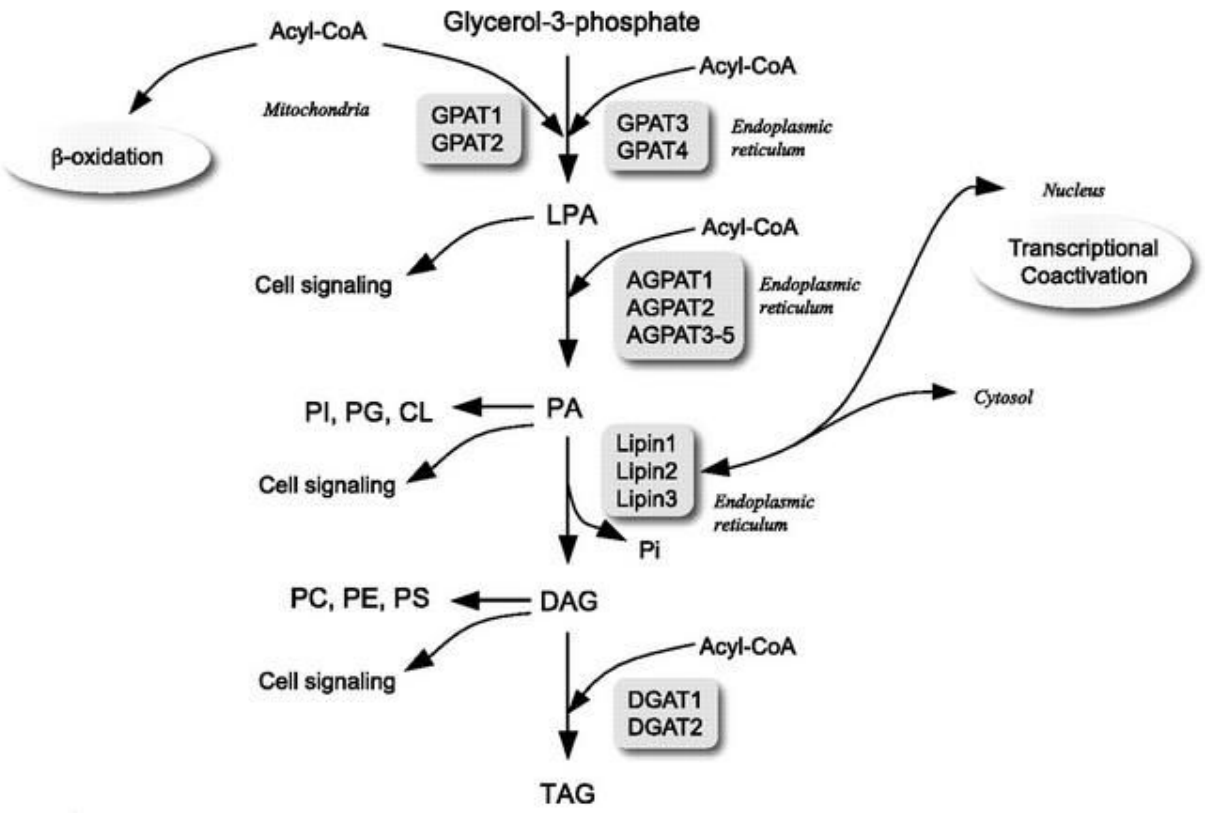


Figure 23 : Synthèse *de novo* des triglycérides et glycérophospholipides : voie du glycérol-3-phosphate d'après Takeuchi and Reue, 2009

AGPAT : 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransférase ; CL : cardiolipine ; DAG : diacylglycérol ; DGAT : diacylglycérol acyltransférase ; GPAT : glycerol-3-phosphate acyltransférase ; LPA : acide lysophosphatidique ; PA : acide phosphatidique ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidylethanolamine ; PG : phosphatidylglycerol ; PI : phosphatidylinositol ; PS : phosphatidylsérine ; TAG : triacylglycérol.

Les phospholipides des membranes neuronales contiennent des AG très variés. L'ARA et le DHA sont respectivement les AGPI de type ω-6 et ω-3 les plus abondants dans le cerveau. Le DHA est incorporé de façon plus abondante dans les PE et PS tandis que l'ARA représente l'AG majoritaire dans les PI. Le bon fonctionnement des enzymes impliquées dans le cycle de Lands est nécessaire pour maintenir un équilibre entre les phospholipides des membranes. Nous avons décrit précédemment les acyl-CoA synthétases et les LPLAT responsables de l'incorporation de l'ARA dans les phospholipides membranaires. Afin d'évaluer la compétition potentielle entre l'ARA et le DHA au niveau de l'incorporation membranaire, nous allons à présent décrire les enzymes responsables de l'incorporation du DHA dans les phospholipides.

Comme nous l'avons vu précédemment, les AG doivent obligatoirement être activés en acyl-CoA pour être incorporés dans les phospholipides. La synthèse d'acyl-CoA est catalysée par une acyl-CoA synthétase à partir d'AG, d'ATP et du CoA (Figure 14). Parmi ces acyl-CoA synthétases, l'ACSL6 utiliserait préférentiellement le DHA comme substrat et favoriserait son accumulation dans les cellules (Marszalek *et al.*, 2005). Cette enzyme est exprimée principalement dans le cerveau et participe à la prolifération et à la différenciation de cellules neuronales, et notamment à la croissance des neurites (Kee et al., 2003). Le gène ACSL6 a été associé à la schizophrénie, ce qui est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle des perturbations dans les phospholipides membranaires seraient impliquées dans la physiopathologie de la schizophrénie (Richardson *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006). Sa localisation intracellulaire n'est pas encore déterminée mais ses fonctions (internalisation des AG, croissance neuronale et accumulation dans les PL et triglycérides) suggèrent une localisation dans les membranes plasmatiques, le RE ou les mitochondries associées aux membranes (Marszalek *et al.*, 2005). Bien que cette enzyme ait une préférence pour le DHA, elle peut activer en acyl-CoA d'autres AGPI contenant 20 à 22 carbones et notamment l'ARA (Marszalek *et al.*, 2004, 2005). Un déséquilibre entre l'ARA et le DHA caractérisé par un excès en ARA pourrait déplacer l'activité d'ACSL6 vers l'ARA

au détriment de l'activation du DHA. Une compétition entre l'ARA et le DHA peut donc exister au niveau de leur activation en acyl-CoA par l'ACSL6.

Jusqu'à récemment, la seule LPLAT identifiée comme utilisant préférentiellement le docosahexaenoyl-CoA est la LPAAT (LPAAT3), mais cette enzyme est faiblement exprimée dans le cerveau (Kim, 2007). Les LPAAT appartiennent à la famille des 1-acyl-glycerol-3-phosphate O-acyltransférase (AGPAT) (Shindou and Shimizu, 2009). Une autre LPAAT, l'AGPAT4, a une forte homologie de structure avec la LPAAT3 (Lu *et al.*, 2005). Une étude récente a montré que l'AGPAT4 avait une activité LPAAT avec une forte sélectivité pour les acyl-CoA contenant des AGPI et surtout pour le docosahexaenoyl-CoA. Cette enzyme a été renommée LPAAT4 par les auteurs (Eto *et al.*, 2014). La LPAAT4 est exprimée dans de nombreux tissus, avec une expression plus forte dans le cerveau contrairement à la LPAAT3 (Eto *et al.*, 2014). Une extinction de l'expression de la LPAAT4 avec des siRNA (*small interfering RNA*) sur la lignée de neuroblastome Neuro2A réduit la proportion de PC 18:0/22:6 de seulement 20% dans les membranes et diminue l'activité LPAAT de 40%, ce qui suggère que d'autres LPAAT agissent sur le DHA dans cette lignée cellulaire. D'autre part une surexpression de la LPAAT4 augmente la proportion de PC 18:0/22:6 (Eto *et al.*, 2014). Bien que les mécanismes d'incorporation du DHA et des autres AGPI dans les glycérophospholipides restent inconnus, ces résultats, qui doivent encore être confirmés *in vivo*, laissent penser que la LPAAT4 pourrait avoir un rôle dans le maintien du DHA dans les membranes neuronales. À ce jour aucune étude n'a mis en évidence le rôle de la LPAAT4 dans l'incorporation de l'ARA dans les membranes neuronales. Le rôle de la LPIAT1 ou de la LPCAT3 dans l'incorporation du DHA dans les glycérophospholipides n'a pas été mis en évidence non plus. Ces données ne nous permettent donc pas de mettre en avant une compétition entre l'ARA et le DHA au niveau des LPLAT.

Le bon fonctionnement de ces différentes enzymes impliquées dans la synthèse et la réorganisation des glycérophospholipides est nécessaire pour maintenir un équilibre entre les différentes espèces de phospholipides des membranes. Un apport alimentaire des précurseurs de l'ARA et du DHA, les AG LA et ALA, est également indispensable

à la synthèse de nouvelles membranes. Cependant un déséquilibre alimentaire entre les AGPI ω-3 et ω-6 peut être à l'origine d'un déséquilibre dans les phospholipides membranaires et ainsi entrainer un dysfonctionnement cellulaire. Le prochain paragraphe sera consacré à ce qui est connu dans la littérature actuelle sur l'impact d'un déséquilibre alimentaire ω-3/ω-6 sur les fonctions cérébrales et l'installation de la MA notamment avec des régimes riches en AGPI ω-6.

C. Influence des acides gras polyinsaturés ω-3 et ω-6 alimentaires sur les fonctions cérébrales

1. Effets des acides gras polyinsaturés ω-3 et de l'acide docosahexaénoïque alimentaires

1.1. Rôle des ω-3 dans le neurodéveloppement

La présence d'AGPI à longue chaine, et principalement le DHA et l'ARA, est critique pour le neurodéveloppement et le maintien des fonctions cérébrales. Ils ont notamment un rôle dans la structure des membranes. Une carence en AGPI à longue chaine peut entrainer des désordres dans le neurodéveloppement comme par exemple des altérations de la LTP. Ces AGPI sont produits dans le lait maternel et rapidement accumulés pendant la première année de vie de l'enfant (Wurtman, 2008; Kiso, 2011). Certaines études ont montré que la grossesse est une période critique pour l'assimilation d'ω-3. La supplémentation en DHA pendant la grossesse ou chez les nouveaux nés améliore le développement précoce de l'acuité visuelle et du neurodéveloppement ainsi que le développement moteur (O'Connor *et al.*, 2001; Birch *et al.*, 2005; Fleith and Clandinin, 2005; Eilander *et al.*, 2007). Chez l'animal, un ratio ω-6/ω-3 favorisant les ω-3 (ratio 1/2 par exemple, Beltz *et al.*, 2007) dans l'alimentation, avec un enrichissement en ALA ou DHA pendant la grossesse et la lactation favorise l'accumulation d'ω-3 dans le cerveau et permet d'améliorer la croissance et la maturation des neurones, d'augmenter la LTP, le nombre d'épines dendritiques et la synthèse des membranes et protéines synaptiques. Ces effets sont également produits par l'administration d'EPA mais pas par l'administration d'ARA (Wurtman *et al.*, 2006;

Beltz *et al.*, 2007; Cansev and Wurtman, 2007; Sakamoto *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2011). La diminution du ratio ω-6/ω-3 augmente le nombre et la taille des neurones et augmente l'expression des protéines présynaptiques dans l'hippocampe (Hajjar *et al.*, 2013). À l'inverse, une diminution de DHA dans le cerveau en développement peut entrainer une altération de la neurogénèse, de l'apprentissage et de la mémoire. Chez le rat, une carence en DHA a été associée à une diminution des capacités d'apprentissage et de la densité des vésicules synaptiques dans l'hippocampe (Chalon, 2006; Coti Bertrand *et al.*, 2006; Novak *et al.*, 2008). Le déséquilibre ω-6/ω-3 a également été associé à certaines maladies mentales. La consommation d'un régime pauvre en DHA pendant la gestation, la lactation et l'enfance augmente le risque d'anxiété et de dépression à l'âge adulte. Une administration en EPA aurait un potentiel thérapeutique pour la dépression (Logan, 2004; Beltz *et al.*, 2007; Bhatia *et al.*, 2011; Simopoulos, 2011).

1.2. Rôle des ω-3 dans le vieillissement et la maladie d'Alzheimer

Le vieillissement et les pathologies liées à l'âge, comme la MA, ont également été associés avec les taux d'ω-3 dans l'organisme. En effet le niveau de DHA dans les PC plasmatiques est inversement proportionnel au risque de développer une démence chez les patients âgés. De nombreuses études ont montré qu'un régime alimentaire enrichi en ω-3 ou DHA protège contre le déclin cognitif lié à l'âge et diminue le risque de développer un MCI ou une démence (Laitinen et al., 2006; Schaefer et al., 2006; Vercambre et al., 2009; Sydenham et al., 2012; Ubeda et al., 2012; Cederholm et al., 2013; Luchtman and Song, 2013). Les études chez l'animal ont montré qu'une supplémentation en ω-3 préserve les fonctions cognitives, les fonctions de l'hippocampe et la LTP dans le cerveau âgé (Kelly *et al.*, 2011). De plus, la supplémentation en DHA chez des modèles transgéniques de la MA diminue la synthèse d'Aβ et la formation de plaques amyloïdes et la supplémentation en EPA prévient l'inhibition de la LTP induite par le peptide Aβ (Lynch *et al.*, 2007; Amtul *et al.*, 2011). À partir des résultats obtenus sur l'animal, plusieurs études cliniques ont étudié l'impact d'une administration orale en ω-3 sur le déclin cognitif lié au vieillissement. Certaines études ont montré une

amélioration des fonctions cognitives à la suite d'une administration de DHA chez les patients présentant des MCI, syndrome prodromal de la phase précoce de la MA (Sydenham *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2012; Titova *et al.*, 2013). Cependant, d'autres études cliniques n'ont pas confirmé ce lien positif entre la consommation en ω-3 et les performances cognitives chez les individus âgés (Quinn et al., 2010; Chew et al., 2015). Des études d'intervention basées sur la supplémentation en ω-3 ont été réalisées dans le cadre de la MA. La plupart de ces études n'ont montré aucun effet protecteur des ω-3 contre la MA. L'échec de ces interventions sont en partie attribuables aux patients présentant déjà une démence faible à modérée, ces interventions étant mises en place trop tard dans l'évolution de la MA (Dangour et al., 2012; Sperling et al., 2013; Murphy et al., 2014). Des essais interventionnels basés sur des modifications de la ration alimentaire, et non sur des supplémentations, permettraient de mieux évaluer les effets protecteurs potentiels du DHA contre la MA dans la population âgée. Ces essais devrait être réalisés sur une durée suffisamment longue avant que ne survienne la MA, ce qui suppose de pouvoir sélectionner les populations de patients « à risque ». Ces populations pourraient regrouper des sujets chez qui un mauvais ratio alimentaire ω-6/ω-3 pourrait se traduire par une faible accumulation ou une élimination excessive de DHA cérébral et une sensibilité plus forte aux agents de la MA.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les effets bénéfiques du DHA. La première concerne l'incorporation du DHA dans les membranes, où il influence la structure quaternaire des protéines membranaires et la fluidité de la membrane qui est importante pour la fixation de neurotransmetteurs et la signalisation dans la cellule. Les ω-3 influencent la neurogénèse *via* leur contribution à la structure dynamique et la fonction des membranes neuronales. La deuxième hypothèse consiste en la modulation du niveau de cytokines par les ω-3, régulant ainsi la fonction immunitaire et inhibant la libération de cytokines pro-inflammatoires, ces molécules étant elles-mêmes impliquées dans la régulation de la neurogénèse (Beltz *et al.*, 2007). Les ω-3 influencent aussi le niveau de neurotrophines : le *brain-derived neurotrophic factor*, associé à des altérations de la neurogénèse et de la survie neuronale, est altéré par la prise alimentaire en ω-3

(Beltz *et al.*, 2007). Enfin, le DHA peut être transformé en métabolites actifs tels que la neuroprotectine D1. Certaines études ont rapporté que la neuroprotectine D1 supprime *in vitro* la neurotoxicité de l'Aβ_{1-42}, induit la neurogénèse et la croissance des neurites et active la syntaxine-3 qui est une protéine membranaire synaptique (Yehuda, 2003; Lukiw *et al.*, 2005; Darios and Davletov, 2006; Kawakita *et al.*, 2006; Beltz *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2007). Cependant, ces composés dérivés du DHA sont très minoritaires et leur éventuelle action ne représenterait qu'une partie des effets pléiotropiques du DHA.

2. Effets des acides gras polyinsaturés ω-6 et de l'acide arachidonique alimentaires

Nous avons précédemment évoqué l'importance d'un équilibre entre les ω-3 et les ω-6 dans les fonctions cérébrales. Le rôle neuroprotecteur du DHA et des ω-3 a été abondamment étudié et bien caractérisé. Des études se sont également penchées sur les effets des ω-6 et de l'ARA dans le cerveau. Certaines études ont montré un effet bénéfique de l'ARA sur les fonctions cérébrales. Une faible supplémentation en ARA dans l'alimentation de rates pendant la gestation et la lactation a induit une amélioration du comportement et de l'apprentissage de leur progéniture (Zhao *et al.*, 2011). Une autre étude a montré que l'ARA serait impliqué dans la neurogénèse postnatale (Maekawa *et al.*, 2009). Chez le rat adulte, l'ARA améliore la cognition spatiale (Okaichi *et al.*, 2005). L'ARA a également un impact positif sur le vieillissement en préservant la fluidité des membranes de neurones hippocampiques (Fukaya *et al.*, 2007). Au cours du vieillissement, on observe chez le rat une diminution de l'induction de la LTP corrélée avec une diminution de la libération du glutamate dans les synaptosomes d'hippocampe. Ces effets liés au vieillissement sont inversés par une supplémentation en ARA (McGahon *et al.*, 1997, 1998). De plus, un régime enrichi en ARA de plus de trois mois semble préserver les facultés d'apprentissage lors du vieillissement chez le rat (Kotani *et al.*, 2003). Enfin un régime enrichi en ARA peut réduire les dépôts d'Aβ en inhibant le processus protéolytique d'APP, préserver la plasticité synaptique chez les rats âgés et augmenter la fluidité des phospholipides membranaires (Hosono *et al.*, 2015).

D'autres études montrent au contraire un effet néfaste de l'ARA sur les fonctions cognitives. Un excès en ARA dans l'alimentation au moment du développement induirait des altérations oculaires, dont la microphtalmie (Maekawa *et al.*, 2010). L'œil étant une extension du SNC, cela laisse suggérer qu'un excès en ARA pourrait induire des altérations du développement cérébral. Une administration orale d'ARA à long terme induirait une altération des fonctions cognitives et de la coordination motrice en aggravant le déficit en ω-3 chez des souris ayant une déficience en ω-3 (Harauma *et al.*, 2015). Enfin, les ω-6 et notamment l'ARA seraient liés à la MA : les ω-6 induisent une libération anormale du neurotransmetteur acétylcholine liée à la MA et à la démence, et l'ARA et ses métabolites sont impliqués dans la production d'Aβ induisant des altérations au niveau cellulaire et dans un modèle murin de la MA (Bois et al., 2005; Amtul et al., 2012). Outre ses effets sur la fonction cérébrale et ses pathologies, des études ont montré que des apports alimentaires excessifs en ARA faciliteraient la survenue ou l'aggravation de pathologies à forte composante inflammatoire, l'ARA étant le précurseur de nombreux médiateurs de l'inflammation. De Silva et al., 2014 ont montré que, dans une large population humaine, l'apport en ARA est corrélé positivement avec le risque de survenue de rectocolite hémorragique, alors que l'apport en acide oléique est au contraire protecteur (de Silva et al., 2014).

Ainsi les résultats concernant l'impact de l'ARA sur les fonctions cognitives et dans la MA sont moins étudiés que l'impact du DHA, et les effets de l'ARA sont très controversés. Cela peut être dû au fait que l'ARA joue un rôle important dans la structure et la fluidité des membranes neuronales tout en étant en compétition avec le DHA, qui lui a un effet bénéfique très marqué. D'autre part, l'ARA sous forme non estérifiée participe à diverses fonctions cellulaires, notamment l'inflammation puisque ses métabolites sont des acteurs de l'inflammation. Un excès d'ARA libre peut donc être à l'origine d'une neuroinflammation chronique ou d'une neurotoxicité.

Hypothèses de travail et objectifs

I. La recherche de stratégies préventives contre la MA est primordiale

La MA est une maladie neurodégénérative qui touche une grande partie de la population mondiale. Dans la majorité des cas, les symptômes cliniques apparaissent à partir de 65 ans mais les altérations au niveau cellulaire se manifestent bien avant le diagnostic de la maladie chez les patients. Les mécanismes en jeu dans cette pathologie sont complexes et commencent bien des années avant l'apparition des signes cliniques. Il n'y a pas de marqueurs biologiques connus à l'heure actuelle qui permettraient de prévoir la survenue d'une MA chez des populations à risque ou de prédire son évolution et sa gravité. Les thérapies utilisées actuellement sont inefficaces et les stratégies projetées se heurtent au fait qu'elles seront appliquées à des individus chez qui la maladie a causé des atteintes à bas bruit pendant des années et dont les fonctions cognitives sont déjà profondément altérées. Devant l'expansion de la maladie aussi bien en nombre d'individus que de pays touchés et de diversité au niveau socio-économique des individus et des sociétés, la conception et la mise en place de stratégies préventives est indispensable. Bien que la connaissance des facteurs de risque doive être sérieusement approfondie, la nutrition apparait comme un outil fondamental pour fonder ces stratégies préventives. La nature des lipides et des acides AG intervient dans les grandes pathologies sociétales actuelles comme l'obésité, le diabète de type II et les maladies neurodégénératives liées au vieillissement. Dans le domaine de la MA, de nombreuses études se sont focalisées sur les effets des AGPI ω-3. La plupart des travaux menés sur les modèles animaux de la MA ont mis en avant les effets bénéfiques des ω-3 et plus particulièrement du DHA sur les fonctions cognitives. A l'heure actuelle, le bénéfice des suppléments alimentaires en DHA n'a pourtant pas été prouvé chez l'Homme. Contrairement au DHA, l'influence des apports alimentaires en ARA sur la MA a été peu étudiée alors que ses précurseurs ω-6 et lui-

même constituent une part importante et croissante de l'alimentation de nos contemporains, au moins dans les pays occidentaux.

II. L'acide arachidonique dans le cerveau et la maladie d'Alzheimer : rappel de la synthèse bibliographique

La MA est décrite comme une maladie de la synapse, élément central du développement et de la consolidation de la mémoire. La synapse est en effet la première cible d'un des acteurs majeurs de la MA, le peptide Aβ. Les oligomères du peptide Aβ, principaux agents de la MA, diminuent la densité des synapses, altèrent leur fonctionnalité et inhibent leur réorganisation, qui sont trois éléments cruciaux pour préserver les capacités cognitives. Nous avons vu dans la synthèse bibliographique que l'ARA sous forme non estérifiée agit en tant que messager synaptique rétrograde, modulateur de l'assemblage des SNARES, et est le précurseur de nombreux dérivés qui interviennent eux-mêmes dans la fonction synaptique et surtout dans les mécanismes de neuroinflammation. De plus, sous forme estérifiée dans les phospholipides, c'est un constituant important des membranes y compris neuronales dont le taux est maintenu constant. Ceci suggère un rôle dans les fonctions membranaires elles-mêmes bien que cela soit très mal connu à l'heure actuelle. Plusieurs études, dont celles menées antérieurement dans le laboratoire par le Pr. Jean Luc Olivier, ont montré que sa libération par les oligomères de peptide Aβ active la $cPLA_2$, enzyme responsable de sa libération à partir des phospholipides membranaires et que l'inhibition ou la diminution d'expression *in vitro* et *in vivo* de cette enzyme réduit la toxicité neuronale de ces oligomères. Enfin, les mécanismes de transport au cerveau de l'ARA, provenant de l'alimentation ou de la conversion hépatique de ses précurseurs, sont mal connus. Alors que la concurrence entre précurseurs ω-6 et ω-3 au niveau des Δ5 et Δ6 désaturases pour la synthèse de l'ARA et du DHA a été rapportée par plusieurs auteurs, la possibilité d'une compétition entre ARA et DHA pour les processus de transfert dans le cerveau et l'incorporation dans les phospholipides neuronaux n'est pas connue.

III. Hypothèses de travail

A partir des connaissances publiées dans la littérature et des résultats antérieurs du laboratoire, nous avons posé les trois hypothèses de travail suivantes :

1- Un apport alimentaire supplémentaire en ARA et en LA, en maintenant constants les apports en DHA et ALA, se traduit par une incorporation supplémentaire d'ARA dans les phospholipides membranaires des neurones et des autres cellules du cerveau. L'ampleur de cette incorporation dépend de l'activité d'enzymes et de protéines responsables du transport au cerveau, du passage de la BHE et de l'incorporation dans les cellules cérébrales. En fonction de l'activité de l'ensemble de ces protéines, les individus n'auraient pas la même capacité d'incorporation finale dans les phospholipides neuronaux en présence des mêmes apports alimentaires en AG ω-3 et ω-6.

2- Une incorporation supplémentaire en ARA dans les membranes des neurones et des cellules gliales, en plus de diminuer les taux de DHA neuroprotecteur dans les phospholipides, se traduit par une libération supplémentaire d'ARA non estérifié par la $cPLA_2$ activée par les oligomères de peptide Aβ. Cette libération supplémentaire majore les dysfonctionnements synaptiques et les phénomènes de neuroinflammation.

3- Une expression forte ou une régulation favorable des enzymes responsables de la réincorporation de l'ARA dans le cycle de Lands, en particulier de l'acyl-CoA synthétase 4, limite ces phénomènes délétères. Une expression différentielle de ces enzymes et l'activité des systèmes de régulation conditionnent la sensibilité des individus à la neurotoxicité des oligomères de peptide Aβ.

IV. Objectif de la thèse et plan du travail

A partir des hypothèses présentées ci-dessus, nous nous sommes fixés deux objectifs majeurs dans cette thèse et deux objectifs secondaires :

- Objectif majeur n°1 : déterminer si un apport supplémentaire en ARA par l'alimentation se traduit par une incorporation supplémentaire dans les phospholipides membranaires et préciser la nature de ces phospholipides.

- Objectif majeur n°2 : déterminer si cet apport et cette incorporation supplémentaire en ARA se traduit par une sensibilisation aux effets des oligomères de peptide Aβ sur les capacités mnésiques à court et long terme et sur les marqueurs biochimiques liés à la fonction synaptique et à la neuroinflammation.

- Objectif secondaire n°1 : évaluer le rôle de l'ACSL4 dans les phénomènes d'incorporation et de renouvellement de l'ARA dans les phospholipides cérébraux et l'existence d'éléments soutenant l'hypothèse qu'ACSL4 pourrait contrebalancer l'effet négatif de la $cPLA_2$ dans la réponse aux oligomères de peptide Aβ.

- Objectif secondaire n°2 : évaluer les phénomènes de compétition éventuels entre l'ARA, les AG ω-6 résultant de son élongation et le DHA pour l'incorporation dans les phospholipides cérébraux et identifier les espèces impliquées ainsi que le rôle d'ACSL4.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons tout d'abord mené une étude *in vivo* basée sur l'utilisation de deux régimes : l'un riche en ARA et l'autre comportant plus d'acide oléique. Nous avons examiné les répercussions de ces régimes sur la composition en AG de tissus périphériques (érythrocytes et foie) et de structures cérébrales (cortex et hippocampe). Puis nous avons déterminé les capacités cognitives des animaux après injection ICV d'oligomères de peptide Aβ ou d'une solution saline contrôle. Enfin, nous avons évalué l'expression de marqueurs biochimiques impliqués

dans la fonction synaptique et la neuroinflammation et des enzymes $cPLA_2$ et ACLS4. Dans une seconde partie du travail, nous avons cherché, grâce à des expériences sur un modèle de lignée neuronale, le rôle de l'enzyme ACSL4 en regard d'ACSL6 dans l'incorporation d'ARA et de DHA et dans la croissance neuritique.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I. Etudes animale

A. Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux utilisés pour nos expériences sont des souris mâles Balb/C provenant du laboratoire Janvier (Le Genest St-Isle, France) âgées de 8 semaines au début de l'expérience. Elles ont été hébergées dans une animalerie de stabulation dans des conditions standardisées de température (21 ± 2°C), d'hygrométrie (50 ± 5%) et d'éclairage selon un cycle lumière/obscurité de 12h. Les animaux ont été acclimatés aux conditions d'hébergement pendant au moins deux semaines avant le début des expériences, puis les souris ont été mises en cages individuelles transparentes avec un accès *ad libidum* à l'eau de boisson et à la nourriture. L'animalerie dans laquelle les animaux ont été hébergés et les expérimentations réalisées est sous la responsabilité du Dr. Frances Yen Potin et a été agréée par le comité vétérinaire de Meurthe-et-Moselle (Nancy) sous le numéro d'autorisation A54-547-24. Les procédures d'expérimentation de cette thèse ont été réalisées en accord avec la règlementation française et en conformité avec la directive européenne (2010/63/UE) prenant en compte la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et le bien-être des animaux. Ce projet a été approuvé par le Comité d'éthique lorrain en matière d'expérimentation animale (CELMEA) (demande d'autorisation de projet n°02683.01).

B. Procédure expérimentale

Des souris Balb/c mâles (n=39 par groupe) âgées de 8 semaines ont été soumises à deux régimes alimentaires différents pendant 12 semaines : un régime « ARA » enrichi en ARA et ω-6 et un régime « OLE », plus riche en acide oléique et servant de régime contrôle au régime « ARA ». Ces deux régimes ont été réalisés sur la base du régime 210 commercialisé chez SAFE (*Scientific Animal Food & Engineering*) auquel différentes huiles ont été ajoutées. Les huiles de chanvre, tournesol et colza ajoutées proviennent de l'huilerie d'Ormes (Fermes d'Ormes, Ormes, France)

et le saindoux ajouté est le saindoux utilisé par SAFE pour le régime de base, provenant exclusivement de porc français dont le régime alimentaire est standardisé. L'huile Arasco est commercialisée chez DSM Nutritional Products et a été fournie gracieusement par Monsieur Jean-Claude Gladin (DSM Nutritional Product, Courbevoie, France). Cette huile a été utilisée comme source principale d'ARA pour le régime « ARA ».

La composition en AG des huiles et du saindoux a été mesurée par chromatographie gazeuse (GC) afin d'établir la composition en huile des régimes et de déterminer leur composition théorique en AG. La composition réelle en AG des croquettes des deux régimes a été vérifiée par GC. Les compositions en nutriments, huiles et AG des deux régimes « OLE » et « ARA » sont décrites dans le chapitre 3 consacré aux résultats (Figure 28, Figure 29, Figure 30).

Des prélèvements sanguins ont été réalisés en condition post prandiale et après 6h de mise à jeun avant de commencer les régimes alimentaires décrits précédemment (« OLE » et « ARA »), ainsi qu'à l'issue des 12 semaines de régime. Nous avons suivi la prise alimentaire et le poids des souris chaque semaine pendant toute la durée du régime. Après 10 semaines de régimes, chaque groupe de souris (« OLE » et « ARA ») a été séparé en deux groupes « NaCl » ou « Aβ », pour obtenir au final 4 groupes de 19 ou 20 animaux : « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ ». Nous avons injecté une solution de NaCl ou 0,5 nmol d'oligomères du peptide Aβ dans le ventricule cérébral droit de chaque souris. La mémoire à court terme a été évaluée 4 jours après l'injection à l'aide du test comportemental du labyrinthe en Y et le test de la piscine de Morris a été réalisé de 3 à 14 jours après l'injection pour évaluer l'apprentissage et la mémoire à long terme. Les souris ont été mises à mort 15 jours après l'injection ICV afin de prélever le foie et les différentes structures cérébrales d'intérêt (cortex et hippocampe). Les synaptosomes et extraits protéiques ont été préparés à partir des structures cérébrales et les lipides ont été extraits à partir des érythrocytes, du foie et des structures cérébrales (Figure 24).

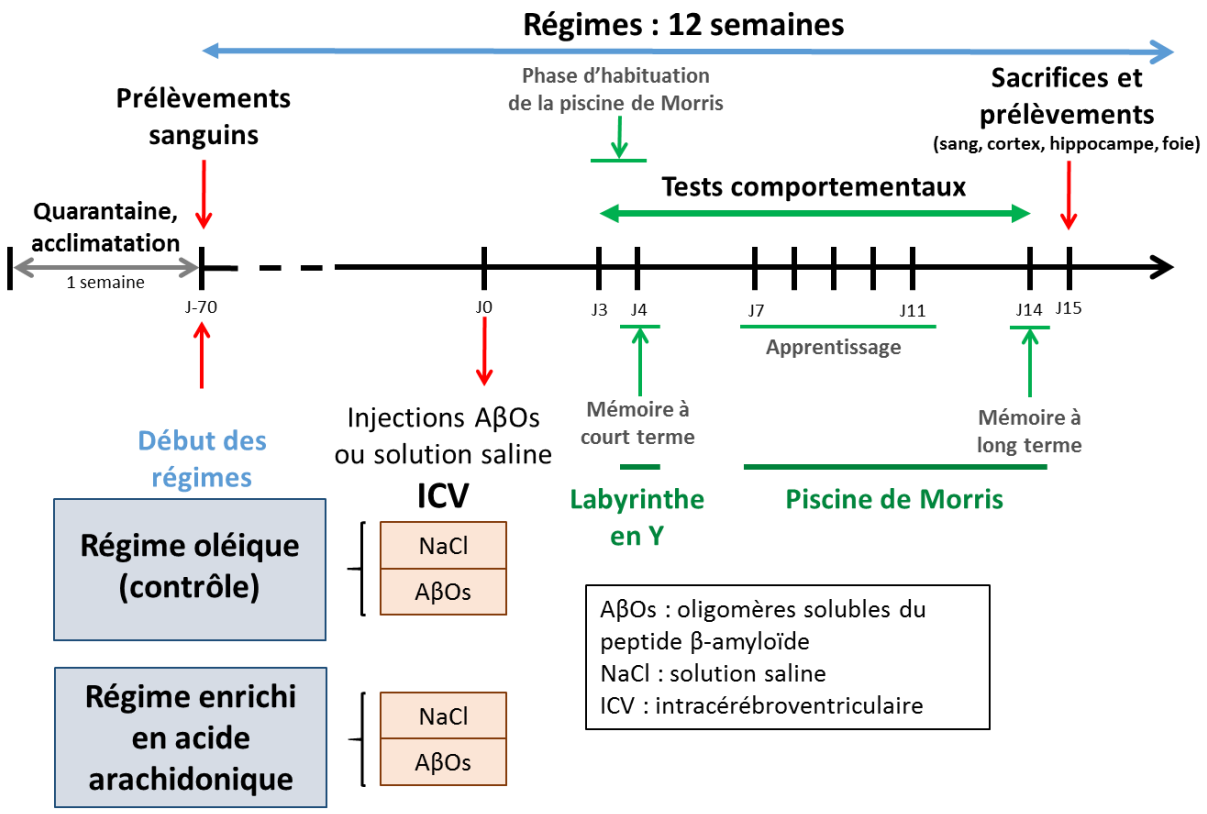


Figure 24 : Protocole expérimentale de l'étude de l'impact d'un régime enrichi en acide arachidonique sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

C. Prise de poids et prise alimentaire

La masse corporelle des souris a été mesurée par pesée de chaque souris une fois par semaine. La prise alimentaire a été mesurée individuellement une fois par semaine par pesée des croquettes restantes et calcul de la différence avec la quantité de croquettes fournies dans la mangeoire en début de semaine.

D. Chirurgie stéréotaxique

1. Préparation des solutions injectables

Le peptide $A\beta_{1-42}$ est fourni par Bachem (France). Les oligomères solubles du peptide $A\beta_{1-42}$ ont été préparés selon la méthode décrite par Pillot *et al.* (1996, 1999). Les peptides ont été solubilisés dans l'hexafluoro-2-propanol (Sigma, France) à une concentration de 5 mg/mL. Au moment de l'utilisation, des aliquots de la solution stock ont été rapidement évaporées sous azote, solubilisées à la concentration voulue

(0,5 nmol dans 1 µL) dans une solution de NaCl à 0,9% (m/v) et conservées en fractions congelées à −20°C afin d'éviter l'agrégation des peptides. Ainsi préparée, la solution d'oligomères solubles d'Aβ contient principalement un mélange de monomères, dimères, trimères et tétramères (Desbène et al., 2012; Pillot *et al.*, 1996, 1999).

2. Anesthésie des animaux

Les injections intracérébrales ont été réalisées sous anesthésie générale induite par un mélange de kétamine (0,8% m/v) et de xylasine (0,1% m/v) dans du sérum physiologique, administré par voie intrapéritonéale à la dose de 1mg de kétamine / 10 g de souris. La profondeur de l'anesthésie a été vérifiée par le réflexe cornéen et le retrait de la patte après pincement interdigital avant de placer l'animal dans l'appareil à stéréotaxie sur un coussin chauffant. L'anesthésie nécessite environ 2h.

3. Injection intracérébroventriculaire

Le protocole adopté pour l'injection ICV a été optimisé préalablement dans l'équipe et a été décrit en détail par Youssef *et al.* (2008). La souris sous anesthésie a été placée dans l'appareil à stéréotaxie muni d'un micro-injecteur automatique (Unimécanique, France). L'intervention chirurgicale a été réalisée en condition d'asepsie. La tête de la souris a été maintenue en place à l'aide d'un système de fixation sagittal grâce à deux barres d'oreilles introduites dans les orifices auditifs et d'un système de fixation frontal grâce à une barre derrière laquelle les incisives de l'animal ont été glissées. Le museau a été maintenu et la position de la tête ajustée de sorte que la hauteur de la surface osseuse soit la même aux points lambda et bregma (Figure 25). La peau de la région dorsale du crâne a été nettoyée avec une solution d'éthanol (70% v/v) puis une incision médiale a été réalisée depuis l'arrière de la ligne interoculaire jusqu'au début de la voûte occipitale. Le crâne a été dégagé puis nettoyé avec un coton légèrement imbibé avec de l'eau oxygénée (3%) afin de faire apparaître les sutures de croissance formant le repère anatomique correspondant au bregma utilisé pour situer les différentes structures cérébrales dans l'espace selon un trièdre de référence. Les vis micrométriques ont permis de positionner la pointe de l'aiguille du

micro-injecteur sur le point bregma et ainsi de définir le point « zéro » à partir duquel les coordonnées stéréotaxiques d'injection ont été calculées. Les coordonnées prises en compte pour le ventricule latéral droit et gauche ont été adaptées dans nos conditions expérimentales d'après celles de l'atlas stéréotaxique de la souris (Paxinos and Franklin, 2001) : antéro-postériorité de +0,22 mm par rapport au plan vertical frontal, latéralité de 1 mm par rapport au plan sagittal médian et profondeur de 2,5 mm par rapport au plan horizontal.

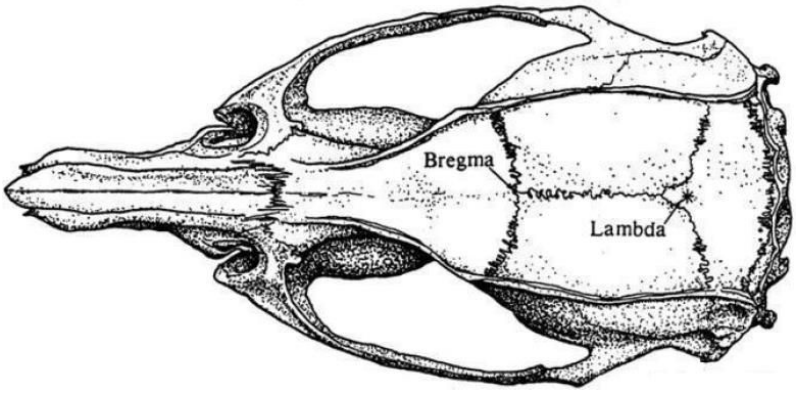


Figure 25 : Repères anatomiques de référence Bregma et Lambda sur le crâne de souris d'après Paxinos and Franklin, 2001

Un petit orifice a été percé dans la voûte osseuse à l'aide d'une fraise d'un diamètre de 0,5 mm en prenant soin d'éviter toute lésion du sinus veineux sagittal supérieur et du réseau capillaire sous-jacent. L'injection a été réalisée avec une seringue Hamilton de 5 µL (Supelco, 800 series, H85RN) équipée d'une aiguille (G26s, point style 3 blunt). Un volume de 1 µL de la solution d'oligomères solubles d'Aβ à 0,5 mM ou de solution saline (NaCl 0,9% m/v) a été injecté dans le ventricule latéral droit à un débit de 1 µL/min. La quantité d'oligomères Aβ solubles du peptide injectée est donc de 500 pmol, insuffisante pour induire l'apparition de dépôts amyloïdes détectables dans le cerveau des souris. A la fin de l'injection, l'aiguille a été laissée en place pendant 2 min afin d'éviter le reflux de la solution injectée, puis retirée doucement. L'orifice a été recouvert d'un film de cire hémostatique (Lukens Bone Wax) et la peau de la région dorsale du crâne a été suturée. La zone de la chirurgie a été désinfectée à l'aide de biseptine pour limiter le risque infectieux. La souris a été placée sur une

plaque chauffante jusqu'au réveil afin d'éviter l'hypothermie. La souris a été replacée en cage individuelle et surveillée régulièrement durant 2 jours après l'opération.

E. Analyses comportementales

Les souris ont été acclimatées dans la pièce de comportement 45 minutes avant les analyses comportementales. Un protocole expérimental précis validé au laboratoire, incluant différentes étapes étalées sur une période de 14 jours post-opératoires, a été suivi pour évaluer les capacités cognitives des souris.

1. Système de capture vidéo

Toutes les analyses comportementales ont été enregistrées à l'aide d'une caméra couplée à un système de capture vidéo (Smart, Bioseb, Vitrolles, France) doté d'un mode « 3 points » détectant la morphologie globale de la souris et discriminant la tête, le centre de gravité et la base de la queue. Ce dispositif permet l'enregistrement et la quantification semi-automatisée des performances comportementales des animaux.

2. Etude de la mémoire de travail ou mémoire à court terme

La mémoire de travail ou mémoire à court terme a été évaluée par le test du labyrinthe en Y, basé sur l'attrait naturel des souris pour l'exploration des environnements nouveaux : l'animal placé dans le labyrinthe explore spontanément le bras le moins récemment visité. Le paradigme d'étude de la mémoire spatiale à court terme ou mémoire de travail est un labyrinthe en Y, composé de 3 bras (notés A, B et C) en plexiglas noir opaque de 40 cm de long, 10 cm de large, 14 cm de hauteur et orientés à 120° les uns par rapport aux autres. Le sol est en plexiglas transparent, sous lequel sont glissées des plaques portant des figures géométriques et servant d'indices spatiaux pour permettre à la souris de distinguer les différents bras (Figure 26).

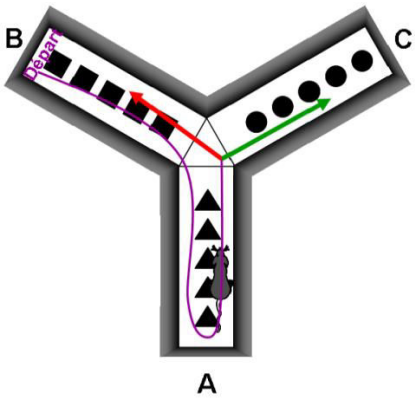


Figure 26 : Schéma du labyrinthe en Y pour évaluer la mémoire à court terme

Le test se déroule en l'absence de l'expérimentateur, dans une pièce insonorisée dont les murs sont occultés par des rideaux noirs afin d'éviter toute interférence avec l'extérieur. Le labyrinthe est éclairé indirectement à faible intensité, environ 10 lux dans chaque bras. Durant les 5 minutes du test, l'animal explore librement le labyrinthe. Il est considéré que l'animal est entré dans le bras lorsque son train arrière passe une ligne fictive située à l'entrée du bras. La séquence des bras visités est enregistrée à l'aide du système d'analyse vidéo. La performance de mémoire à court terme est déterminée par le calcul du pourcentage d'alternance spontanée (Youssef *et al.*, 2008). Une alternance est définie comme la visite successive de trois bras différents du labyrinthe en Y (ABC, BCA, etc). Le pourcentage d'alternance est calculé de la façon suivante :

$$\textit{Alternance}\ (\%) = \left[\frac{\textit{Nombre d'alternances}}{\textit{Nombre d'entrées - 2}}\right] \times 100$$

3. Etude de la mémoire à long terme

La mémoire à long terme et la mémoire spatiale de référence chez le rongeur ont été évaluées par le test de la piscine de Morris. Le dispositif est un réservoir circulaire de 80 cm de diamètre et 60 cm de hauteur, rempli aux deux tiers d'eau opacifiée par un colorant blanc. Ce réservoir contient une plateforme de position fixe, apparente lors de la phase d'habituation, immergée lors de la phase d'apprentissage et retirée lors de la restitution. Le principe de ce test comportemental repose sur le

caractère aversif de l'eau pour les rongeurs et incite l'animal à s'échapper de cet environnement aquatique. L'animal utilise des indices spatiaux extérieurs à la piscine pour repérer sa position et atteindre la plateforme (Morris, 1984). La température de l'eau est la même que celle de la pièce, maintenue entre 19 et 21°C. L'intensité d'éclairage est d'environ 100 Lux.

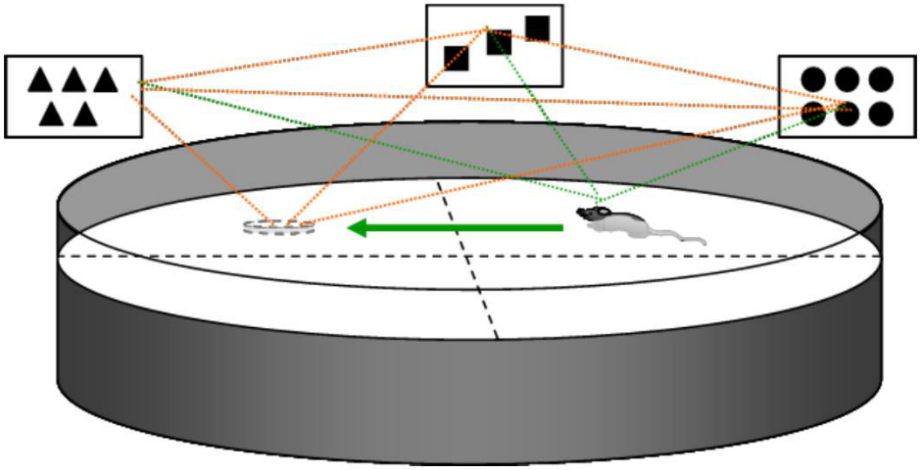


Figure 27 : Schéma de la piscine de Morris pour évaluer la mémoire à long terme

Ce test se déroule en trois phases :

- La phase d'habituation : cette étape vise à familiariser l'animal avec les conditions expérimentales. Dans cette phase, les repères spatiaux sont dissimulés derrière des rideaux noirs. La souris doit rejoindre une plateforme visible dont la position est modifiée à chaque essai. Quatre essais de 1 min et séparés de 45 min sont réalisés quotidiennement sur 2 jours consécutifs.

- La phase d'apprentissage : dans cette étape, l'animal doit élaborer la carte spatiale lui permettant d'établir des relations entre les indices. Dans cette phase, la plateforme est immergée et les repères spatiaux extérieurs à la piscine sont rendus visibles. Afin d'éviter les biais liés à la préférence spontanée de l'animal pour l'un des quadrants de la piscine, les groupes expérimentaux sont subdivisés en sous-groupes. Chaque sous-groupe est entrainé sur différentes positions fixes de plateforme. La phase d'apprentissage dure 5 jours, avec 4 essais quotidiens de 1 minute espacés

de 45 minutes. L'animal est déposé dans l'eau en des positions différentes à chaque essai, selon une séquence prédéterminée empêchant l'élaboration de stratégies non-spatiales. Les paramètres étudiés sont le délai pour rejoindre la plateforme, la distance parcourue et la vitesse de nage. Lorsque la souris possède des capacités cognitives optimales qui lui permettent de mémoriser la tâche, les délais pour atteindre la plateforme doivent diminuer de jour en jour.

- La phase de restitution ou *probe test* : cette étape permet d'évaluer la mémoire à long terme par la trace mnésique persistant trois jours après le dernier test de la phase d'apprentissage qui a permis de la constituer. La trajectoire de l'animal est analysée au cours d'un essai unique de 1 minute effectué dans les mêmes conditions que l'apprentissage. La plateforme a été retirée et l'animal est déposé dans le cadrant opposé à la plateforme. Le délai d'entrée dans le quadrant de la plateforme, le délai du premier passage à l'emplacement de la plateforme, le pourcentage de temps passé dans les différents quadrants de la piscine et la vitesse de nage sont les paramètres étudiés lors de cette phase.

F. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins chez la souris ont été réalisés par la voie sous-mandibulaire sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (Mundipharma, France). La veine a été percée à l'aide d'une aiguille (Ø 0,60 ; 23G x 1¼") et un volume d'environ 100 µL de sang a été récupéré à chaque prélèvement dans un tube en polypropylène contenant 5% d'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA, sigma, France). Le plasma a été immédiatement récupéré après une centrifugation de 5 minutes à 12 000 x g et à 4°C. Le plasma et le culot érythrocytaire ont été conservés à -80°C jusqu'aux analyses ultérieures.

G. Prélèvements des structures cérébrales et du foie

Les souris ont été anesthésiées sous une dose létale d'isoflurane (Mundipharma, France) dans une dans une hotte d'aspiration attenante au box d'hébergement. Après décapitation, les deux hémisphères cérébraux ont été aussitôt disséqués pour prélever l'hippocampe et le cortex. Ces structures isolées ont été alors congelées dans des tubes en polypropylène dans l'azote liquide. Après laparotomie, le foie a été prélevé et congelé dans un tube en polypropylène dans l'azote liquide. Les structures cérébrales et le foie ont été conservés à -80°C jusqu'aux analyses ultérieures.

1. Extraction lipidique des structures cérébrales et du foie

Les extractions lipidiques à partir des structures cérébrales et du foie ont été réalisées sur la glace. Après dissection, les structures cérébrales et le foie ont été placées dans des tubes de 50 mL contenant 2 mL d'eau distillée. Les tissus ont été alors dissociés avec une seringue munie d'une aiguille (O 0,60 ; 23G x 1.''). Conformément à la technique de Folch (Folch *et al.*, 1957), 15 mL de solvant d'extraction (chloroforme:methanol 2:1,hydroxytoluene butyle 0,0015%, v/v) ont été ajoutés puis les tubes ont été agités vigoureusement au vortex durant 1 min précise et enfin centrifugés 10 minutes à 850 *x g*. La phase supérieure et l'interface de chaque tube ont été séparées de la phase inférieure organique. Les phases supérieures ont été extraites une deuxième fois et les nouvelles phases organiques ont été collectées puis rassemblées avec les premières. Les extraits lipidiques de chaque échantillon ont été séparés en deux tubes, un premier tube destiné aux analyses par GC et un second aux expériences de chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) en tandem (LCMSMS). Pour les analyses en GC, le volume d'extrait lipidique a été adapté à la nature de l'échantillon (Hippocampe : prise d'essai 50µL ; Cortex : 100µL ; foie : 20µL), repris dans 2 mL d'un mélange méthanol:dichlorométhane (3:1, v:v) et conservé à -20°C pour les analyses de GC pour des analyses ultérieures. Le contenu du second tube a été évaporé et conservé à -20°C pour analyser les espèces de phospholipides par LCMSMS. Le résidu sec a été

remis en solution dans 200 µL d'un mélange chloroforme:méthanol (2:1) juste avant l'analyse par LCMSMS. Les techniques de GC et de LCMSMS sont décrites ci-dessous (paragraphes III-B et III-C).

2. *Préparation de fractions enrichies en synaptosomes*

Le protocole de purification des fractions membranaires riches en synaptosomes a été développé et optimisé au laboratoire à partir de celui décrit par Fleck *et al.* (2001). Les structures cérébrales isolées ont été homogénéisées à l'aide d'un broyeur de type Potter dans un tampon d'homogénéisation (10 mM Tris pH 7,4, 0,32 M saccharose, 2mM EDTA). L'homogénat a été centrifugé pendant 10 minutes à 750 x g et à 4°C. Les surnageants résultant de la centrifugation ont été à nouveau centrifugés pendant 20 minutes à 12 000 x g et à 4°C. Le culot final contenant les synaptosomes a été remis en suspension dans le tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*) à pH 7,4 (Gibco, France) et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse des échantillons par Western blot et par ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

3. *Préparation des homogénats*

Les structures cérébrales isolées ont été placées dans un tampon de lyse RIPA (25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet NP-40, 1% (m/v) sodium desoxycholate, 0,1% (m/v) SDS, 1mM PMSF, 1 mM Na_3Vo_4, et le cocktail d'inhibiteurs « *Complete* » (Roche, France)). Le volume de tampon utilisé a été ajusté à la taille de la structure cérébrale préparée (500 µL pour le cortex, 200 µL pour l'hippocampe). Les tissus ont été dissociés à l'aide d'une pipette à cône bleu puis à cône jeune, et enfin avec une seringue munie d'une aiguille (Ø 0,60 ; 23G x 1¼''). Les échantillons sont ensuite soumis à 2 cycles de congélation (azote liquide) et décongélation (bain-Marie à 37°C) puis centrifugés 30 minutes à 10 000 x g et à 4°C. Les surnageants contenant les protéines ont été récupérés et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse par Western blot.

II. Etudes *in vitro*

A. Origine et choix de la lignée cellulaire

Les cellules HT22 utilisées pour les études *in vitro* ont été gracieusement fournies à notre laboratoire par le Professeur Axel Methner (Forschungszentrum Translationale Neurowissenschaften, Rhein-Main-Neuro-Zentrum, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Mainz, Germany). Les cellules HT22 sont des cellules de neuroblastomes issues d'hippocampes de souris qui ont été fréquemment utilisées dans le champ des neurosciences comme nous le verrons dans les résultats.

B. Entretien de la lignée HT22

Le protocole d'entretien de la lignée de neuroblastome HT22 avant différenciation a été le suivant : au stade de sub-confluence, le milieu de culture et les éventuelles cellules mortes sont soigneusement aspirés. Les cellules sont ensuite détachées du fond de la flasque de culture à l'aide de la solution Trypsine/EDTA (Invitrogen, France). Après dislocation complète du tapis cellulaire, la trypsine est inhibée par addition du même volume de milieu de croissance composé de DMEM *high glucose* (Gibco, France) additionné de 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) et de 10 UI/mL de Pénicilline/Streptomycine (Invitrogen). La suspension ainsi obtenue est soumise à une centrifugation de 5 minutes à 740 x g et le culot résultant est remis en suspension dans du milieu de croissance frais. 1/10e de la suspension cellulaire est placée dans une nouvelle flasque complétée avec du milieu de croissance et incubée à 37°C.

L'entretien de la lignée a été réalisé 2 fois par semaine. Pour l'ensemencement des cellules en plaque, une fraction de la suspension cellulaire a été prélevée pour la numération cellulaire en cellule de Thoma. De nouvelles cultures ont été alors ensemencées à 500 000 cellules par puits dans des plaques 6 puits pour les analyses protéiques et lipidiques et à 250 000 cellules par puits dans des plaque 6 puits pour les observations au microscope optique.

C. Congélation des stocks de cellules

Après amplification suffisante pour assurer le stock, nous avons appliqué le protocole suivant : les cellules HT22 sont décollées par trypsination et la suspension obtenue est centrifugée (5 min, 740 x g). Le culot obtenu est ensuite remis en suspension dans un milieu de cryopréservation composé de DMEM *high glucose*, 10 % de SVF et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO, sigma, France), puis conditionné en cryotubes (1 mL). La température des cryotubes est alors lentement descendue à -80°C à l'aide d'un bain d'isopropanol (Sigma) dans une boîte de congélation (Mr Frosty™). Une fois cette température atteinte, les cryotubes sont plongés dans l'azote liquide pour une conservation à long terme.

D. Conditions de culture

Toutes les manipulations ont été effectuées en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et à l'aide de matériel stérilisé ou à usage unique. Les différents traitements des cellules HT22 ont été réalisés dans le milieu DMEM *high glucose*.

1. Différenciation des cellules HT22

Le milieu de croissance a été retiré 24h après l'ensemencement des cellules en plaque 6 puits et remplacé par le milieu de différenciation composé de DMEM *high glucose, de* 50 ng/mL de *Nerve growth factor* (NGF 2.5S *subunit,* Invitrogen*, France)*, 100 µM de *dibutyryl cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP) (Sigma), 100 µM phorbol 12,13-dibutyrate (Sigma) et du supplément N2 (Invitrogen). Ce traitement permet aux cellules HT22 d'acquérir des caractéristiques neuronales.

2. Traitement des cellules HT22 par les acides gras

L'ARA et le DHA (Sigma) sont repris dans le DMSO et conservés à -20°C, à l'obscurité et sous azote gazeux afin de limiter les réactions d'oxydation. Après 24h ou 48h de différenciation, le milieu de différenciation est supplémenté par une concentration

de 5 µM de DHA et d'ARA en présence d'albumine délipidée (0,1% v/v) avec une concentration de DMSO fixée à 0,5% (v/v).

3. Transfection des cellules HT22 par les siRNA

Les siRNA ont été centrifugés, repris dans de l'eau *nuclease-free* à une concentration stock de 50 µM et conservés sous forme d'aliquot à -20°C afin d'éviter les cycles congélation/décongélation répétés.

Le jour de la transfection, les siRNA contrôles ou ciblant l'ACSL4 (Life Technologies, France) ont été préalablement mélangés dans du milieu OptiMEM® (Gibco, France) puis homogénéisés délicatement par reflux. L'agent de transfection Interferrin® (Polyplus Transfection, France) a été ajouté dans le mélange précédent dans les quantités recommandées par le fournisseur et le mélange est immédiatement vortexé pendant 10 secondes. Le complexe siRNA/Interferrin® a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante afin que les liposomes se forment et encapsulent les siRNA. Le milieu de culture a été éliminé des plaques de culture et remplacé par du milieu « frais ». Les siRNA ont été ensuite ajoutés dans les puits à une concentration finale de 5 nM.

E. Extraction des lipides des cellules HT22

Pour un échantillon, les extractions lipidiques ont été réalisées à partir de 5 puits de plaque 6 puits. Les lipides ont été extraits des cellules selon la technique de Blight et Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Les cellules ont été rincées avec le tampon PBS (Gibco, France) et détachées du support plastique puis centrifugées 5 minutes à 3000 x g. Le culot a été resuspendu dans du PBS (Gibco, France), centrifugé à nouveau 5 minutes à 2440 x g et repris dans 100 µL de PBS (Gibco, France). Un volume de 375 µL de solvant choloroforme:méthanol (1:2) a été ajouté aux 100 µL de suspension cellulaire puis l'échantillon a été vortexé pendant 5 minutes. Un volume de 125 µL de chloroforme a été ajouté et le tube à nouveau vortexé pendant 1 minute. Après ajout de 125 µL supplémentaire, l'échantillon a été de nouveau agité au vortex pendant 1

minute. Les échantillons ont été centrifugés à 2000 RPM pendant 10 minutes et les phases inférieures organiques contenant les lipides ont été prélevées. Les phases organiques ont été évaporée sous azote et conservée à -20°C. Les échantillons ont été resolubilisés dans 200 µL de chloroforme:méthanol (2:1) juste avant les analyses d'espèces phospholipidiques par LCMSMS.

F. Préparation des protéines des cellules HT22

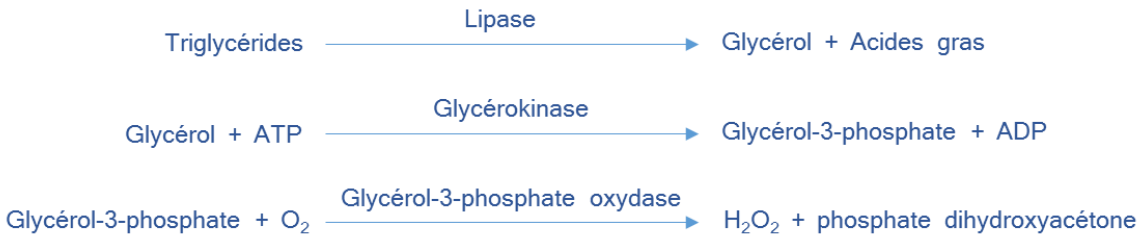
Le milieu de culture de chaque puits a été délicatement aspiré puis les puits ont été lavé avec du PBS à trois reprises. Le PBS a été aspiré des puits et 200 µL de tampon de lyse RIPA (25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet NP-40, 1% (m/v) sodium desoxycholate, 0,1% (m/v) SDS, 1mM PMSF, 1 mM Na_3Vo_4, et le cocktail d'inhibiteurs « *Complete* » (Roche, France)) ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque de culture a été placée sur de la glace pendant 10 minutes puis les cellules ont été grattées et transférées dans des tubes en polypropylène. Les échantillons ont été ensuite soumis à 2 cycles de congélation (azote liquide) et décongélation (bain-Marie à 37°C) puis centrifugés 30 minutes à 10 000 x g et à 4°C. Les surnageants contenant les protéines ont été récupérés et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse par Western blot.

III. Analyses biochimiques

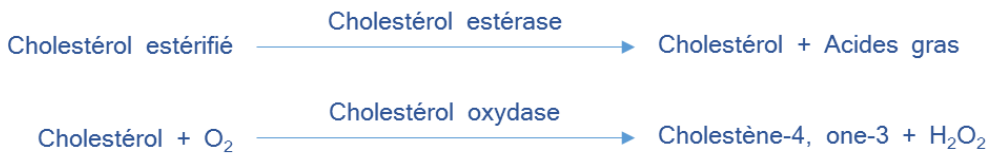
A. Dosages plasmatiques

Les triglycérides et le cholestérol total ont été dosés à l'aide des kits enzymatiques de BioMérieux (Cholestérol et Triglycérides RTU™, France). Les dosages ont été réalisés selon les recommandations du fabricant. Un standard (Unitrol™) de concentration connue et un calibrant multiparamétrique (Calimat™) dont le titre est connu ont été utilisés. Après mesure de l'absorbance (Densité optique), la concentration de l'échantillon a été calculée en utilisant la concentration du Calimat™ comme référence.

Le kit de dosage des triglycérides repose sur le principe et la suite de réactions enzymatiques suivantes :



Le kit de dosage du cholestérol repose sur le principe et les réactions enzymatiques suivantes :



Le peroxyde d'hydrogène formé à l'issue de ces réactions est dosé par la réaction de Trinder, l'absorbance à 505 nm étant proportionnelle à la quantité de chaque type de lipide dans l'échantillon.

B. Analyse des acides gras par chromatographie gazeuse

Les AG ont été dosés par GC par le Docteur Marie-Christine Escanyé, dans le service de Biochimie du Pr. Jean Luc Olivier (Hôpital Central, CHRU de Nancy).

Les échantillons ont été préparés par transestérification selon (Lepage and Roy, 1986). Pour les érythrocytes, 2 mL d'un mélange méthanol:dichlorométhane (3:1, v:v) ont été ajoutés à 50µL de culots érythrocytaires. Puis, 200 µL de chlorure d'acétyle ont été ajoutés à chaque échantillon et les tubes bouchés placés 1 h dans un bain à sec à 100°C (+/- 5°C). Après refroidissement, la réaction de transestérification a été arrêtée par l'addition de 5mL d'une solution de carbonate de potassium à 6%. Après avoir ajouté 2mL d'hexane et homogénéisé vigoureusement chaque échantillon durant 1 minute, les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 2000 tours par minute (RPM) et à 4°C. Le surnageant organique a été transféré dans un tube propre et 2 mL d'acétonitrile ont été ajoutés. Après une nouvelle homogénéisation, les tubes ont été centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment. La phase supérieure a été

récupérée dans un tube propre et évaporée à sec sous azote. Le résidu obtenu a été solubilisé dans 50 µL d'hexane avant l'injection dans l'appareil de GC.

Les extraits lipidiques des autres tissus (foie, structures cérébrales) ont été additionné d'un volume de 200 µL de chlorure d'acétyle puis traités comme décrit ci-dessus pour les culots érythrocytaires. Les résidus obtenus ont été solubilisés dans un volume adapté d'hexane (50µL pour les hippocampes, 100µL pour les cortex et 100µL pour les foies) pour doser les AG par GC.

Les échantillons transestérifiés en présence de chlorure d'acétyle et solubilisés dans un volume adapté d'hexane sont injectés dans le chromatographe Clarus 480, Perkin Elmer muni d'un injecteur automatique. Le volume d'injection est de 4µL. Les AG estérifiés sont séparés sur une colonne DB23 ((50%-cyanopropyl-phényl)-méthylpolysiloxane) de dimensions 30 m x 0,32 mm x 0,25 mm (Agilent Technology ; Massy, France) et analysés après détection par ionisation de flamme. La température de l'injecteur est fixée à 270°C et celle du détecteur à 280°C, tandis que celle du four à colonne, initialement à 170°C, augmente progressivement de 2.8°C/min puis 0.1°C/min pour atteindre 230°C. Le gaz vecteur est l'azote, pression 4 bars. La pression en tête de colonne est de 40kpa. Les différents pics obtenus sont intégrés à l'aide du système d'exploitation de données EZChrom Elite. Les pics sont quantifiés à partir de gammes étalons entre 25 et 100 µg/mL des principaux AG (acides palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique, α-linolénique, arachidonique, eicosapentaénoïque, docosatétraénoïque et docosahexaénoïque ; Sigma). Les résultats obtenus, représentant la quantité de chaque AG dans le tube, ont été calculés et présentées comme un pourcentage de chaque AG dans l'extrait, en considérant que les dix AG dosés représentent 100%.

C. Analyse des espèces phospholipidiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

L'analyse qualitative et semi-quantitative des espèces phospholipidiques a été réalisée par LCMSMS par Cédric Paris (Laboratoire LIBIO, ENSAIA, Vandœuvre-lès-

Nancy) sur un système UHPLC-MS (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) comprenant une pompe quaternaire, un détecteur classique à barrette de diodes ainsi qu'un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation et d'un analyseur de type trappe ionique linéaire (LTQ : *Linear Trap Quadrupole*).

16µL des échantillons repris dans 200µL du mélange chloroforme:méthanol (2:1) ont été injectés sur le système. Les lipides polaires ont été séparés sur une colonne LiChroCART, LiChrospher 100 Diol, 250x2 mm, (5 µm) avec une pré-colonne LiChrospher 100 Diol, 10x2 mm, (5 µm) (Merck, Darmstadt, Germany). Le chloroforme a été utilisé pour la phase mobile A. La phase mobile B est constituée de méthanol avec 0,1% (v/v) d'acide formique, de l'ammoniaque pour un ajustement du pH à 5,3 et 0,05% (v/v) de triethylamine. La séparation a été obtenue selon le programme en mode binaire suivant : premier gradient linéaire de 95% à 70% de phase mobile A (11 minutes), suivi d'un deuxième gradient linéaire de 70% à 20% de phase mobile A (3 minutes) et pour terminer un plateau à 20% de phase mobile A (4 minutes). La durée totale de la méthode est de 30 minutes (phase d'équilibrage comprise), le débit de 0,3 mL/min et la température de colonne de 30°C.

Suite à l'étape de séparation dans la colonne, les composés d'intérêt sont entrainés par la phase mobile jusqu'au bloc source du spectromètre de masse où ceux-ci sont ionisés grâce à la sonde d'électronébulisation opérant en mode négatif (ESI négatif). Les paramètres d'ionisation sont les suivants : le potentiel de l'aiguille métallique d'électronébulisation est de -4,5 kV, la température du capillaire de transfert est de 230°C. Les paramètres d'optique ionique ont été optimisés par perfusion d'une solution standard de phospholipides en mélange, cela afin de maximiser le signal MS des composés d'intérêt (mode ESI négatif). La résolution en masse est de 0,2 Da. En plus d'un balayage MS entre 100 et 2000 m/z pour l'observation des ions parents, des fragmentations MS2 et MS3 ont été conduites de façon manuelle afin d'obtenir des informations structurales sur les différentes classes de phospholipides. L'interprétation des spectres MS2 et MS3 (selon les classes considérées) a donc permis d'élucider la

nature des espèces c'est-à-dire de connaitre la composition en AG de chacun des phospholipides considérés.

D. Dosage protéique

La concentration des protéines dans les échantillons a été mesurée à l'aide du kit BCA (BC Assay Protein Quantification Kit, Thermo Scientific, France) en suivant les recommandations du fabricant. Le dosage a été réalisé en microplaque et l'intensité de la coloration a été mesurée par absorbance à 570 nm. La concentration protéique des échantillons a été calculée à partir d'une gamme d'étalonnage entre 25 et 2000 µg/mL d'albumine précisément titrée.

E. Enzyme-linked immunosorbent assay

Les taux de la protéine C réactive (CRP) ont été mesurés à l'aide du kit Quantikine®ELISA MCRP00 (R&D System, Abingdon, Royaume-Uni). Les taux des protéines synaptiques SNAP25 et PSD95 ont été mesurés à l'aide des kits USCN (Wuhan Chine, revendeur français Euromedex, Souffelweyersheim France) SEG-168Mu, SEC-955Mi (Wuhan Chine, revendeur français Euromedex, Souffelweyersheim France) basés sur le principe de la méthode immuno-enzymatique ELISA en sandwich. Les kits consistent en une plaque pré-coatée avec un anticorps spécifique des protéines CRP, SNAP25 ou PSD95.

Le protocole général est le suivant : les standards ou les échantillons sont ajoutés dans les puits avec un anticorps spécifique à SNAP25 conjugué à la biotine et incubés. L'avidine conjuguée à la peroxydase de raifort est ajoutée dans les puits et incubée. Après addition du substrat Tetramethylbenzidine, seuls les puits contenant SNAP25, PSD95 ou CRP, l'anticorps conjugué à la biotine et l'enzyme conjuguée à l'avidine vont développer un changement de couleur. La réaction enzyme-substrat est stoppée par l'addition de l'acide sulfurique et le changement de couleur est mesuré par spectrophotométrie. La concentration en CRP, SNAP25 ou PSD95 est déterminée en comparant la valeur de densité optique des échantillons à la courbe des standards. Les

kits ELISA mesurant les protéines PSD95 et SNAP25 proviennent de Euromedex (France) et le kit ELISA mesurant la CRP provient de Biotechne (R&D system, Royaume Uni).

F. Analyses par Western blot

1. Electrophorèse

Les protéines ont été tout d'abord séparées par électrophorèse dénaturante en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium) dans un système de migration verticale (Bio-Rad, France). Des gels de 1,5 mm d'épaisseur ont été préparés, composés d'un gel de concentration à 5% de polyacrylamide en tampon (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (m/v) SDS) sur un gel de séparation de 8 à 12% de polyacrylamide selon la masse moléculaire des protéines d'intérêt, en tampon (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% (m/v) SDS). Les échantillons ont été, avant leur dépôt, dénaturés à 95°C pendant 5 min dans du tampon de dénaturation (125 mM Tris-HCl, pH 8,0, 4% (m/v) SDS, 10% (v/v) β-mercaptoéthanol, 0,004% (m/v) bleu de bromophénol). L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon de migration (1,5 M Tris-HCl, pH 8,3, 19,2 mM glycine, 0,01% (m/v) SDS), à 50 V lors de la concentration puis à 120 V.

2. Electrotransfert

Les protéines séparées ont été transférées sur des membranes de difluorure de polyvinylidène. Les membranes ont été humidifiée dans le méthanol durant 20s, puis équilibrées dans le tampon de transfert (48 mM Tris-HCl, pH 9,2, 39 mM glycine, 1,3 mM SDS, 20% (v/v) éthanol) durant 2 min. À l'issue de la migration électrophorétique, les gels ont été rincé durant 1 min dans le tampon de transfert avant d'être placé au contact des membranes entre deux feuilles de papier Whatmann™ imbibées de tampon de transfert. L'ensemble gel-membrane-papiers Whatmann a été disposé dans une cellule de transfert liquide (Bio-Rad, France), au sein de laquelle les protéines migrent du gel vers la membrane sous une intensité constante de 350 mA pendant 50 min.

3. *Immunorévélation des protéines*

Après électrotransfert, les membranes ont été immergées dans une solution de blocage (2 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20, 5% (m/v) lait écrémé en poudre). Après saturation, les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage à 4°C (Tableau I) et sous agitation orbitale durant la nuit. Après 3 passages de 5 min dans la solution de lavage (2 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20), elles ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (Tableau II) durant 1h à température ambiante. Après les lavages et l'incubation dans le réactif de détection (Supersignal HRP Substrate, Merck Millipore, France), les membranes ont été placées dans un système d'acquisition d'images Fusion FX5 (Vilber Lourmat) permettant de numériser l'image et visualiser le signal lié à la protéine d'intérêt. Les analyses densitométriques ont été réalisées grâce au logiciel ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), permettant l'exploitation semi-quantitative des résultats.

Tableau I : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages

Protéine ciblée	Anticorps primaires				Anticorps secondaires	
	Origine	Dilution	Fournisseur	Référence	Origine	Dilution
Fonction synaptique						
SNAP25	Chèvre	1/500	Santa Cruz	sc 7538	Lapin	1/2000
PSD95	Lapin	1/1000	Cell Signaling	2507	Chèvre	1/2000
GLUR1	Lapin	1/1000	Cell Signaling	13185	Chèvre	1/2000
GLUR2	Lapin	1/1000	Cell Signaling	5306	Chèvre	1/2000
GLUR3	Lapin	1/1000	Cell Signaling	4676	Chèvre	1/2000
GLUR4	Lapin	1/1000	Cell Signaling	8070	Chèvre	1/2000
Inflammation						
GFAP	Souris	1/1000	Millipore	MAB360	Cheval	1/2000
Activation des acides gras						
ACSL4	Lapin	1/1000	Santa Cruz	sc 134507	Chèvre	1/2000
ACSL6	Lapin	1/1000	Santa Cruz	sc 134498	Chèvre	1/2000
Marqueur de charge						
β-tubuline	Souris	1/10 000 sur homogénats	Sigma	071M4830	Cheval	1/20 000
		1/2000 sur HT22				1/2000

Tableau II : Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages

Cible antigénique	Anticorps secondaires			
	Origine	Dilution	Fournisseur	Référence
IgG de lapin	Chèvre	1/500	Cell Signaling	7074
IgG de souris	Cheval	1/1000	Cell Signaling	7076
IgG de chèvre	Lapin	1/1000	Santa Cruz	sc 2922

IV. Analyses statistiques

Les analyses statistiques nécessaires à l'interprétation des études détaillées dans cette thèse ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview, en accordant classiquement une significativité lorsque le risque d'erreur p est égal ou inférieur à 5%. La normalité des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Les données suivant une loi normale ont été analysées par des statistiques paramétriques (t de Student, ANOVA). Les données présentées sont exprimées en moyenne ± ESM (erreur standard à la moyenne) pour toutes les analyses.

Chapitre 3 : Résultats

I. Impact d'un régime enrichi en acide arachidonique sur les phospholipides membranaires, la fonction synaptique et la sensibilité au stress amyloïde chez la souris

A. Introduction

La maladie d'Alzheimer est définie par une atteinte des capacités cognitives reflétant la perte neuronale et synaptique. Le peptide Aβ est l'un des agents cellulaires principaux responsables de cette neurodégénérescence. La plasticité synaptique, qui permet le développement de la mémoire, se caractérise par une réorganisation des membranes synaptiques et notamment par le recyclage des phospholipides membranaires. La composition en AGPI des membranes neuronales et notamment l'équilibre entre les ω-6 et les ω-3 est cruciale pour le bon fonctionnement synaptique. Dans cette première partie de notre travail, nous avons étudié l'impact d'un régime enrichi en ARA sur un modèle de souris mimant la phase précoce de la MA afin de comprendre le rôle de l'ARA dans les fonctions cognitives et son influence sur la sensibilité au peptide Aβ.

B. Composition des régimes

Des souris Balb/c mâles (n=39 par groupe) âgées de 8 semaines ont été soumises à deux régimes alimentaires différents pendant 12 semaines : un régime « ARA » enrichi en ARA et ω-6 et un régime « OLE » servant de régime contrôle au régime « ARA ». Les compositions en AG de l'huile Arasco, des huiles de chanvre, de tournesol et de colza provenant d'Ormes et du saindoux utilisé par SAFE pour le régime de base (210) ont été déterminées par GC (Figure 28).

Cette analyse nous a permis d'établir la composition en huiles des croquettes et leur composition théorique en AG (Figure 29). Les deux régimes contiennent 10% de lipides soit environ 23% de l'apport énergétique. Ces régimes sont plus riches en lipides que les régimes murins standards (5-6% en poids, 14% en énergie) mais ne peuvent

pas être considérés comme des régimes hyperlipidiques ou « high fat » (Ramakers *et al.*, 2008).

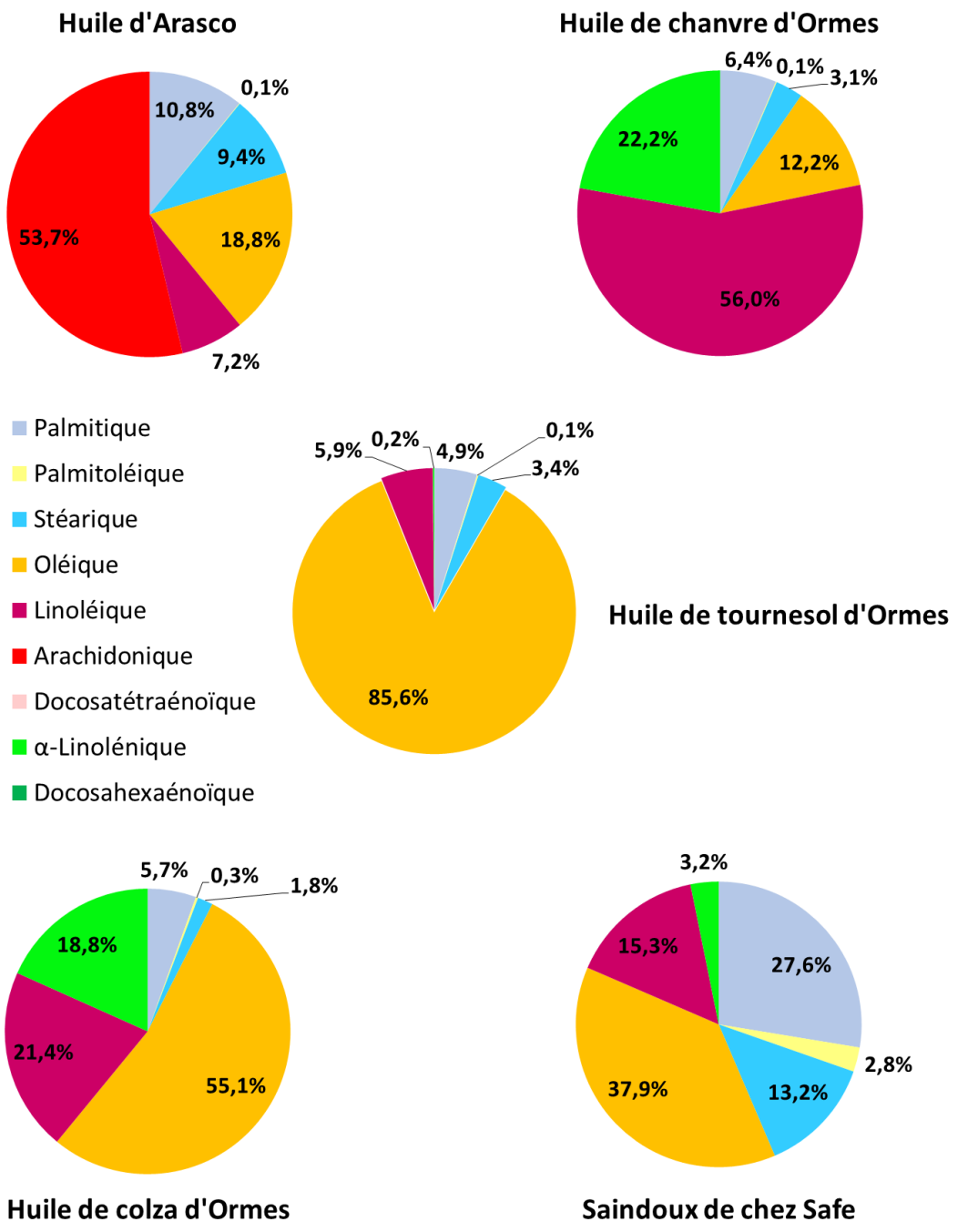


Figure 28 : Composition en acides gras des huiles et du saindoux

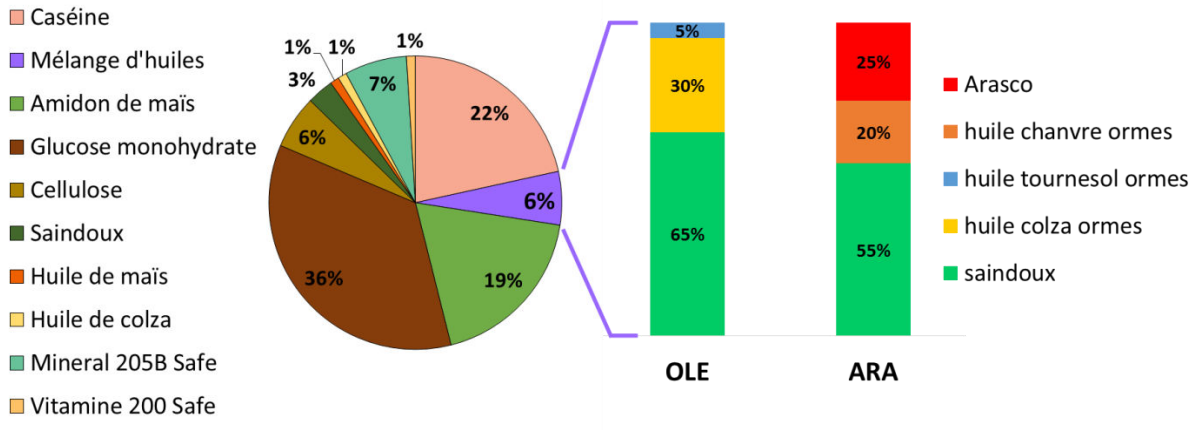


Figure 29 : Composition en nutriments et en huiles ou saindoux des régimes « OLE » et « ARA » (en %)

Les compositions en AG des croquettes ont été vérifiées après leur élaboration et leur livraison par le fournisseur et trouvées conformes aux prévisions. Cela indique que le processus de fabrication n'a pas altéré les AG des composants. Les croquettes des deux régimes ont été conservées à 4°C et à l'abri de la lumière. Afin d'évaluer la survenue d'éventuelle oxydation des AGPI, les profils d'AG totaux ont été déterminés sur les croquettes conservées à 4°C au début et à la fin de l'étude ainsi que sur des croquettes laissées à température ambiante dans l'animalerie durant 7 jours. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les profils de ces différents lots de croquettes pour les deux régimes « OLE » et « ARA » (données non présentées).

Les deux régimes contiennent des apports sensiblement identiques en AG saturés (33,4% pour « OLE » et 32,9% pour « ARA ») et AG insaturés (66,6% pour « OLE » et 67,1% pour « ARA »). Le régime « ARA » est un régime riche en ARA : il contient 11,5% d'ARA contre 0,2% dans le régime « OLE ». Ce régime « ARA » est aussi légèrement plus riche en LA, précurseur des ω-6 avec 20,4% contre 15% pour le régime « OLE » sans que la différence soit caricaturale. Le taux d'acide docosatétraénoïque (DTA) ne diffère pas de façon marquée entre les régimes « OLE » (0,10%) et « ARA » (0,13%). En ce qui concerne les ω-3, le régime « ARA » est légèrement plus riche en DHA et ALA (6,2%) que le régime « OLE » (5,9%), ces taux dépassant largement les besoins journaliers en ω-3 chez la souris (Amtul *et al.*, 2012). Le régime « ARA » apporte plus de DHA que le régime « OLE » (0,9% contre 0,2%)

et une proportion équivalente d'ALA (5,3% contre 5,7%) (Figure 30). Par conséquent, le ratio ω-6/ω-3 est de 5,1 pour le régime « ARA » et de 2,6 pour le régime « OLE ». Le ratio de 5 est le ratio recommandé actuellement par l'ANSES en nutrition humaine et celui de 1 serait celui qui aurait pu être atteint dans des populations préhistoriques humaines vivant dans des régions maritimes (Simopoulos, 2011). Afin de compenser l'apport supplémentaire en ARA et précurseur d'ω-6, la quantité d'acide oléique a été diminuée dans le régime « ARA » (27,3%) par rapport au régime « OLE » (43,7%) sans toucher les proportions d'AG saturés et d'AGPI ω-3. La plus grande proportion d'acide oléique dans le régime alternatif au régime « ARA » a amené à le désigner sous le terme de régime « OLE ». Dans ce dernier régime, la proportion d'AG monoinsaturés (acides oléique et palmitoléique) est donc plus importante que celle des AGPI (ω-3 et ω-6), contrairement au régime « ARA » (Figure 30).

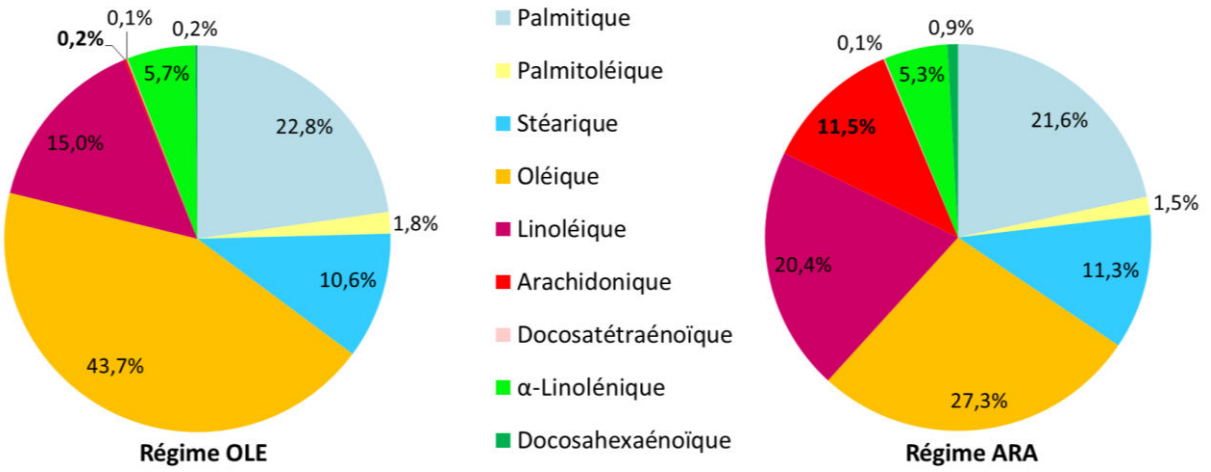


Figure 30 : Répartition des acides gras dans les régimes « OLE » et « ARA » mesurés par chromatographie gazeuse (en % des acides gras totaux)

Avant d'être placées sous régime « OLE » ou « ARA », les souris ont été nourries avec le régime « standard » habituellement utilisé au laboratoire provenant de chez Harlan Laboratories (Gannat, France). Des prélèvements sanguins ont été réalisés sur les souris nourries avec ce régime « standard » (avant l'étude des régimes « OLE » et « ARA ») afin de comparer la répartition des AG dans les érythrocytes des souris sous ce régime « standard » par rapport aux souris après l'étude des régimes « OLE » et « ARA ». L'apport lipidique du régime « standard » est de 6,2% en poids

et 18% en énergie. La composition en AG de ce régime est de 16,3% d'AG saturés, 21% d'acides monoinsaturés (ou acide oléique), 56,4% de précurseur ω-6 et 5,5% de précurseur d'ω-3, avec un ratio ω-6/ω-3 de 10, soit deux fois plus élevé que dans le régime « ARA ». Seule la composition en ALA est similaire entre le régime « standard » et nos deux régimes d'étude (Figure 31).

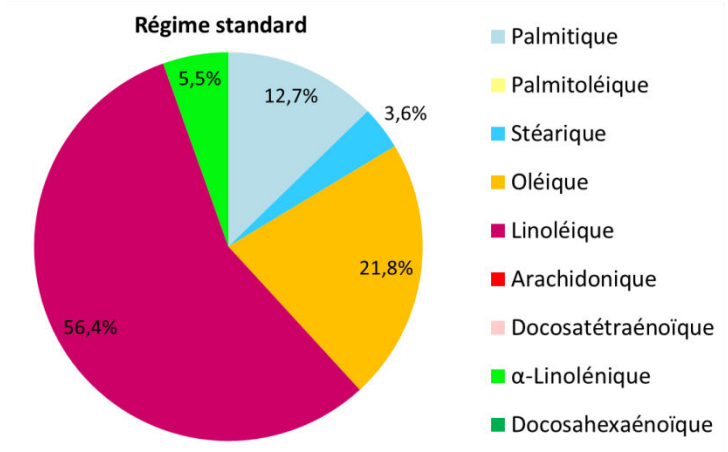


Figure 31 : Répartition des acides gras dans le régime « standard » mesurée par chromatographie gazeuse (en % des acides gras totaux)

C. Résultats

1. *Impact des régimes sur la prise alimentaire et le poids des souris*

La prise alimentaire et le poids des souris ont été suivis tout au long de l'étude. La moyenne de ces paramètres a été calculée en considérant deux groupes : « OLE » et « ARA », les injections de NaCl ou Aβ ne sont pas prises en considération pour l'étude de ces paramètres. Le suivi de la prise alimentaire est identique entre les deux régimes alimentaires « OLE » et « ARA », le régime enrichi en ARA n'a donc aucun impact sur ce paramètre (Figure 32).

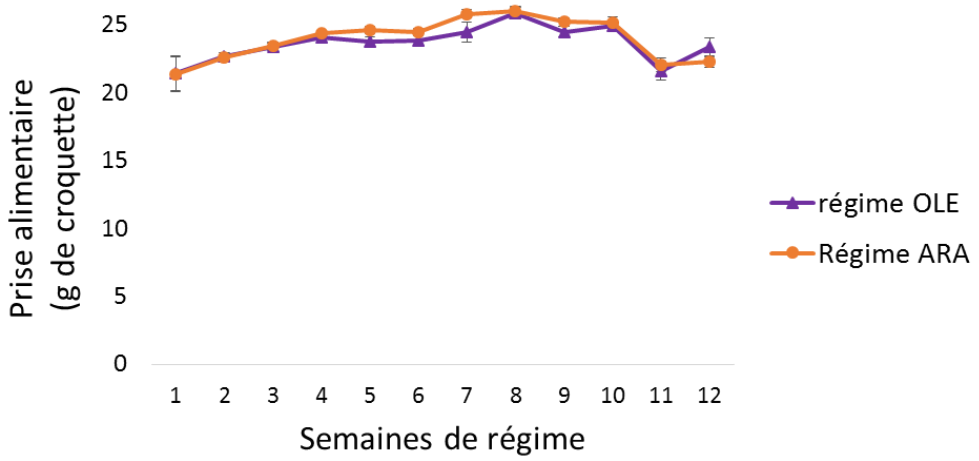


Figure 32 : Prise alimentaire des souris sous régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en grammes de croquettes et représentés en moyenne ± ESM (n=39) en fonction du nombre de semaines de régime. La courbe violette correspond à la prise alimentaire des souris sous régime « OLE » et la courbe orange correspond à la prise alimentaire des souris sous régime « ARA ».

De la même façon que la prise alimentaire, les courbes de prise de poids des souris ont été semblables pour les deux régimes (Figure 33). Cela s'explique par le fait que les apports caloriques des deux régimes sont identiques et que seule la composition qualitative en AG est différente.

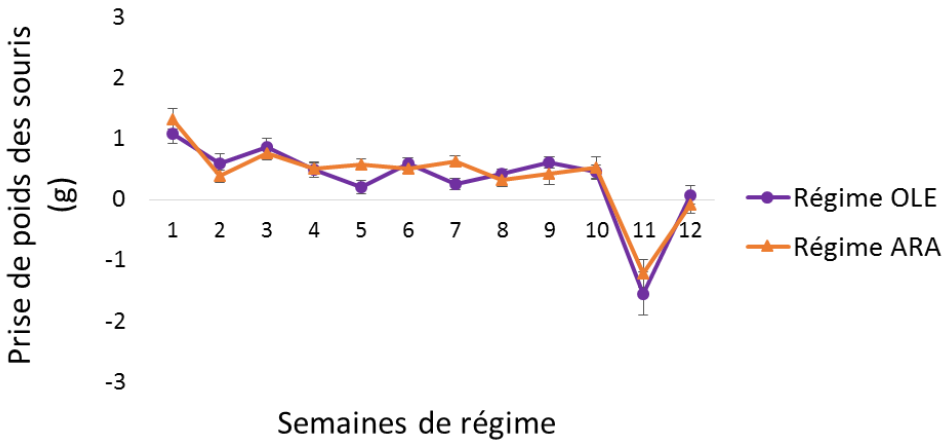


Figure 33 : Prise de poids des souris sous régime « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en grammes et représentés en moyenne ± ESM (n=39) en fonction du nombre de semaines de régime. La courbe violette correspond à la prise de poids des souris sous régime « OLE » et la courbe orange correspond à la prise de poids des souris sous régime « ARA ».

2. *Impact des régimes sur les taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques*

Nous avons mesuré le taux de cholestérol et de triglycérides dans le plasma de 16 souris par groupe après 12 semaines sous régimes « OLE » ou « ARA » en condition post prandiale et après 6h à jeun afin d'évaluer si l'apport en ARA induisait des perturbations du métabolisme lipidique périphérique.

Nous avons observé une augmentation de l'ordre de 6% du taux plasmatique de cholestérol chez les souris « ARA » par rapport aux souris « OLE », aussi bien dans les conditions post prandiale qu'à jeun, mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives. Pour les deux régimes, le taux de cholestérol dans le plasma diminue de 11% et de façon significative après 6h à jeun (Figure 34).

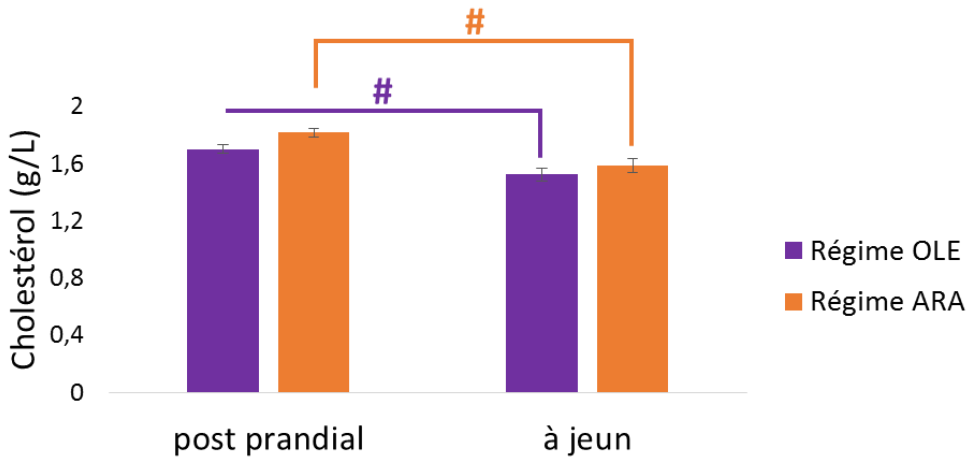


Figure 34 : Cholestérol plasmatique à jeun et post prandial des souris sous régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en g/L et représentés en moyenne ± ESM (n=16). Les histogrammes violets correspondent au cholestérol plasmatique du groupe « OLE » et les histogrammes oranges correspondent au cholestérol plasmatique du groupe « ARA ». # : $p<0,05$, comparaison entre les conditions post prandial et à jeun.

Nous avons observé une diminution significative de 13% du taux plasmatique de triglycérides post prandial chez les souris « ARA » comparées aux souris « OLE ». En revanche, à jeun, les taux de triglycérides sont identiques entre les deux groupes. Une diminution significative de 27% des taux de triglycérides chez les souris « OLE » a été observée après 6h de jeun, cette diminution est significative. Une diminution non significative de 16% a également été observée chez les souris « ARA » dans les mêmes conditions, (Figure 35).

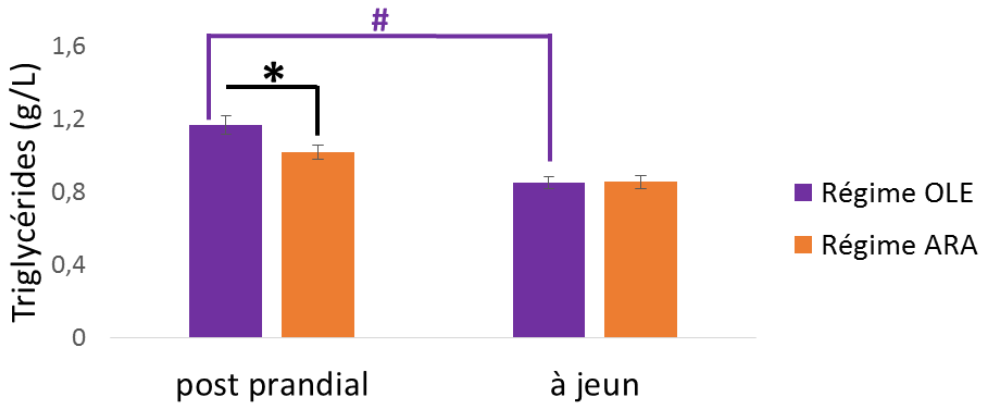


Figure 35 : Triglycérides plasmatiques à jeun et post-prandial des souris sous régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en g/L et représentés en moyenne ± ESM (n=16). Les histogrammes violets correspondent aux triglycérides plasmatiques du groupe « OLE » et les histogrammes oranges correspondent aux triglycérides plasmatiques du groupe « ARA ». * : p<0,05, comparaison entre les régimes OLE et ARA ; # : p<0,05, comparaison entre les conditions post prandial et à jeun.

3. Impact des régimes sur la répartition des acides gras périphériques

Les régimes utilisés dans cette étude étant différents par leur composition en AG, nous avons déterminé les profils en AG érythrocytaires et hépatiques des souris sous régimes « OLE » et « ARA » après 12 semaines de régimes pour étudier l'impact de ces régimes sur les AG au niveau périphérique. Les AG érythrocytaires de ces souris avant la mise sous régimes « OLE » ou « ARA » ont aussi été mesurés (n=10 par groupe de régime). Les souris avant cette étude ont été nourries avec le régime « standard ».

La répartition générale des AG dans les érythrocytes montre que les AG saturés sont les plus représentés avec l'acide palmitique (environ 35-40% des AG totaux) et l'acide stéarique (environ 20% des AG totaux). L'acide oléique, un AG monoinsaturé, est également bien représenté (entre 10 et 20% des AG totaux, selon les groupes), alors que l'autre acide monoinsaturé, l'acide palmitoléique, est très peu présent avec moins de 0,6% des AG totaux dans les différents groupes de souris. Les AG polyinsaturés de type ω-6, à savoir le LA (entre 5 et 15 %), l'ARA (12 à 22% selon les groupes) et le DTA (1,5 à 3,8%), sont mieux représentés que les AG polyinsaturés de type ω-3 avec l'ALA (0,3%), le DHA (1,2 à 3,5%) et l'EPA (moins de 0,3%) (Figure 36).

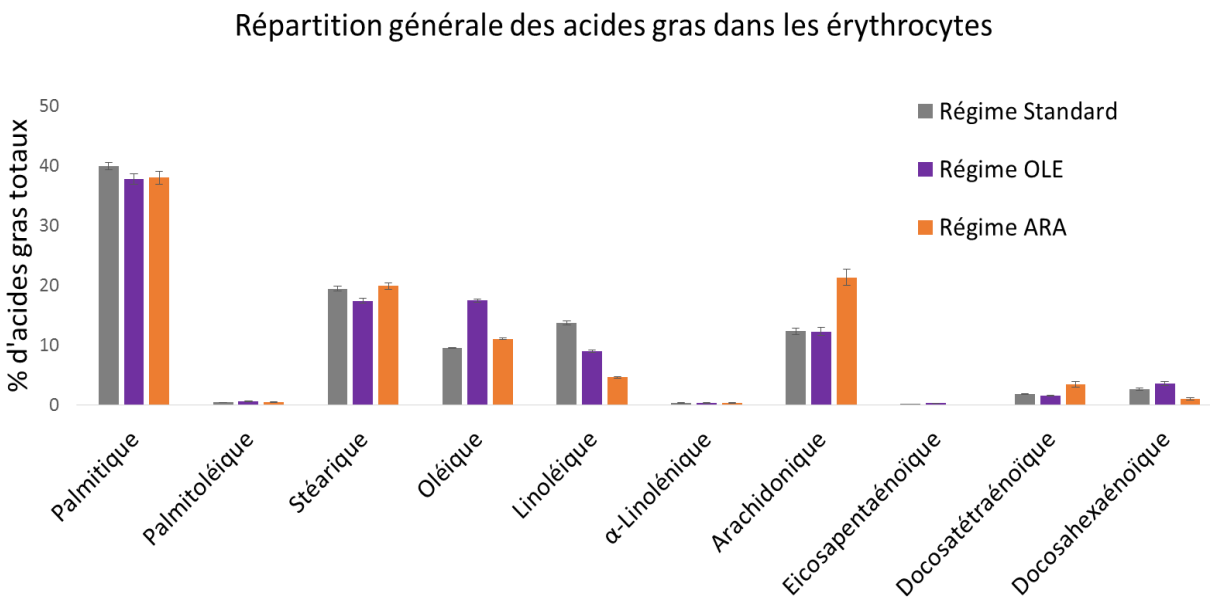


Figure 36 : Répartition des acides gras dans les érythrocytes des souris avant le début de l'étude (« standard ») et après les régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=10). Les histogrammes gris correspondent aux acides gras du « groupe standard », les histogrammes violets au groupe « OLE » et les histogrammes oranges au groupe « ARA ».

Les AG se répartissent globalement de la même façon dans le foie que dans les érythrocytes, le plus représenté étant l'acide palmitique (25% des AG totaux) suivi par l'ARA (13 à 25% selon les groupes), les acide stéarique et LA (environ 13%), l'acide oléique (10-15% selon les groupes) et le DHA un peu moins représenté (5 à 8%). Le DTA (0,4 à 1,8%), l'ALA (0,4%) et l'EPA (0,06 à 0,4% selon les groupes) sont très peu présents dans le foie (Figure 37).

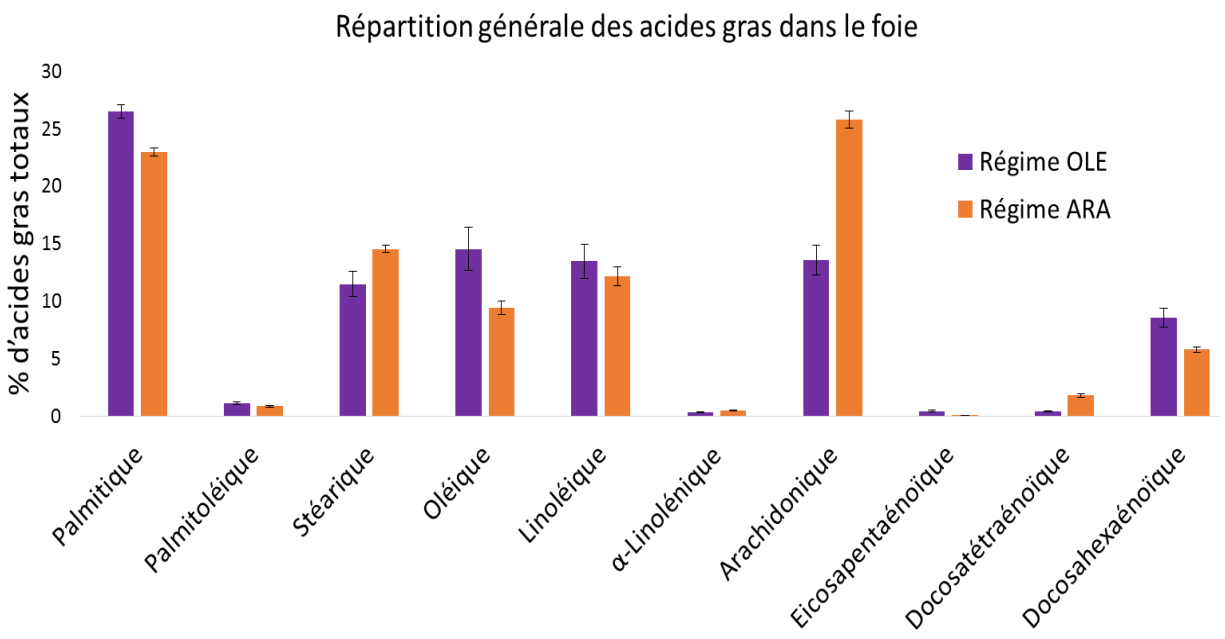


Figure 37 : Répartition des acides gras dans le foie des souris sous régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=10). Les histogrammes violets au groupe « OLE » et les histogrammes oranges au groupe « ARA ».

Nous allons à présent comparer les différents groupes pour chaque type d'AG étudiés. Dans les érythrocytes, nous avons observé une diminution de l'acide stéarique avec notre régime « OLE » comparé au régime « standard » donné aux souris avant le début de l'étude. Une différence entre les régimes « OLE » et « ARA », après l'étude et sacrifice des animaux, a été observée pour les AG saturés, avec une diminution de 1% (en % des AG totaux) de l'acide palmitique et une augmentation de 2% de l'acide stéarique dans le groupe « ARA » par rapport au groupe « OLE » (Figure 38).

Dans le foie, ces différences entre les régimes « OLE » et « ARA » ont également été observées avec une diminution de 3% (en % des AG totaux) de l'acide palmitique et une augmentation de 2% de l'acide stéarique chez les souris « ARA » par rapport aux souris « OLE ». Ces différences se compensent et n'ont pas d'influence sur le taux global d'AG saturés dans ces groupes (Figure 38).

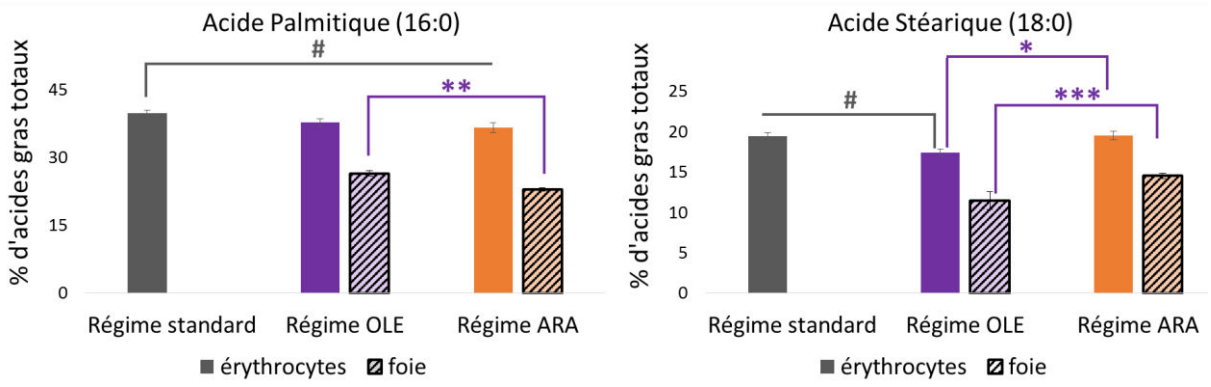


Figure 38 : Acides gras saturés dans les érythrocytes et le foie des souris avant le début de l'étude (« standard ») et après les régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=10). Les histogrammes gris correspondent au groupe « standard », les histogrammes violets au groupe « OLE » et les histogrammes oranges au groupe « ARA ». Les histogrammes pleins correspondent aux érythrocytes et les histogrammes hachurés correspondent au foie. # : $p<0,05$, comparaison entre les régimes « standard » et « OLE » ou « ARA ». * : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** :$p<0,001$, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

Pour les AG monoinsaturés, nous observons que l'acide oléique est plus élevé dans les érythrocytes du groupe « OLE » (17,4%) que dans ceux des deux autres groupes (9,5% sous le régime « standard » avant l'étude et 11% pour le groupe « ARA »), ce qui est en accord avec la composition du régime « OLE » qui est plus riche en acide oléique que les régimes « standard » et « ARA ». L'acide palmitoléique est également plus élevé dans les érythrocytes du régime « OLE » que dans les deux autres groupes (0,6% au lieu de 0,4%) (Figure 39). Cet AG minoritaire est synthétisé par la stearoyl-CoA désaturase 1 qui convertit l'acide stéarique en acide oléique.

Dans le foie, nous observons également une augmentation des AG monoinsaturés dans le groupe « OLE » (14,5% pour l'acide oléique et 1,1% pour l'acide palmitoléique) par rapport au groupe « ARA » (9,4% pour l'acide oléique et 0,8% pour l'acide palmitoléique) (Figure 39).

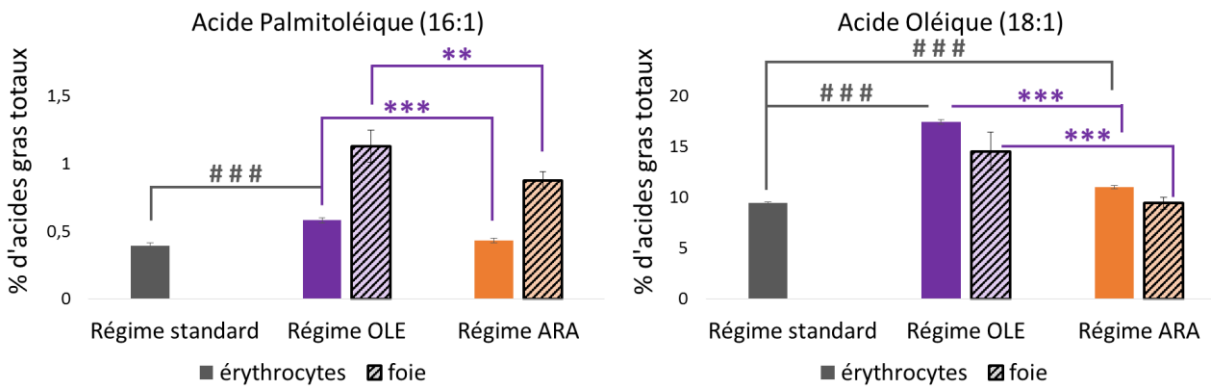


Figure 39 : Acides gras monoinsaturés dans les érythrocytes et le foie des souris avant le début de l'étude (« standard ») et après les régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=10). Les histogrammes gris correspondent au groupe « standard », les histogrammes violets au groupe « OLE » et les histogrammes oranges au groupe « ARA ». Les histogrammes pleins correspondent aux érythrocytes et les histogrammes hachurés correspondent au foie. ### : p<0,001, comparaison entre les régimes « standard » et « OLE » ou « ARA » ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

Concernant les AGPI de type ω-6, nous avons observé une diminution de leur précurseur, le LA, dans les érythrocytes du régime « OLE » par rapport aux érythrocytes des souris avant l'étude sous régime « standard » (13,7% des AG totaux pour le régime « standard » et 9% pour le régime « OLE »). Une diminution très marquée a été observée dans le régime « ARA » par rapport au régime « OLE » : le taux de LA dans les érythrocytes diminue de moitié dans le groupe « ARA » par rapport au groupe « OLE ». La proportion des AGPI ω-6, ARA et DTA, est quasiment doublée dans les érythrocytes des souris du groupe « ARA » (22,7% et 3,84% respectivement) par rapport au groupe « OLE » (12,2% et 1,6% respectivement). Les souris mises sous régime « ARA » présentent bien un enrichissement en ARA au niveau des érythrocytes et également un enrichissement en DTA (Figure 40).

Au niveau du foie, une faible diminution de LA a été observée chez les souris « ARA » (12,1%) par rapport aux souris « OLE » (14,3%). Cette variation est beaucoup moins marquée dans le foie que dans les érythrocytes. En revanche, pour les deux autres AGPI de type ω-6, le taux d'ARA chez les souris « ARA » (25,8% des AG totaux) est presque doublé par rapport aux souris « OLE » (13,6%) et le taux de DTA est multiplié par 4,4 chez les souris « ARA » par rapport aux souris « OLE ». Un enrichissement en ARA et DTA est observé dans le foie des souris « ARA » comme

dans leurs érythrocytes, voire de façon plus marquée pour le DTA (Figure 40). Comme le DTA est un composé très minoritaire dans les deux régimes, cet enrichissement important en DTA dans les érythrocytes et le foie suggère que celui-ci pourrait être un produit de conversion de l'ARA apporté par l'alimentation.

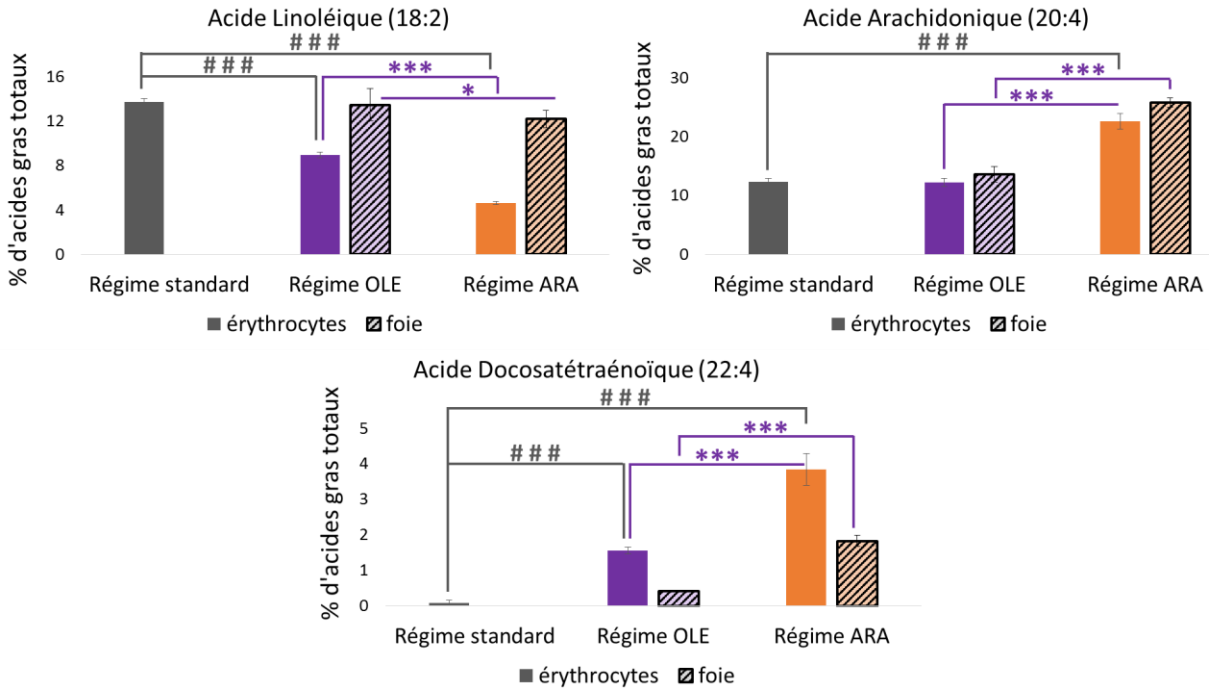


Figure 40 : Acides gras polyinsaturés de type ω-6 dans les érythrocytes et le foie des souris avant le début de l'étude (« standard ») et après régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=10). Les histogrammes gris correspondent au groupe « standard », les histogrammes violets au groupe « OLE » et les histogrammes oranges au groupe « ARA ». Les histogrammes pleins correspondent aux érythrocytes et les histogrammes hachurés correspondent au foie. ### : p<0,001, comparaison entre les régimes « standard » et « OLE » ou « ARA » ; * : p<0,05 ; *** p<0,001, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

Concernant les AGPI de type ω-3, aucune différence n'a été observée pour leur précurseur, l'ALA, dans les érythrocytes des souris avant le début de l'étude (sous régime « standard ») comparés aux érythrocytes des souris après les régimes « OLE » et « ARA ». L'EPA est présent en très faible quantité dans les érythrocytes des souris, mais à des taux plus élevés dans le groupe « OLE » (0,3% des AG totaux) que dans les groupes « ARA » et « standard » où il est indétectable. Le DHA est également plus élevé dans les érythrocytes des souris sous régime « OLE » (3,5%) que dans les érythrocytes des souris sous régimes « ARA » (1,2%) et « standard » (2,6%) (Figure 41).

Dans le foie, on observe une légère augmentation d'ALA chez les souris « ARA » (0,49%) comparées aux souris « OLE » (0,38%). A l'inverse, les foies des souris « ARA » contiennent moins de DHA et d'EPA (0,26% et 0,01% respectivement) que celui des souris « OLE » (0,82% et 0,07% respectivement) (Figure 41).

Une diminution d'AGPI de type ω-3 (DHA et EPA) dans le groupe « ARA » par rapport au groupe « OLE » a été observée aussi bien dans le foie que dans les érythrocytes. Cette diminution d'AGPI de type ω-3 n'est pas due à une carence en DHA dans le régime « ARA », qui apporte quasiment autant d'ALA et plus de DHA que le régime « OLE » (Figure 30). Elle peut être liée à un phénomène de compétition entre ces deux familles d'AGPI. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

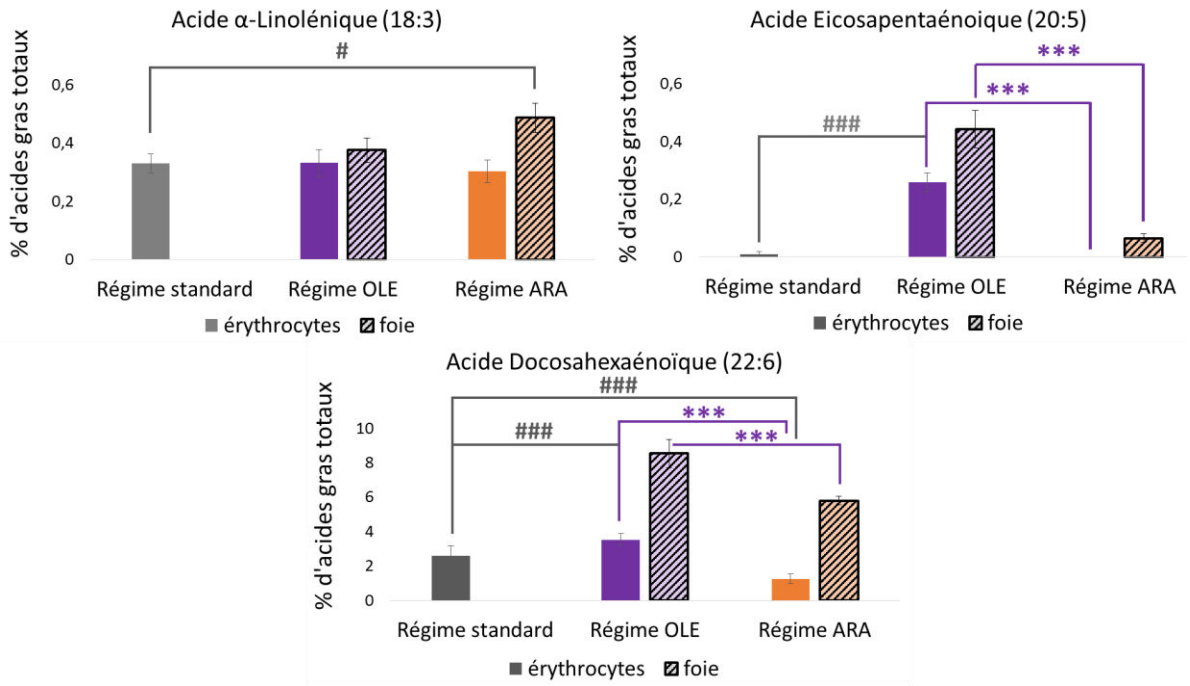


Figure 41 : Acides gras polyinsaturés de type ω-3 dans les érythrocytes et le foie des souris avant le début de l'étude (« stantard ») et après régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont exprimés en % d'acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=10). Les histogrammes gris correspondent au groupe « standard », les histogrammes violets au groupe « OLE » et les histogrammes oranges au groupe « ARA ». Les histogrammes pleins correspondent aux érythrocytes et les histogrammes hachurés correspondent au foie. # : $p<0,05$; ### : $p<0,001$, comparaison entre les régimes « standard » et « OLE » ou « ARA » ; *** : $p<0,001$, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

Après avoir décrit les modifications induites par les deux régimes alimentaires « ARA » et « OLE » au niveau de la composition en AG de deux tissus périphériques, le foie et les érythrocytes, nous allons présenter les résultats obtenus sur les

différences induites dans la composition en AG et celles des espèces phospholipidiques au niveau de l'hippocampe et du cortex.

4. Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur les lipides membranaires au niveau cérébral

4.1. Répartition cérébrale des acides gras totaux

La répartition des AG totaux a été réalisée par GC dans le cortex et l'hippocampe des souris des quatre groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ », après les 12 semaines de régimes et les analyses comportementales. Nous avons séparé les échantillons en quatre groupes afin d'évaluer l'influence des deux régimes et l'effet de l'administration de peptide Aβ sur la composition des tissus cérébraux en AG totaux. Si l'on compare la distribution globale des AG dans l'hippocampe et le cortex à celles des érythrocytes et du foie, on observe que le LA est 10 à 20 fois moins présent dans le cerveau qu'au niveau périphérique, et que le DHA est 10 fois plus présent dans le cerveau qu'au niveau périphérique. L'ARA représente les mêmes proportions dans le cerveau et dans les érythrocytes (environ 15%) (Figure 42).

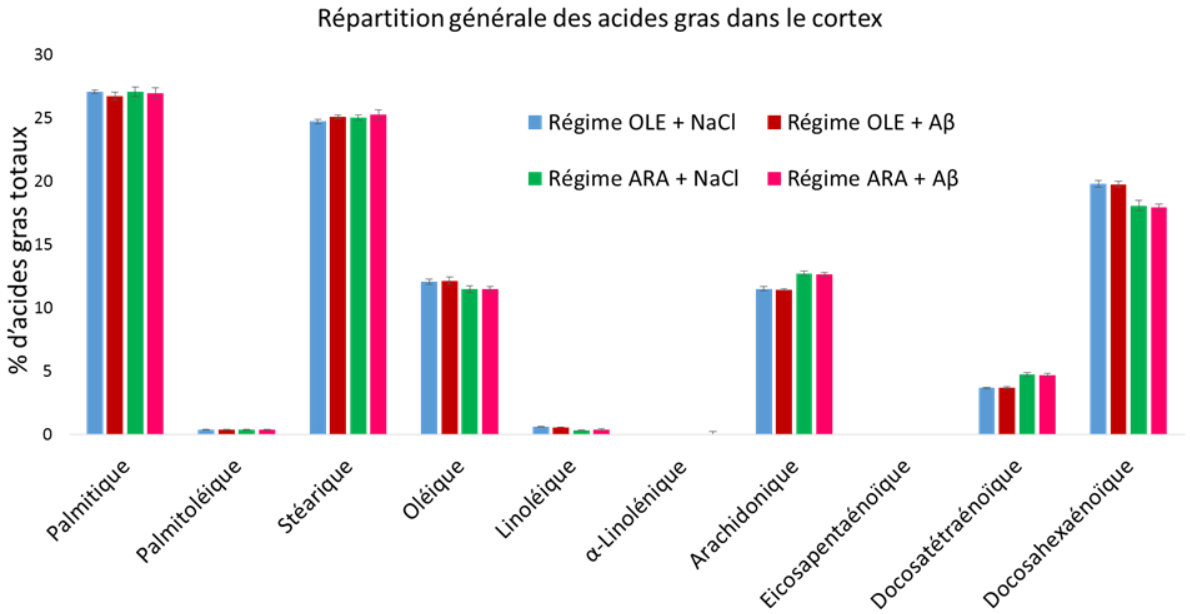


Figure 42 : Répartition des acides gras dans le cortex des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ »

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=4 ou 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ».

Nous n'avons observé aucune différence entre les groupes pour les AG saturés stéarique et palmitique. Le taux d'AG monoinsaturé palmitoléïque est également identique dans les différents groupes. En revanche le taux d'acide oléique est légèrement plus important dans les groupes soumis au régime « OLE » (environ 11% dans le cortex et l'hippocampe) par rapport aux deux groupes soumis au régime « ARA » (environ 12%) (Figure 43). Cette différence pour l'acide oléique est à mettre en rapport avec les compositions respectives en acide oléique des deux régimes (27,3% des AG dans le régime « ARA » contre 43,7% dans le régime « OLE ») (Figure 30).

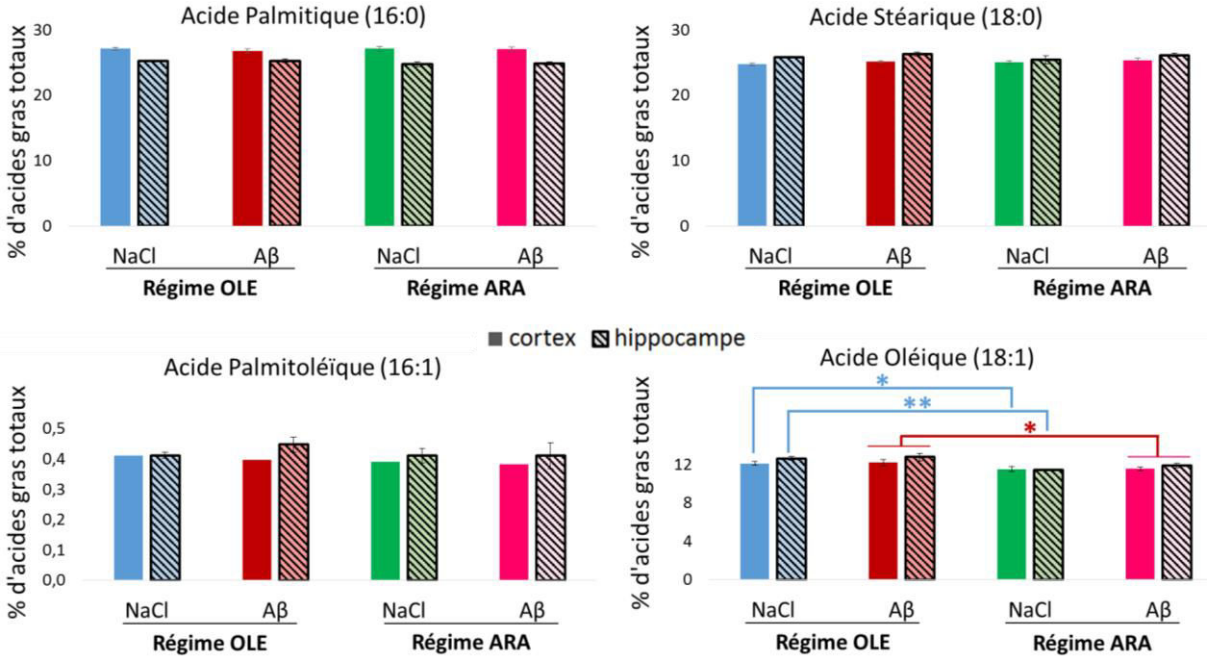


Figure 43 : Acides gras saturés et monoinsaturés dans le cortex et l'hippocampe des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ »

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=4 ou 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». Les histogrammes pleins représentent le cortex et les histogrammes hachurés représentent l'hippocampe. * : $p<0,05$; ** $p<0,01$, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

Le précurseur des AGPI de type ω-6, le LA, diminue dans le cortex et l'hippocampe des souris sous régime « ARA » par rapport aux groupes « OLE » (de 0,6% à 0,3%). Les deux autres AG ω-6, l'ARA et le DTA, augmentent de façon significative dans le cortex et l'hippocampe des souris « ARA » par rapport aux groupes « OLE » (de 11,5% à 12,7% pour l'ARA et de 3,7% à 4,7% pour le DTA). On

observe une diminution significative du DHA dans le cortex des souris soumises au régime « ARA » (18%) par rapport au régime « OLE » (19,8%). Une faible diminution (non significative) de DHA est également observée dans l'hippocampe des souris « ARA » (Figure 44). Les deux autres AGPI de type ω-3, l'EPA et l'ALA, n'ont pas été détectés dans les deux structures cérébrales étudiées.

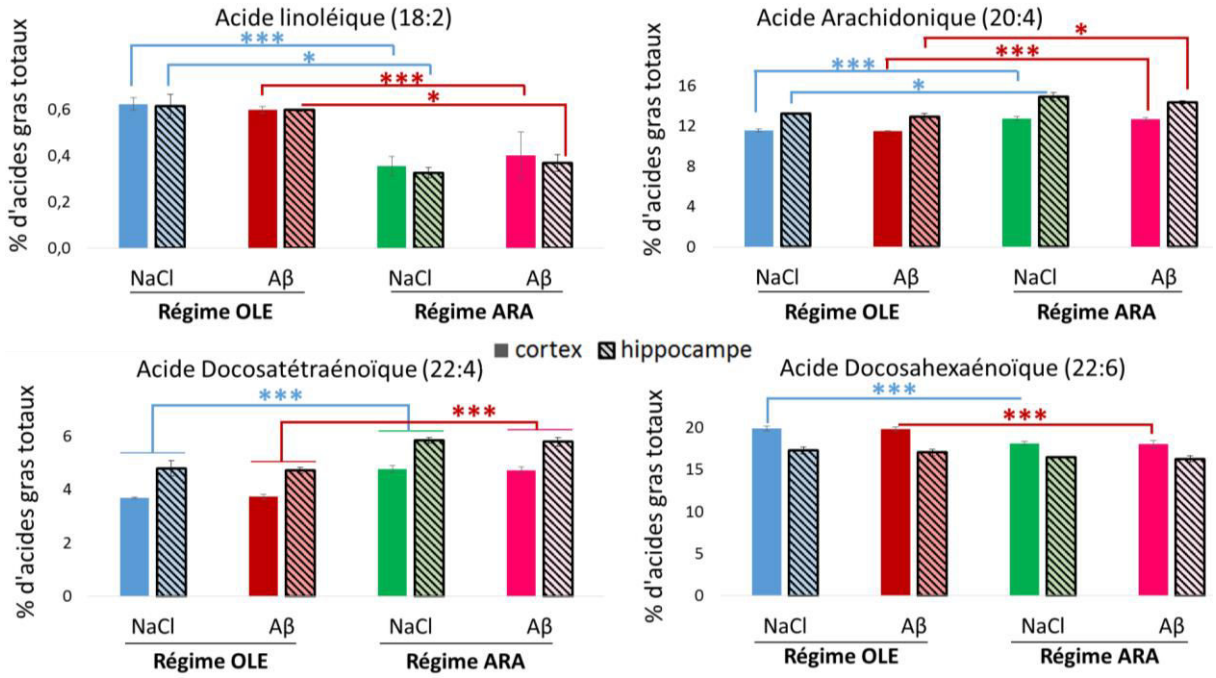


Figure 44 : Acides gras polyinsaturés dans le cortex et l'hippocampe des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ »

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux et représentés en moyenne ± ESM (n=4 ou 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». Les histogrammes pleins représentent le cortex et les histogrammes hachurés représentent l'hippocampe. * : p<0,05 ; *** p<0,001, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

Nous n'avons observé aucune différence entre les groupes « NaCl » et « Aβ » pour les AG mesurés dans les cortex et les hippocampes des souris pour chaque régime, c'est pourquoi les analyses des espèces phospholipidiques n'ont été faites que sur les groupes « NaCl » définis « OLE » et « ARA », groupes de souris ayant reçu une injection contrôle (NaCl) sans peptide Aβ, dans le paragraphe suivant.

4.2. Analyse des espèces de phospholipides membranaires

Afin de déterminer si les différences cérébrales dans l'incorporation globale des AG identifiées dans les pages précédentes se concentrent ou non dans certaines classes et espèces phospholipidiques, nous avons étudié celles-ci par la technique de LCMSMS. L'étape de chromatographie liquide permet de séparer les différentes classes de phospholipides d'intérêt, à savoir les PE, PS, PC et PI. Les phospholipides sont ensuite ionisés et les espèces de phospholipides sont identifiées par la MS par leur ratio m/z (nombre de masses / nombre de charges) (Tableau III). Comme l'ARA et le DHA sont les AG principaux du cerveau et que nous souhaitions confirmer ou infirmer l'existence de phénomènes de compétitions entre le DHA (22:6, ω-3) et l'ARA (20:4, ω-6) pour l'incorporation dans les phospholipides, nous nous sommes focalisés sur l'analyse des espèces contenant le DHA et l'ARA ainsi que sur des produits d'élongation et de désaturation comme le DTA (22:4, ω-6 principalement) et le DPA (22:5, ω-6 ou ω-3). En raison de la présence des espèces isobariques en MS1, nous avons analysé les espèces acyl et plasmalogènes en MS2 pour les PE, PS et PI, et en MS3 pour les PC. Dans chaque classe de phospholipides, nous avons totalisé la somme des aires de chaque espèce de phospholipides contenant du DHA, de l'ARA, du DTA ou du DPA. Les résultats ont été exprimés pour chaque espèce en % du total de cette somme dans la classe considérée.

Les PE, au même titre que les PC, sont les phospholipides les plus abondants au niveau du cerveau (Swietochowska *et al.*, 1983). Les espèces PE et PS sont les plus abondantes en DHA dans le cerveau, nous retrouvons cette notion dans l'analyse des phospholipides dans le cortex et l'hippocampe des souris soumises aux régimes « OLE » et « ARA » (Figure 45, Figure 46 et Figure 47).

Tableau III : Identification des espèces phospholipidiques à partir de leur m/z par la technique de chromatogaphie liquide couplée à une double spectrométrie de masse

a : acyl ; ARA : acide arachidonique ; DHA ; acide docosahexaénoïque ; DPA : acide docosapentaénoïque ; DTA : acide docosatétraénoïque ; m/z : masse/charge ; p : plasmalogène ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidylethanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PS : phosphatidylsérine.

Tête polaire	ratio m/z	phospholipide global	chaines d'acides gras	espèce
Ethanolamine	738.5	36:4	a16:0/20:4	PE-ARA
	722.5	36:4	p16:0/20:4	pPE-ARA
	766.5	38:4	a18:0/20:4	PE-ARA
	750.5	38:4	p18:0/20:4	pPE-ARA
	764.5	38:5	a18:1/20:4	PE-ARA
	748.5	38:5	p18:1/20:4	pPE-ARA
	762.5	38:6	a18:2/20:4	PE-ARA
	746.5	38:6	p18:2/20:4	pPE-ARA
	750,5	38:4	p16:0/22:4	pPE-DTA
	748,5	38:5	p16:1/22:4	pPE-DTA
	794,5	40:4	a18:0/22:4	PE-DTA
	792,5	40:5	a18:1/22:4	PE-DTA
	792,5	**40:5**	**a18:0/22:5**	**PE-DPA**
	762.5	38:6	a16:0/22:6	PE-DHA
	746.5	38:6	p16:0/22:6	pPE-DHA
	790.5	40:6	a18:0/22:6	PE-DHA
	774.5	40:6	p18:0/22:6	pPE-DHA
	788.5	40:7	a18:1/22:6	PE-DHA
	772.5	40:7	p18:1/22:6	pPE-DHA
Sérine	810.5	38:4	18:0/20:4	PS-ARA
	810.5	38:4	16:0/22:4	PS-DTA
	838.5	40:4	18:0/22:4	PS-DTA
	834.5	**40:6**	**18:1/22:5**	**PS-DPA**
	834.5	40:6	18:0/22:6	PS-DHA
Choline	826.5	36:4	16:0/20:4	PC-ARA
	854.5	38:4	18:0/20:4	PC-ARA
	852.5	38:5	18:1/20:4	PC-ARA
	850.5	38:6	16:0/22:6	PC-DHA
	878.5	40:6	18:0/22:6	PC-DHA
	876.5	40:7	18:1/22:6	PC-DHA
Inositol	857.5	36:4	16:0/20:4	PI-ARA
	885.5	38:4	18:0/20:4	PI-ARA
	883.5	38:5	18:1/20:4	PI-ARA
	881.5	38:6	16:0/22:6	PI-DHA
	909.5	40:6	18:0/22:6	PI-DHA

Résultats

Les espèces PE contenant du DHA représentent environ 50% des espèces PE identifiées comme contenant de l'ARA, du DHA, du DTA et du DPA dans le cortex et dans l'hippocampe, avec un taux global de ces espèces PE-DHA plus important chez les souris « OLE » (51,5% dans le cortex et 53,9% dans l'hippocampe) que chez les souris « ARA » (47,9% dans le cortex et 48,4% dans l'hippocampe) (Figure 45 et Figure 46). Plusieurs espèces PE contenant du DHA présentent une baisse significative dans le cortex des souris « ARA » par rapport aux souris « OLE » : les espèces acyl PE a16:0/22:6 (6,2% et 4,6% des espèces PE mesurées dans les groupes « OLE » et « ARA » respectivement), a18:0/22:6 (26,1% et 24,3%) et a18:1/22:6 (2% et 1,7%) et l'espèce plasmalogène PE p16:0/22:6 (3,4% et 4,3%). Ces résultats paraissent faibles en les exprimant en % de l'aire de l'ensemble des espèces PE analysées, mais en ramenant ces résultats en % du groupe « OLE » pour chaque espèce, les diminutions de ces espèces PE-DHA vont de 7 à 26%, avec une plus forte diminution pour l'espèce acyl PE a16:0/22:6 (Figure 45). Dans l'hippocampe, seule l'espèce a18:0/22:6 diminue chez les souris « ARA » (20,3% des espèces PE globales) par rapport aux souris « OLE » (17,9%). Les espèces contenant de l'ARA représentent environ 34% des espèces PE globales. L'ensemble des espèces PE-ARA atteignent un pourcentage plus important dans le cortex des souris « ARA » (34,8% des espèces PE) que dans celui des souris « OLE » (33%) (Figure 45) mais cette différence n'est pas observée dans l'hippocampe (Figure 46). Les espèces acyl PE a16:0/20:4 et a18:1/20:4 ainsi que l'espèce plasmalogène PE p18:0/20:4 augmentent dans les cortex des souris « ARA » (respectivement 3,2%, 2,1% et 6,6%) comparé aux cortex des souris « OLE » (respectivement 2,8%, 1,8% et 5,1%) (Figure 45). Dans l'hippocampe, ce sont les espèces acyl PE a16:0/20:4 et a18:1/20:4 qui augmentent également chez les souris « ARA » par rapport aux souris « OLE », mais pas l'espèce plasmalogène PE p18:0/20:4 (Figure 46). Les espèces contenant du DTA augmentent également dans le cortex et l'hippocampe des souris « ARA » comparées aux souris « OLE ». Ces espèces sont les espèces acyl PE a18:0/22:4, acyl PE a18:1/22:4 et plasmalogène PE p16:0/22:4 dans le cortex (Figure 45) et l'espèce acyl PE a18:0/22:4 dans l'hippocampe (Figure 46). Les espèces contenant du DPA ne varient pas dans le cortex (Figure 45)

mais l'espèce acyl PE a18:0/22:5 augmente dans l'hippocampe des souris « ARA » par rapport aux souris « OLE », augmentant ainsi les espèces DPA-PE globales (Figure 46).

Les PS sont également très riches en DHA puisque l'espèce PS contenant du DHA (18:0/22:6) représente à elle seule 80 à 90% des espèces PS totales. Cette espèce diminue dans le cortex et l'hippocampe des souris « ARA » (respectivement 84,6 et 79,1% des PS) par rapport aux souris « OLE » (98,8 et 89,91%). En revanche, dans le cortex, les taux des espèces 18:0/20:4, 16:0/22:4 et 18:0/22:4 sont plus importants chez les souris « ARA » que chez les souris « OLE ». Dans l'hippocampe, seule l'espèce PS 18:0/22:4 augmente chez les souris « ARA » (Figure 47). L'ensemble de ces espèces sont des espèces acyl.

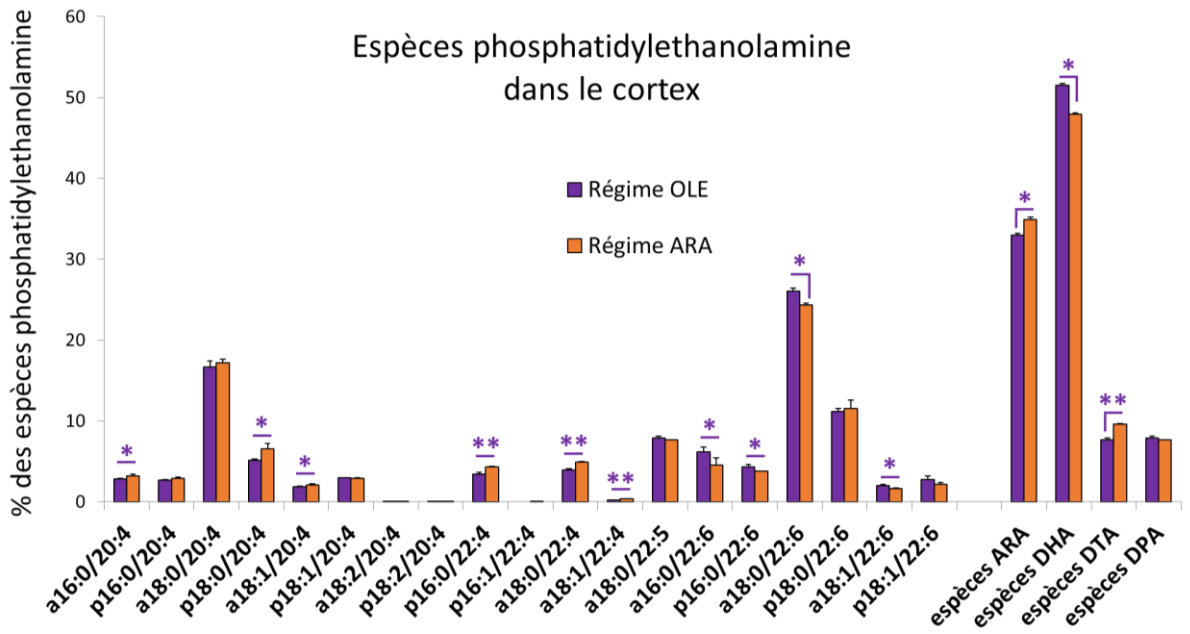


Figure 45 : Répartition des espèces phosphatidylethanolamine contenant les acides arachidonique, docosahexaénoïque, docosatétraénoïque ou docosapentaénoïque dans le cortex des souris après les régimes « OLE » ou « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylethanolamine et en moyenne ± ESM (n=3). Les différents régimes sont représentés par les histogrammes violets pour le groupe « OLE » et oranges pour le groupe « ARA ». a : acyl ; ARA : acide arachidonique ; DHA : acide docosahexaénoïque ; DPA : acide docosapentaénoïque ; DTA : acide docosatétraénoïque ; p : plasmalogène. * : p<0,05 ; ** p<0,01, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

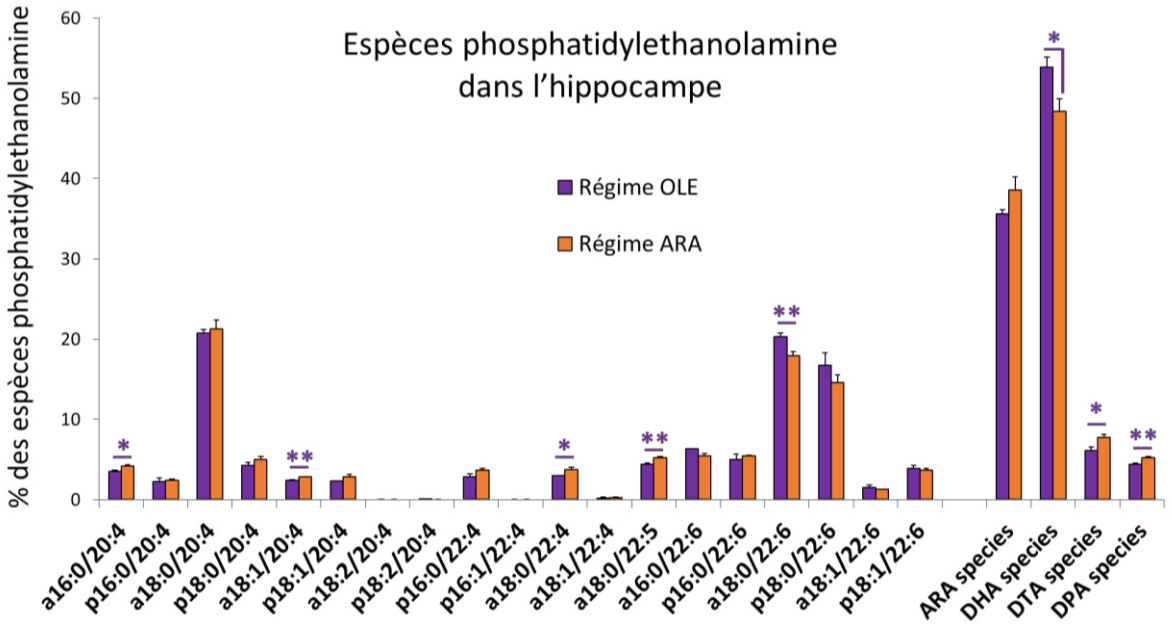


Figure 46 : Répartition des espèces phosphatidylethanolamine contenant les acides arachidonique, docosahexaénoïque, docosatétraénoïque ou docosapentaénoïque dans l'hippocampe des souris après les régimes « OLE » ou « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylethanolamine et en moyenne ± ESM (n=3). Les différents régimes sont représentés par les histogrammes violets pour le groupe « OLE » et oranges pour le groupe « ARA ». a : acyl ; ARA : acide arachidonique ; DHA : acide docosahexaénoïque ; DPA : acide docosapentaénoïque ; DTA : acide docosatétraénoïque ; p : plasmalogène. * : p<0,05 ; ** p<0,01, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

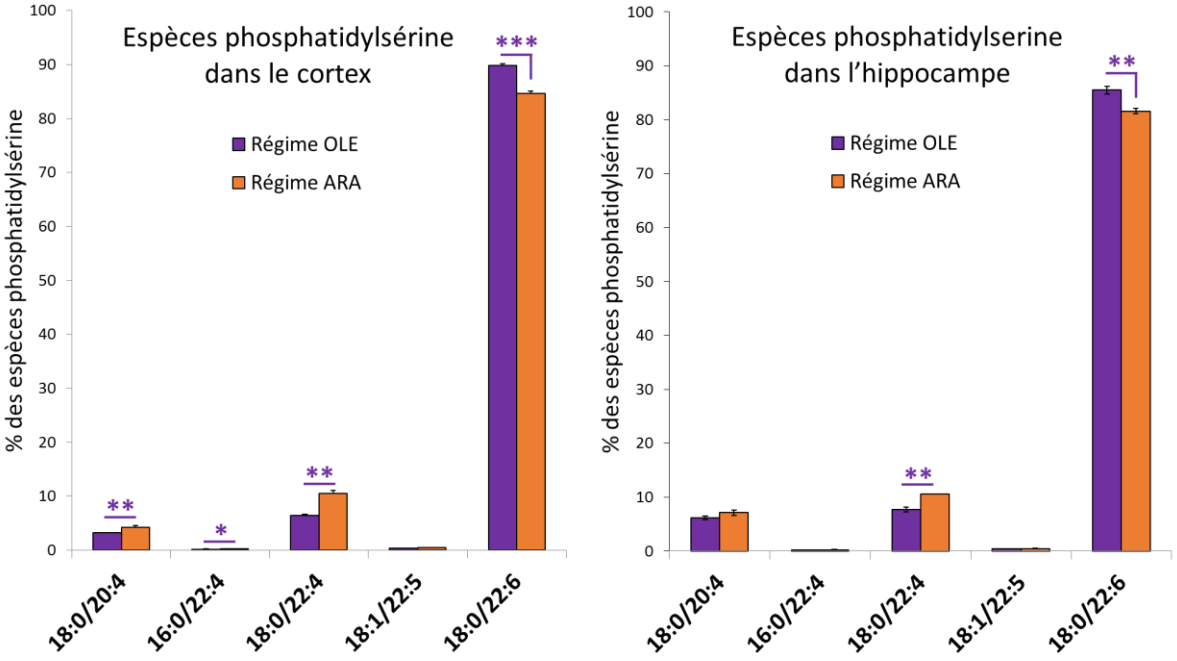


Figure 47 : Répartition des espèces phosphatidylsérine contenant les acides arachidonique, docosahexaénoïque, docosatétraénoïque ou docosapentaénoïque dans l'hippocampe et le cortex des souris après les régimes « OLE » ou « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylsérine et en moyenne ± ESM (n=3). Les différents régimes sont représentés par les histogrammes violets pour le groupe « OLE » et oranges pour le groupe « ARA ». * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

Les espèces PC contiennent majoritairement de l'ARA (75 à 80%). L'espèce PC-ARA majoritaire dans le cortex est l'espèce PC 16:0/20:4 (70 à 75% des espèces PC) tandis que l'espèce PC 18:0/20:4 ne représente qu'environ 5% des PC. Ces espèces sont réparties de façon équilibrée dans l'hippocampe : le PC 16:0/20:4 représente 27% des espèces PC et le PC 18:0/20:4 environ 37%. Ces espèces contenant de l'ARA étant fortement exprimées dans le cerveau, les autres espèces ne représentent que 10% ou moins des espèces PC. Aucune différence n'a été observée entre les groupes « OLE » et « ARA » pour les phospholipides de la classe PC (Figure 48).

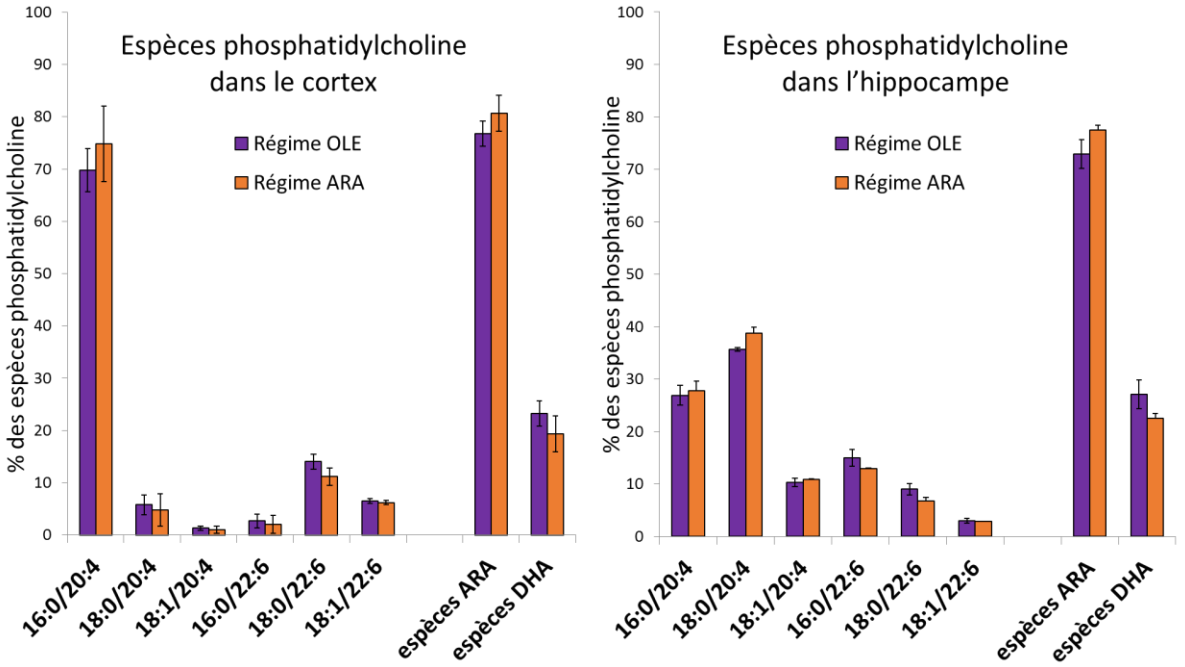


Figure 48 : Répartition des espèces phosphatidylcholine contenant les acides arachidonique ou docosahexaénoïque dans l'hippocampe et le cortex des souris après les régimes « OLE » ou « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylcholine et en moyenne ± ESM (n=3). Les différents régimes sont représentés par les histogrammes violets pour le groupe « OLE » et oranges pour le groupe « ARA ».

Comme les PC, les PI contiennent majoritairement de l'ARA (96% dans le cortex et 98% dans l'hippocampe). L'espèce PI 18:0/20:4 représente entre 75% et 80% des espèces PI dans le cortex et l'hippocampe. Les deux autres espèces contenant de l'ARA (PI 16:0/20:4 et 18:1/20:4) représentent environ 10% des PI chacune et les espèces contenant du DHA sont très faiblement représentées (moins de 4% dans le

cortex et moins de 2% dans l'hippocampe). Aucune différence n'a été observée entre les groupes « OLE » et « ARA » pour les espèces phospholipidiques étudiées de la classe PI (Figure 49).

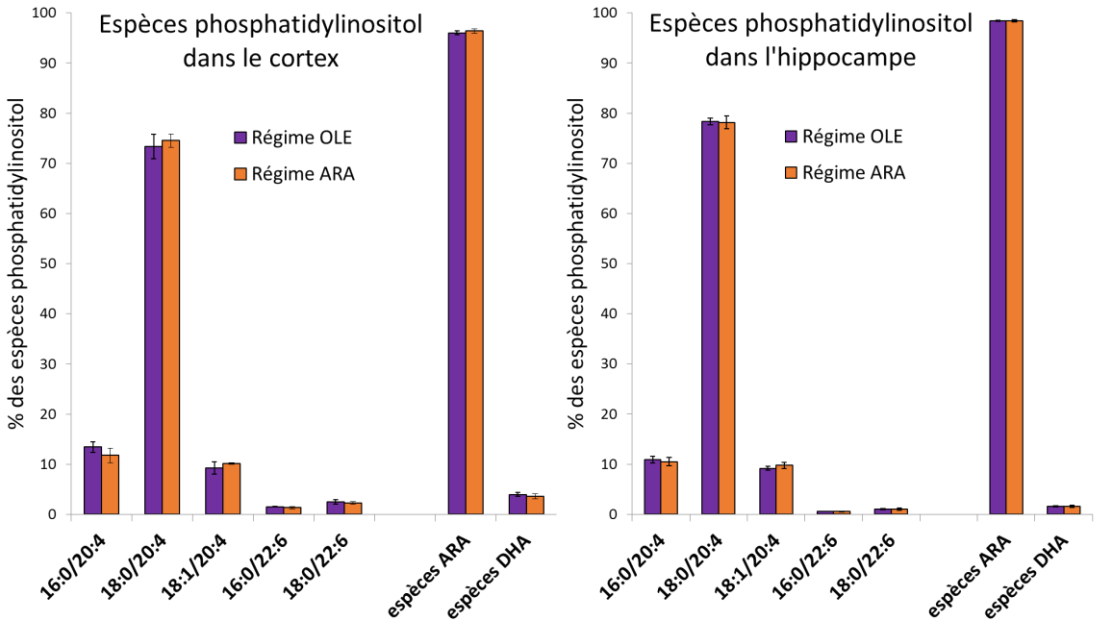


Figure 49 : Répartition des espèces phosphatidylinositol contenant les acides arachidonique ou docosahexaénoïque dans l'hippocampe et le cortex des souris après les régimes « OLE » ou « ARA »

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylinositol et en moyenne ± ESM (n=3). Les différents régimes sont représentés par les histogrammes violets pour le groupe « OLE » et oranges pour le groupe « ARA ».

Malgré les faibles variations observées, nous avons pu montrer des différences significatives entre certaines espèces phospholipidiques des classes PE et PS dans les cortex et hippocampes des souris soumises pendant 12 semaines aux régimes « OLE » ou « ARA ». Des augmentations du pourcentage de certaines espèces ω-6 PE et PS ont été observées avec le régime « ARA » par rapport au régime « OLE » en balance avec des diminutions du pourcentage de certaines espèces ω-3. Si on considère les espèces qui varient à la fois dans le cortex et l'hippocampe, les espèces acyl PE et PS a18:0/22:6 diminuent avec le régime « ARA » par rapport au régime « OLE » alors que les espèces PE acyl a18:1/20:4 et a18:0/22:4 et PS a18:0/22:4 augmentent. On remarque que l'acide oléique est présent à la fois dans des espèces DHA diminuant et des espèces ARA augmentant avec le régime « ARA » par rapport au régime «

OLE ». Cela signifie que l'apport d'acide oléique au cerveau n'est pas limitant dans ces variations qui sont indépendantes des apports alimentaires en cet AG. Par ailleurs les espèces DTA varient plus et de façon plus significatives que les espèces ARA dans les classes PE et PS avec l'apport en ARA. Ces résultats sur les espèces phospholipidiques en LCMSMS vont dans le même sens que ceux obtenus sur les AG totaux en GC et indiquent l'existence d'une compétition entre ARA et DTA d'un côté, et DHA de l'autre pour l'incorporation dans les phospholipides PE et PS corticaux et hippocampiques.

Après avoir déterminé que les souris soumises aux régimes alimentaires « OLE » ou « ARA » pendant 12 semaines présentent une différence de composition lipidique aussi bien dans des tissus extracérébraux que dans les structures cérébrales, nous avons étudié les conséquences sur les fonctions cognitives des souris par des tests comportementaux mesurant les capacités mnésiques à court et long terme et l'apprentissage des souris en situation de base et après administration ICV d'oligomères de peptide $A\beta_{1-42}$.

5. Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur les capacités cognitives

5.1. Analyse de la mémoire spatiale à court terme

Afin d'étudier l'effet d'un régime enrichi en ARA sur la sensibilité aux oligomères du peptide Aβ, nous avons injecté 500 pmol d'oligomères solubles du peptide $A\beta_{1-42}$ par voie ICV chez la moitié des souris « OLE » et « ARA » (n=20 par groupe). Les autres souris de chaque groupe de régime ont reçu une solution saline du même volume (n=19 par groupe). Ces injections ont été réalisées après 10 semaines de régime.

Quatre jours après l'injection, la mémoire de travail des souris a été évaluée par le test comportemental du labyrinthe en Y. Ce test permet de mesurer la mémoire spatiale à court terme dans un labyrinthe à trois branches. La mémoire de travail des souris est déterminée par le pourcentage d'alternances spontanées observées pendant le test.

Résultats

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les quatre groupes de souris pour le nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe (Figure 50). Cela indique que les deux régimes alimentaires n'introduisent pas de différence dans les capacités locomotrices et d'exploration des souris et que l'administration de peptide Aβ ne les modifie pas.

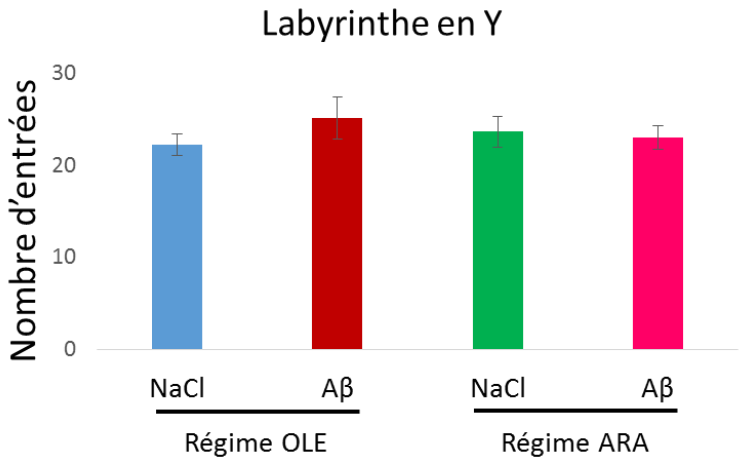


Figure 50 : Capacités locomotrices et d'exploration des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurées par le nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe en Y

Les résultats sont exprimés en nombre d'entrées et représentés en moyenne ± ESM (n=14 à 19). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ».

Sous régime « OLE », l'injection du peptide Aβ induit une diminution de l'alternance (55,3%) par rapport aux souris injectées avec la solution saline (70,7%) ce qui montre que l'injection ICV d'oligomères du peptide Aβ induit une altération de la mémoire spatiale à court terme chez les souris soumises à ce régime durant 12 semaines. En absence d'administration de peptide Aβ (injection de la solution saline), les souris sous régime « ARA » ont un pourcentage d'alternance significativement plus faible que les souris sous régime « OLE » dans les mêmes conditions (55,5% sous régime « ARA » et 70,7% sous régime « contrôle »). Cette différence indique que ce régime alimentaire induit une altération de la mémoire spatiale à court terme. Cette altération est équivalente à l'altération induite par l'injection du peptide Aβ. Sous régime « ARA », nous observons une légère diminution (non significative) de l'alternance pour les souris ayant reçu une injection intracérébrale de peptide Aβ (49,9%) par rapport aux

souris injectées avec la solution saline (53,2%) (Figure 51). Etant donné que la mémoire spatiale à court terme des souris sous régime « ARA » est déjà altérée et que le pourcentage d'alternance est bas en absence d'administration du peptide Aβ, le test utilisé peut ne pas être assez sensible pour révéler une dégradation supplémentaire en présence de ce peptide.

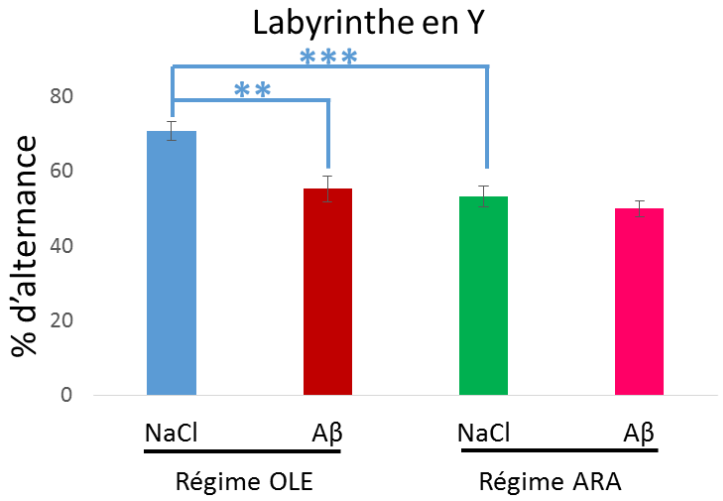


Figure 51 : Mémoire spatiale à court terme des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par le pourcentage d'alternances spontanées réalisées par les souris dans le labyrinthe en Y

Les résultats sont exprimés en % d'alternance et représentés en moyenne ± ESM (n=9 à 15). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». ** : p<0,01 ; *** p<0,001, comparaison au groupe « contrôle NaCl ».

5.2. Analyse de l'apprentissage

Le test comportemental de la piscine de Morris est réalisé à partir du troisième jour après l'injection du peptide Aβ ou de la solution saline. Les jours 3 et 4 sont consacrés à la phase d'habituation aux conditions aversives du test. La phase d'apprentissage est réalisée à partir du septième jour après injection et dure 5 jours. Durant cette phase d'habituation, le temps d'arrivée à la plateforme (ou temps de latence) est mesuré pour chaque souris à chaque passage. Pour les souris injectées avec la solution saline, nous observons une diminution des temps de latence tout au long de la phase d'apprentissage (31 à 33 secondes pour le jour 1 et 20 secondes pour le jour 5) quel que soit le régime alimentaire des souris. Les courbes d'apprentissage des souris sous régime « OLE » et « ARA » après injection de NaCl

sont superposables, l'excès d'ARA dans l'alimentation n'a donc pas d'impact sur l'apprentissage des souris en condition de base. Les souris sous régime « OLE » injectées avec le peptide Aβ ont également diminué leur temps de latence lors de la phase d'apprentissage (37 secondes pour le jour 1 et 25 secondes pour le jour 5), mais seulement à partir du jour 2. La courbe d'apprentissage des souris « OLE + Aβ » est décalée vers le haut par rapport aux souris « OLE + NaCl », avec une différence significative pour les jours 2 à 4. L'injection du peptide Aβ induit donc une altération de l'apprentissage chez les souris sous régime « OLE ». Chez les souris sous régime « ARA » injectées avec le peptide Aβ, nous observons une faible diminution de la latence (38 secondes pour le jour 1 et 33 secondes pour le jour 5), qui n'apparaît que le dernier jour d'apprentissage. La courbe « ARA + Aβ » est significativement différente de la courbe « ARA + NaCl » tout au long de la phase d'apprentissage et nous observons également une différence significative entre les groupes « ARA + Aβ » et « OLE + Aβ » pour les jours 4 et 5 (Figure 52). Ainsi l'excès d'ARA amplifie l'altération de l'apprentissage induite par le peptide Aβ : l'apprentissage est retardé sous régime « contrôle », alors que les souris sous régime « ARA » ont perdu leur capacité d'apprentissage.

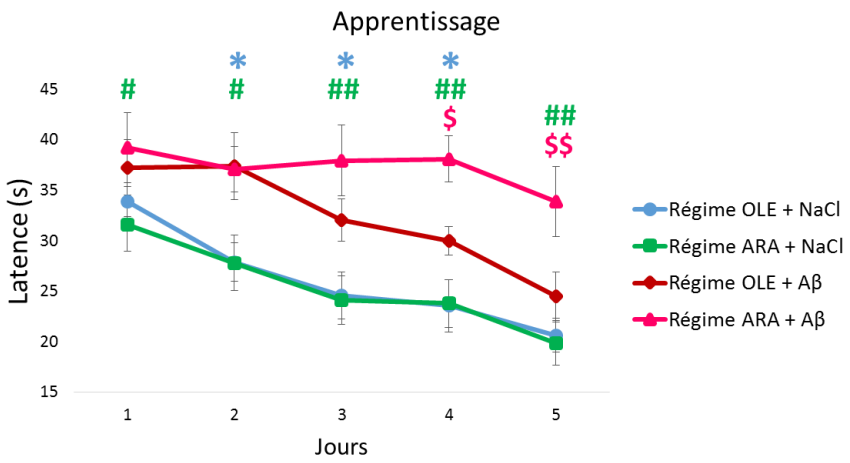


Figure 52 : Apprentissage des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesuré par le temps de latence pour atteindre la plateforme dans la piscine de Morris

Les résultats sont exprimés en secondes et représentés en moyenne ± ESM (n=10 à 13). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les courbes bleue pour le groupe « OLE + NaCl », verte pour le groupe « ARA + NaCl », rouge pour le groupe « OLE + Aβ » et rose pour le groupe « ARA + Aβ ». * : p<0,05, comparaison entre les groupes « OLE + NaCl » et « OLE + Aβ » ; # : p<0,05 et ## : p<0,01, comparaison entre les groupes « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » ; $: p<0,05 et $$: p<0,01, comparaison entre les groupes « OLE + Aβ » et « ARA + Aβ ».

5.3. Analyse de la mémoire à long terme

La phase de rétention du test comportemental de la Piscine de Morris permet d'étudier la mémoire à long terme des souris et est réalisée 14 jours après injection, après la phase d'apprentissage. Différents paramètres sont mesurés pendant cette phase de rétention, dont le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible (quadrant où se trouvait la plateforme lors de la phase d'apprentissage) et dans le quadrant opposé à la plateforme ainsi que le temps de latence pour atteindre le quadrant cible.

Nous avons observé une diminution significative du pourcentage de temps passé dans le quadrant cible chez les souris injectées avec le peptide Aβ (22% sous régime « OLE » et 17,9% sous régime « ARA ») par rapport aux souris injectées avec la solution saline (32,9% sous régime « OLE » et 26,7% sous régime « ARA »). A l'inverse, le pourcentage de temps passé dans le quadrant opposé augmente de façon significative chez les souris injectées avec le peptide Aβ (32%) par rapport aux souris injectées avec la solution saline (22,4% sous régime « OLE » et 25,9% sous régime « ARA »). Enfin le temps de latence pour atteindre le quadrant cible augmente de façon significative chez les souris injectées avec le peptide Aβ (19 secondes sous régime « OLE » et 25 secondes sous régime « ARA ») par rapport aux souris injectées avec la solution saline (9s) (Figure 53). Ces résultats indiquent une altération de la mémoire à long terme des souris injectées avec le peptide Aβ.

Si l'on compare les groupes de régimes « OLE » et « ARA », les souris sous régime « ARA » ont tendance à passer moins de temps dans le quadrant cible (26,7% sans Aβ et 17,9% avec Aβ) que les souris sous régime « OLE » (32,9% sans Aβ et 22% avec Aβ). A l'inverse, les souris sous régime « ARA » ont tendance à passer plus de temps dans le quadrant opposé à la plateforme (25,9%) que les souris sous régime « OLE » (22,4%) avec la solution saline. De la même façon, les souris sous régime « ARA » mettent plus de temps à atteindre le quadrant cible (25 secondes) que les souris sous régime « OLE » (19 secondes) en présence du peptide Aβ. Cependant ces

différences ne sont pas statistiquement significatives et ne nous permettent pas de conclure quant à l'effet de sur la mémoire à long terme des souris (Figure 53).

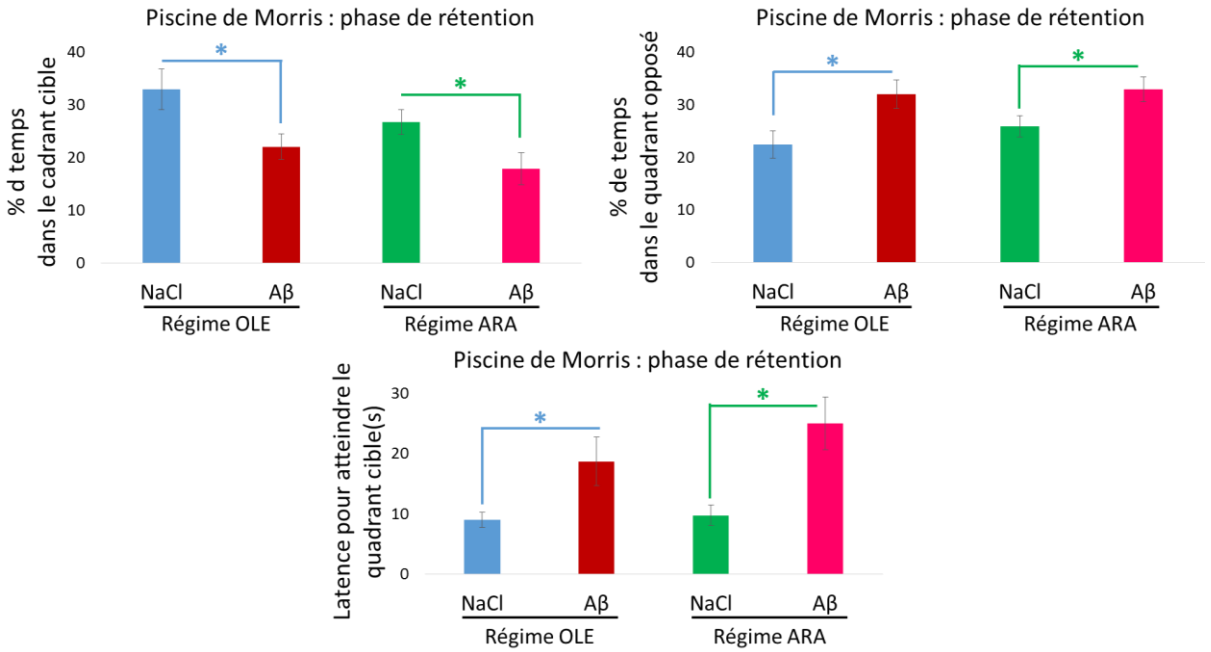


Figure 53 : Mémoire à long terme des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par le pourcentage de temps passé par les souris dans les cadrans cibles et opposés et par la latence pour atteindre le quadrant cible dans la piscine de Morris

Les résultats sont exprimés en % de temps ou en secondes et représentés en moyenne ± ESM (n=8 à 18). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». * : $p<0,05$, comparaison entre les groupes « NaCl » et « Aβ ».

L'étude des fonctions cognitives a montré qu'un enrichissement en ARA dans l'alimentation altère la mémoire à court terme et augmente la sensibilité des souris au peptide Aβ vis-à-vis de leurs capacités l'apprentissage. Nous avons vu dans la synthèse bibliographique de cette thèse que la mémoire et l'apprentissage étaient dus à la structure et la réorganisation des synapses. Les altérations cognitives induites par l'ARA et le peptide Aβ pourraient donc être la manifestation d'une altération de la fonction ou de la formation de synapses. Nous avons étudié l'influence des régimes alimentaires et de l'administration ICV d'oligomères de peptide Aβ sur l'expression de protéines impliquées dans la formation et la fonction des synapses, SNAP25 et PSD95 d'une

part, la famille des AMPA-R d'autre part. Nous allons présenter les résultats de cette étude dans le paragraphe suivant.

6. Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur l'expression de protéines impliquées dans la fonction synaptique

6.1. Analyse des marqueurs pré et postsynaptiques SNAP25 et PSD95

Nous avons mesuré l'expression de protéines synaptiques impliquées dans la fusion de vésicules synaptiques avec la membrane permettant la transmission de neurotransmetteurs. La protéine SNAP25 est une protéine présynaptique de la famille des t-SNARE et PSD95 est une protéine postsynaptique. Ces protéines ont été mesurées par Western blot et par ELISA dans des membranes enrichies en synaptosomes préparées à partir des cortex et des hippocampes de souris des différents groupes d'étude.

Aucune différence n'a été observée dans les synaptosomes d'hippocampe pour l'expression du marqueur présynaptique SNAP25, que ce soit pour les mesures par Western blot ou par ELISA (Figure 54).

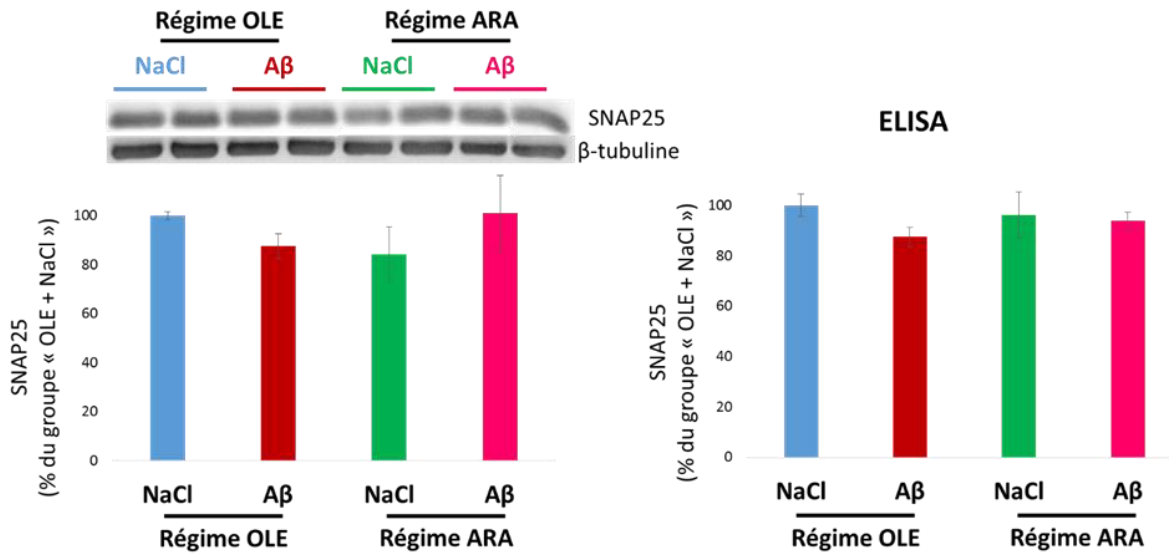


Figure 54 : Expression protéique du marqueur présynaptique SNAP25 dans les synaptosomes préparés à partir de l'hippocampe des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot (à gauche) et par ELISA (à droite)

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ».

Aucune différence significative n'a été mesurée dans les membranes enrichies en synaptosomes des hippocampes des différents groupes de souris pour l'expression protéique de PSD95. Cependant nous pouvons observer une diminution non significative de 20% de PSD95 mesuré par Western blot chez les souris « ARA + NaCl » par rapport aux souris « OLE + NaCl » (Figure 55).

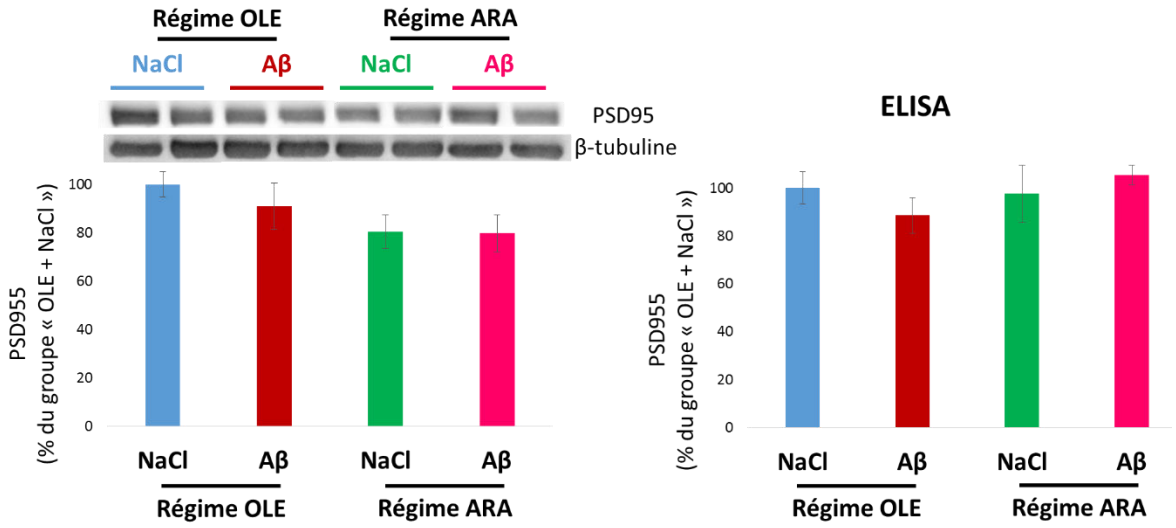


Figure 55 : Expression protéique du marqueur postsynaptique PSD95 dans les synaptosomes préparés à partir de l'hippocampe des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot (à gauche) et par ELISA (à droite)

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ».

Dans les synaptosomes de cortex, nous n'observons pas de différences d'expression de SNAP25 entre les groupes « OLE + NaCl » et « ARA + NaCl », l'apport alimentaire plus important en ARA n'a donc pas d'impact sur SNAP25. Bien que ces différences ne soient pas significatives, nous observons une baisse de l'expression de SNAP25 en présence d'Aβ de 17 % pour le régime « OLE » et de 25% pour le régime « ARA » (Figure 56). L'allure de ces résultats est proche de celle trouvée pour le pourcentage de temps passé dans le cadrant cible lors de l'analyse de la mémoire à long terme (Figure 53).

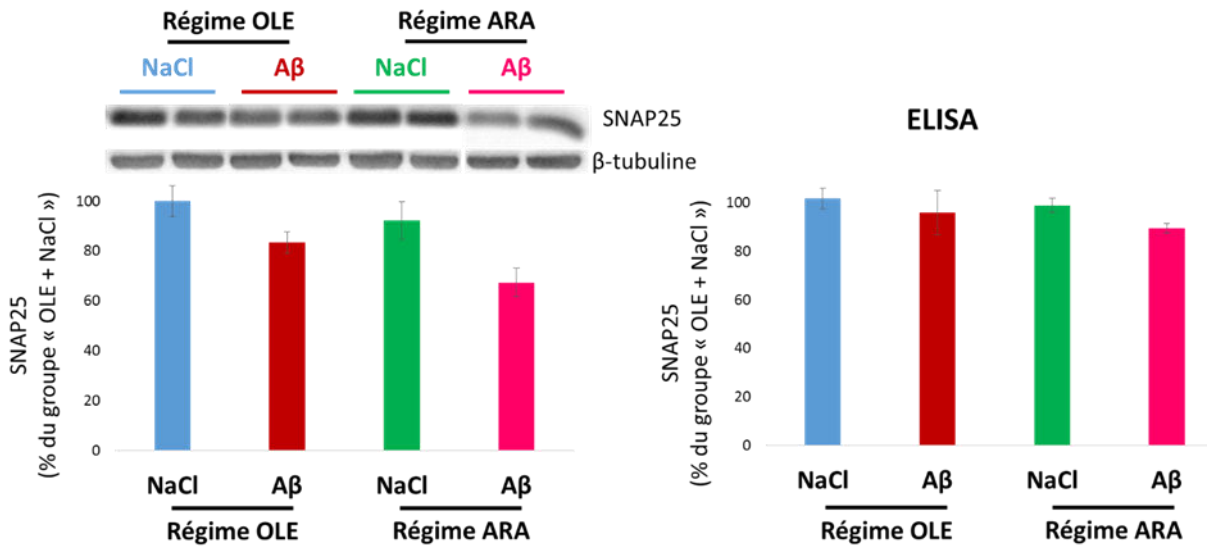


Figure 56 : Expression protéique du marqueur présynaptique SNAP25 dans le cortex des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot (à gauche) et par ELISA (à droite)

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ».

Nous avons observé une diminution significative de 29% de l'expression protéique de PSD95 dans les synaptosomes de cortex du groupe « ARA + NaCl » par rapport au groupe « OLE + NaCl », indiquant une altération de cette protéine postsynaptique induite par le régime enrichi en ARA. Pour le régime « OLE », l'Aβ induit une baisse de 20% de PSD95 mais cette diminution n'est pas significative. Pour le régime « ARA », l'injection d'Aβ n'amplifie pas la diminution de PSD95 par rapport à la solution saline (Figure 57). Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux trouvés pour les mesures d'alternance dans l'analyse des capacités de mémoire à court terme (Figure 51). La variabilité observée pour les résultats des ELISA ne nous permet pas de conclure, cependant les tendances observées sont en accord avec les résultats du Western blot.

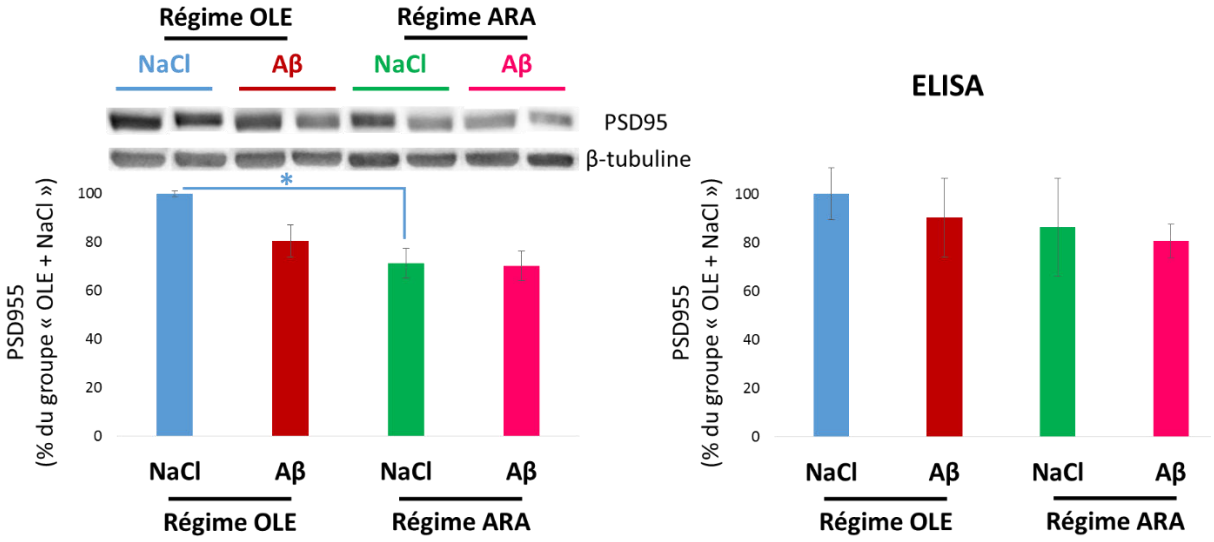


Figure 57 : Expression protéique du marqueur postsynaptique PSD95 dans le cortex des souris « OLE + NaCl», « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot (à gauche) et par ELISA (à droite)

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». * : $p<0,05$, comparaison entre les groupes « OLE + NaCl » et « ARA + NaCl ».

6.2. Analyse des récepteurs au glutamate

Afin d'étudier la fonctionnalité des synapses, nous avons mesuré par Western blot l'expression protéique des quatre sous-unités formant les AMPA-R : GLUR1, GLUR2, GLUR3 et GLUR4. Ces protéines ont été mesurées dans des homogénats de cortex et hippocampe des souris des différents groupes.

Dans l'hippocampe, nous observons des variations des quatre sous-unités des AMPA-R dans les deux groupes « ARA » par rapport aux deux groupes « OLE » avec une diminution très marquée de l'expression de ces protéines dans le groupe « ARA + Aβ ». En ce qui concerne l'effet des régimes alimentaires sur l'expression des AMPA-R, on observe une diminution de 33% de l'expression de GLUR2 (Figure 58) et de 55% de celle de GLUR4 (Figure 59) dans l'hippocampe des souris « ARA + NaCl » par rapport aux souris « OLE + NaCl ».

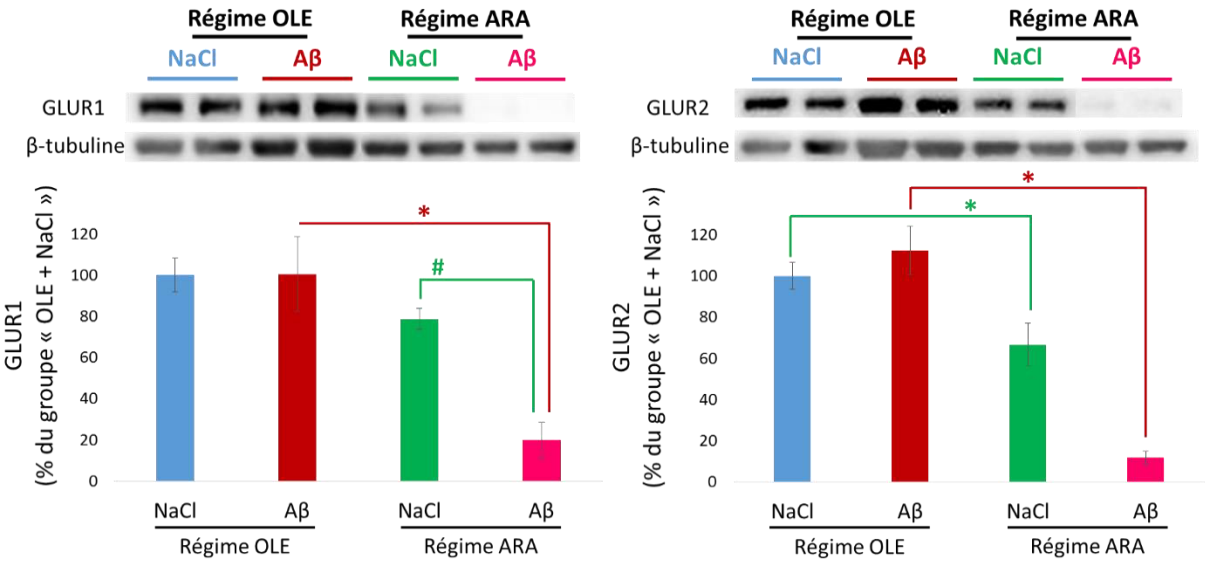


Figure 58 : Expression protéique des sous-unités GLUR1 et GLUR2 du récepteur AMPA dans l'hippocampe des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=4 à 5). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». * : p<0,05, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA » ; # : p<0,05, comparaison entre les groupes « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ ».

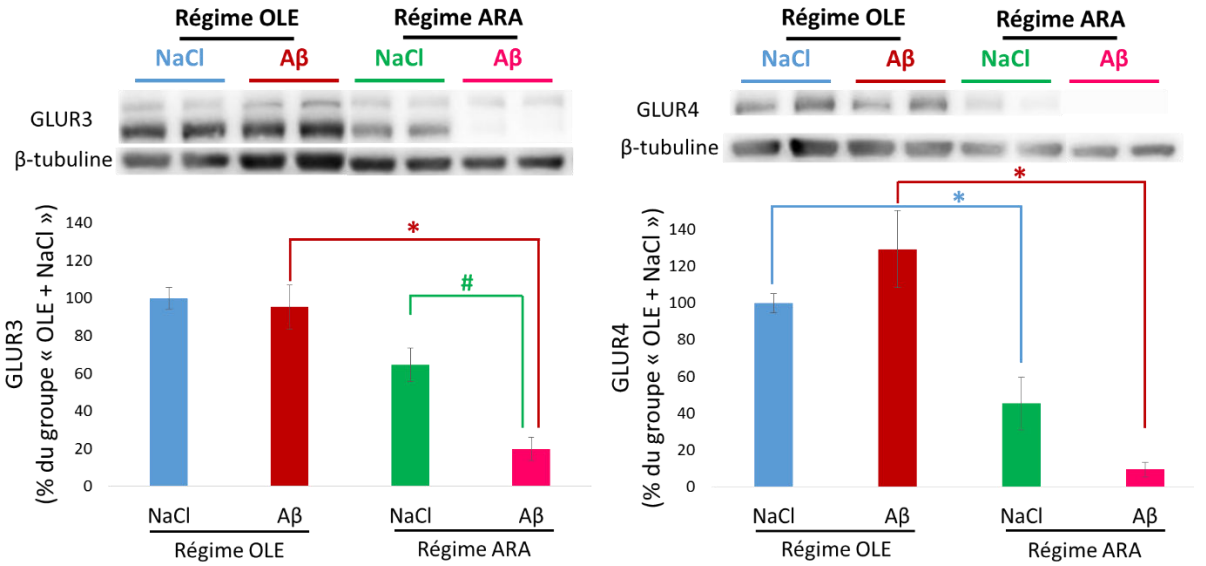


Figure 59 : Expression protéique des sous-unités GLUR3 et GLUR4 du récepteur AMPA dans l'hippocampe des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». * : p<0,05, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA » ; # : p<0,05, comparaison entre les groupes « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ ».

En ce qui concerne l'effet du peptide Aβ, aucun effet sur l'expression des AMPA-R n'a été observé dans les hippocampes des souris nourries par le régime « OLE ». Par contre, chez les souris nourries par le régime « ARA », les oligomères de peptide Aβ induisent une diminution de l'expression de 60% et 55% respectivement de GLUR1 et GLUR2 (Figure 58), de 45% et de 36% respectivement de GLUR3 et de GLUR4 (Figure 59). En l'absence d'effet du peptide Aβ dans le contexte du régime « OLE », si on compare les groupes « OLE + Aβ » et « ARA + Aβ », on constate une diminution d'expression de 80% à 90% sous-unités GLUR1 et GLUR2 (Figure 58), GLUR3 et GLUR4 (Figure 59).

Dans le cortex, les variations des quatre sous-unités de AMPA-R dans les différents groupes de souris étudiés sont plus variables et moins marquées que dans l'hippocampe. Le régime « ARA » diminue de 50% l'expression de la seule sous-unité GLUR2 (Figure 60). L'administration de peptide Aβ n'induit pas de diminution d'expression supplémentaire de cette sous-unité dans le cortex des souris nourries avec ce régime et n'altère pas l'expression corticale des autres sous-unités AMPA quel que soit le régime apporté aux souris (Figure 60 et Figure 61). L'expression de GLUR1 diminue de 30% dans le groupe « ARA + Aβ » par rapport aux autres groupes mais cette diminution n'est pas significative (Figure 60). De même, la diminution d'expression de 40% de GLUR4 dans les groupes « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » n'est pas significative (Figure 61).

Nous avons vu dans la synthèse bibliographique de cette thèse que la MA comporte une composante inflammatoire. D'autre part, l'ARA est l'AG précurseur de nombreux médiateurs inflammatoires. Nous avons également vu que certains éléments de la littérature indiquent qu'un excès d'apports alimentaires en ARA peut majorer une pathologie inflammatoire chronique. Un état subinflammatoire au niveau cérébral en rapport avec un même état en périphérie induit par le régime enrichi en ARA ou par le peptide Aβ pourrait participer aux altérations cognitives et synaptiques observées chez la souris, c'est pourquoi nous avons mesuré les taux de marqueurs de l'inflammation aux niveaux périphérique et central chez les souris des différents groupes.

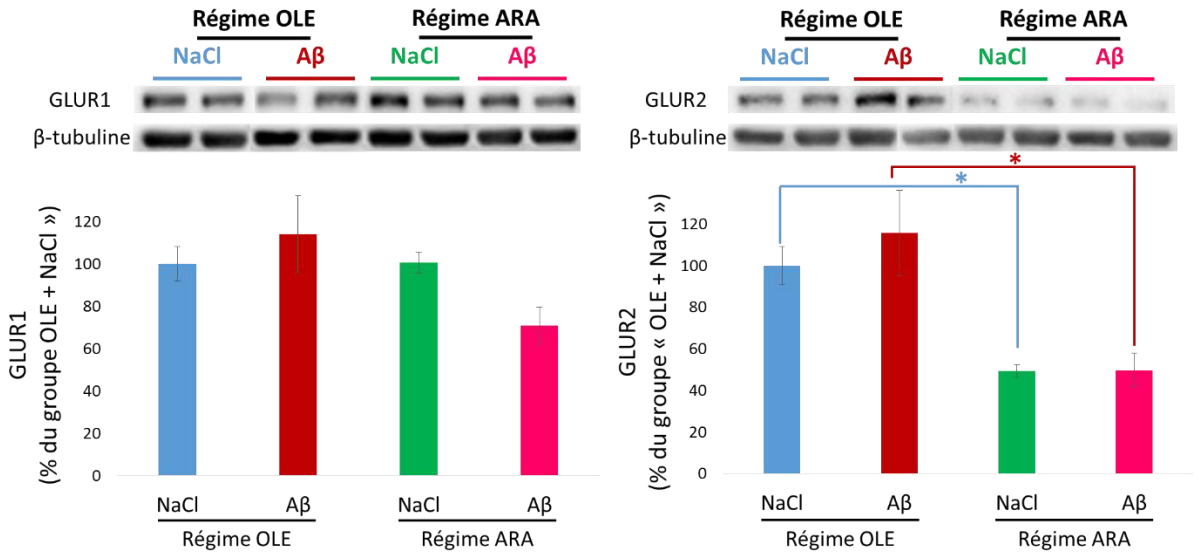


Figure 60 : Expression protéique des sous-unités GLUR1 et GLUR2 du récepteur AMPA dans le cortex des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». * : p<0,05, comparaison entre les régimes « OLE » et « ARA ».

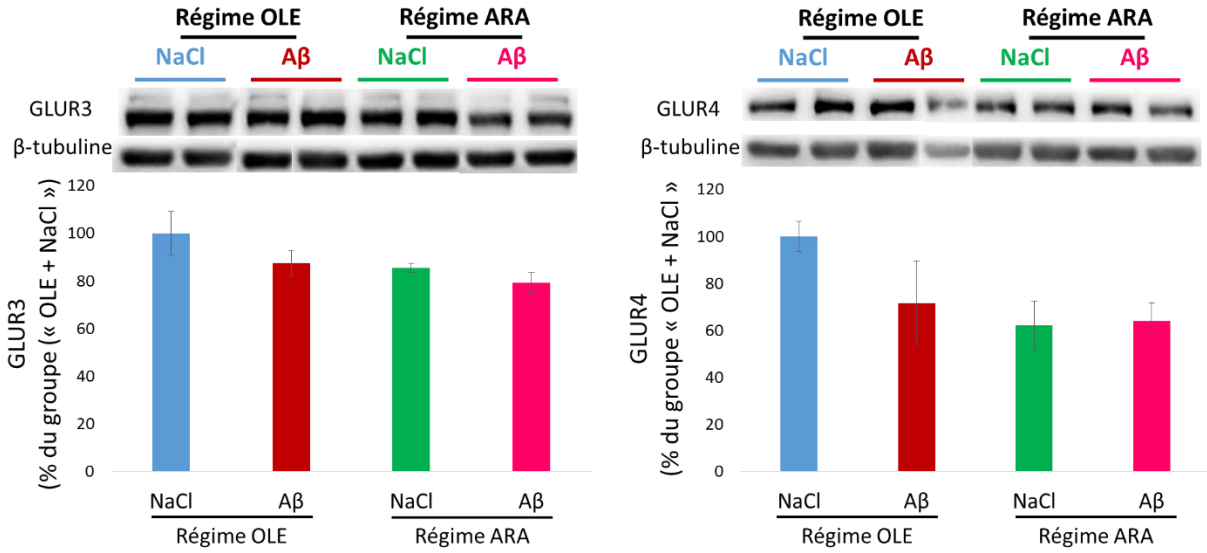


Figure 61 : Expression protéique des sous-unités GLUR3 et GLUR4 du récepteur AMPA dans le cortex des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ».

7. *Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur des marqueurs de l'inflammation périphérique et centrale*

7.1. Analyse de l'inflammation périphérique

La mesure des taux plasmatiques de CRP a été utilisée pour évaluer la présence d'une subinflammation périphérique. Cette mesure a été réalisée par la méthode ELISA dans le plasma des souris des différents groupes étudiés.

Les souris nourries avec le régime « OLE » ou le régime « ARA » ont présenté des taux de CRP identiques et dans l'intervalle des normales, ce qui indique que l'apport supplémentaire en ARA dans le régime « ARA » n'induit pas une subinflammation, du moins mise en évidence par la CRP, au niveau périphérique (Figure 62).

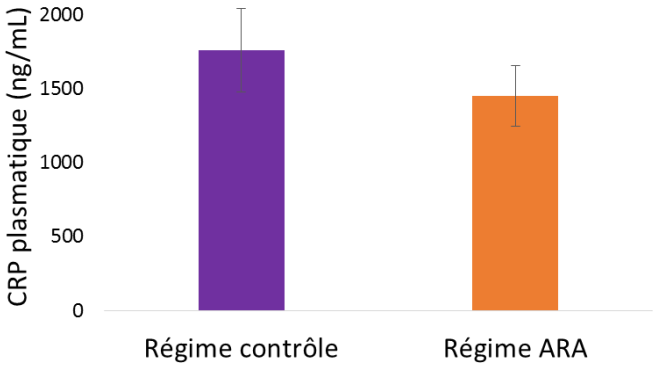


Figure 62 : Taux plasmatique de la protéine C réactive chez les souris à l'issue des 12 semaines de régimes « OLE » et « ARA »

Les résultats sont représentés en moyenne ± ESM (n=16). Les histogrammes violets correspondent à la protéine C réactive (CRP) plasmatique du groupe « OLE » et les histogrammes oranges correspondent à la CRP plasmatique du groupe « ARA ».

7.2. Analyse de l'inflammation cérébrale

Les niveaux d'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) ont été mesurés par Western blot dans les homogénats des cortex et des hippocampes des souris des différents groupes pour étudier l'impact du régime ARA et de l'injection du peptide Aβ sur l'inflammation au niveau cérébral. Les taux d'expression corticale de la GFAP ne sont modifiés ni par les régimes alimentaires ni par l'administration ICV de peptide Aβ. Les niveaux d'expression de la GFAP augmentent de 60% dans

l'hippocampe des souris du groupe « ARA + Aβ » par rapport aux souris appartenant au groupe « OLE + Aβ ». Nous pouvons observer une augmentation non significative de 36% de la GFAP dans le groupe « ARA + NaCl » par rapport au groupe « OLE + NaCl ». L'administration ICV d'oligomères de peptide Aβ induit une réaction gliale dans l'hippocampe des souris nourries pendant 12 semaines avec le régime « ARA » alors que cette réaction n'existe pas chez les souris nourries avec le régime « OLE » (Figure 63).

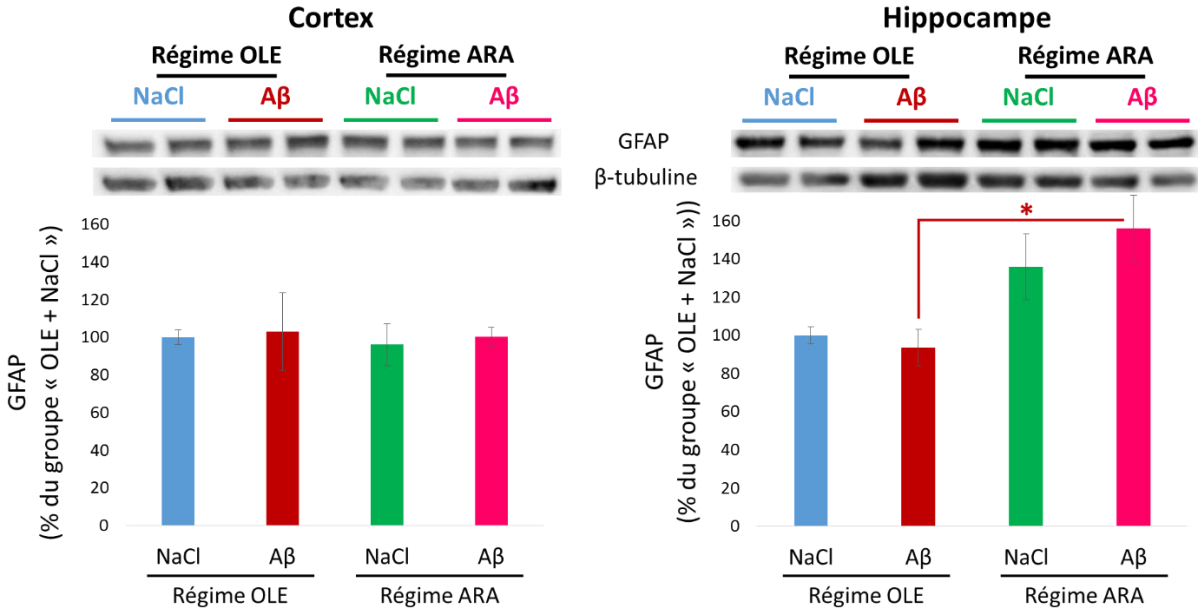


Figure 63 : Expression protéique de la GFAP dans le cortex (à gauche) et l'hippocampe (à droite) des souris des groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». * : $p<0,05$, comparaison entre les groupes « OLE + Aβ » et « ARA + Aβ ».

Ces différents résultats ont montré qu'un régime enrichi en ARA pouvait altérer la mémoire ou augmenter la sensibilité des souris vis-à-vis du peptide Aβ pour leurs capacités d'apprentissage. De plus nous avons montré que le régime enrichi en ARA affectait l'expression de protéines impliquées dans la fonction des synapses au niveau de l'hippocampe et du cortex. Les modifications des espèces phospholipidiques peuvent induire des modifications des fonctions membranaires et des interactions avec les protéines impliquées dans la fonction synaptique. Comme les membranes sont aussi

des réserves d'AG, ces modifications peuvent également moduler la libération des AG et la synthèse de médiateurs lipidiques. Ainsi une augmentation de l'ARA dans certaines espèces phospholipidiques pourrait faciliter sa libération par des PLA_2 et la synthèse consécutive d'eicosanoïdes, l'ARA et ces eicosanoïdes pouvant influencer la fonction synaptique comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique. L'activation des AG par les acyl-CoA synthétases est indispensable à leur incorporation dans les phospholipides par la voie de Kennedy (néosynthèse) ou à leur réincorporation dans le cycle de Lands. Dans ce cycle, l'activité de PLA_2 permet de libérer les AG. Les ACSL4 et ACSL6 activent préférentiellement l'ARA et le DHA. La $cPLA_2$ libère très préférentiellement l'ARA et est activée par les oligomères de peptide Aβ (Kriem *et al.*, 2005; Sanchez-Mejia *et al.*, 2008; Desbène *et al.*, 2012). Afin d'évaluer si les modifications comportementales et d'expression des protéines synaptiques que nous avons observées pouvaient être reliées à des modifications du cycle de libération/réincorporation de l'ARA ou du DHA, nous avons examiné les niveaux d'expression des enzymes potentiellement impliquées.

8. Impact des régimes et du peptide β-amyloïde sur les enzymes phospholipase A_2 cytosolique, acyl-CoA synthétase 4 et acyl-CoA synthétase 6

Nous avons mesuré par Western blot l'expression de l'enzyme $cPLA_2$, responsable de la libération de l'ARA. Aucune différence n'est observée dans le cortex et l'hippocampe des souris entre les quatre groupes « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » pour la $cPLA_2$ (Figure 64).

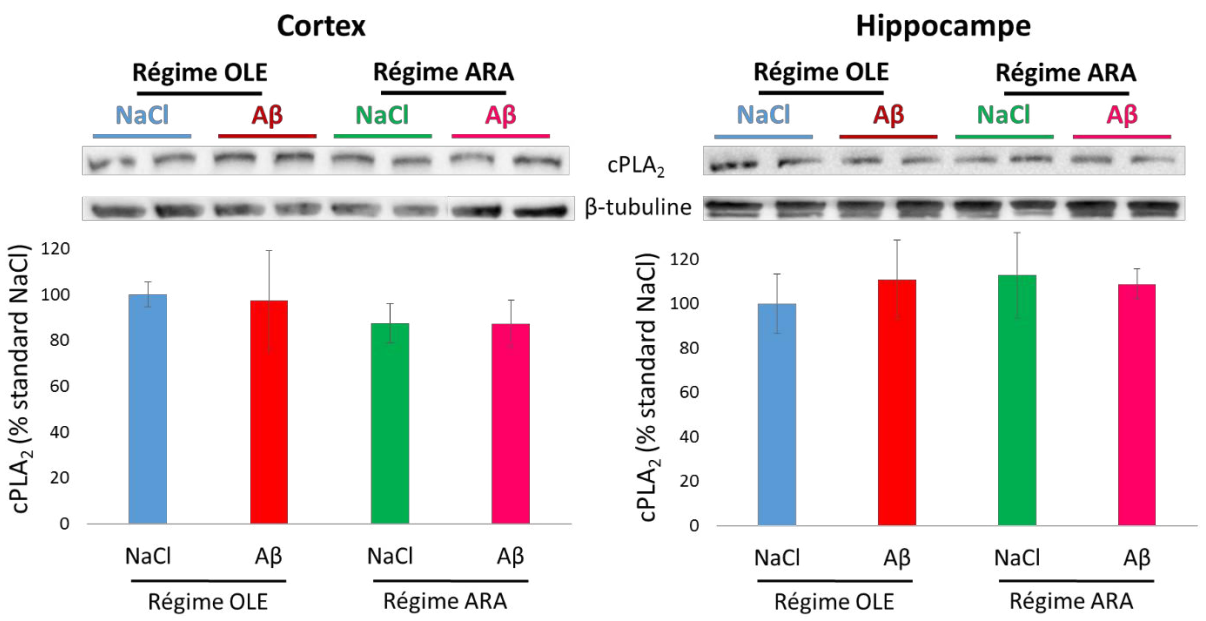


Figure 64 : Expression protéique de la $cPLA_2$ dans le cortex (à gauche) et l'hippocampe (à droite) des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ».

Nous avons ensuite mesuré par Western blot l'expression des enzymes ACSL6 et ACSL4, responsables de l'activation du DHA et de l'ARA respectivement. Aucune différence significative n'est observée dans le cortex et l'hippocampe pour l'ACSL6. Une baisse non significative de 27% et de 29% d'ACSL6 est tout de même observée dans le cortex, respectivement dans les groupes « OLE + Aβ » et « ARA + NaCl » par rapport au groupe « OLE + NaCl », et une baisse de 20 % d'ACSL6 est observée entre les groupes « OLE + Aβ » et « ARA + Aβ » (Figure 65). L'expression d'ACSL6 est très variable d'un échantillon à l'autre dans les différents groupes de souris. Cette variabilité interindividuelle ne nous permet pas de conclure quant à l'impact de l'acide arachidonique et du peptide Aβ sur l'expression protéique d'ACSL6.

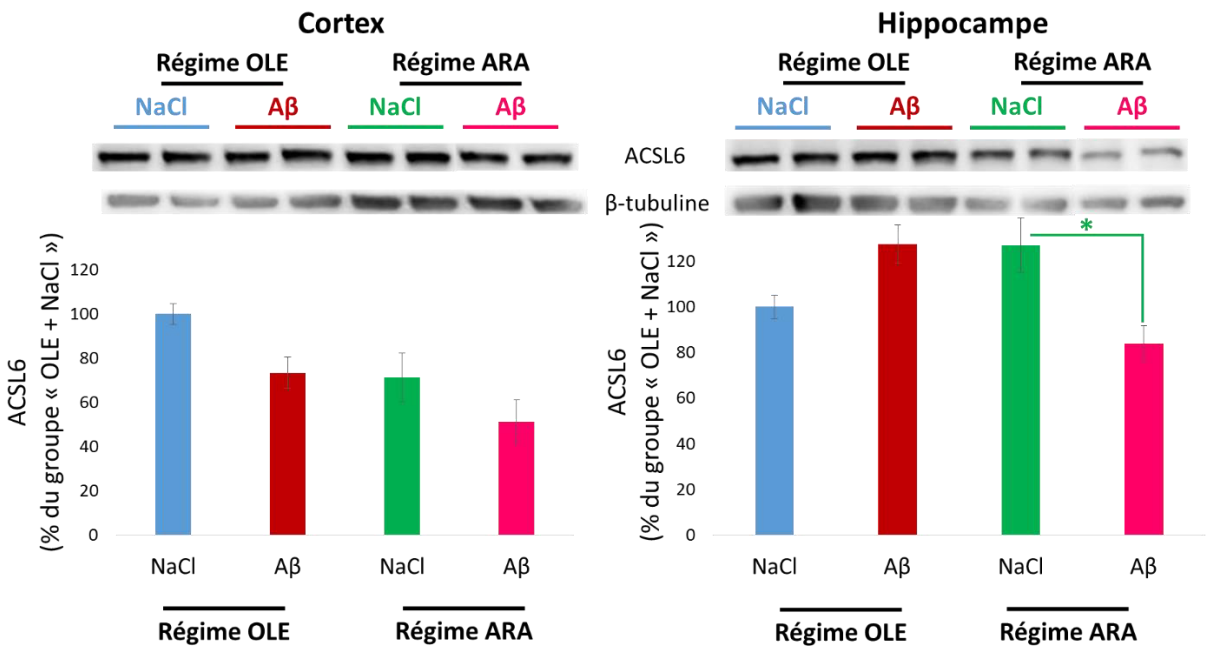


Figure 65 : Expression protéique d'ACSL6 dans le cortex (à gauche) et l'hippocampe (à droite) des souris « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». * : $p<0,05$, comparaison entre les groupes « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ ».

Deux isoformes d'ACSL4 ont été identifiées : une forme ubiquitaire et une forme neuronale (Cho, 2012). Nous avons mis en évidence l'isoforme de plus grande taille d'ACSL4 dans une lignée cellulaire neuronale, les cellules HT22 (Figure 66). L'autre isoforme n'étant pas présente dans ces cellules, la comparaison des Western blots nous a permis de confirmer que l'isoforme de plus grande taille d'ACSL4 correspond bien à la forme neuronale de cette enzyme. Nous les avons quantifiées séparément. Aucune différence n'a été observée dans le cortex des souris des différents groupes pour l'expression protéique d'ACSL4. Dans l'hippocampe, nous avons observé une diminution de 31% de l'isoforme neuronale d'ACSL4 (bande du haut) dans le groupe « ARA + Aβ » par rapport au groupe « ARA + NaCl ». Nous observons également une diminution de 24% de cette isoforme dans le groupe « OLE + Aβ » par rapport au groupe « OLE + NaCl » mais cette différence n'est pas significative. L'autre isoforme d'ACSL4 ne varie pas (Figure 66). Ces résultats suggèrent que le peptide Aβ

pourrait altérer l'expression protéique d'ACSL4 et que le régime ARA augmente cet effet.

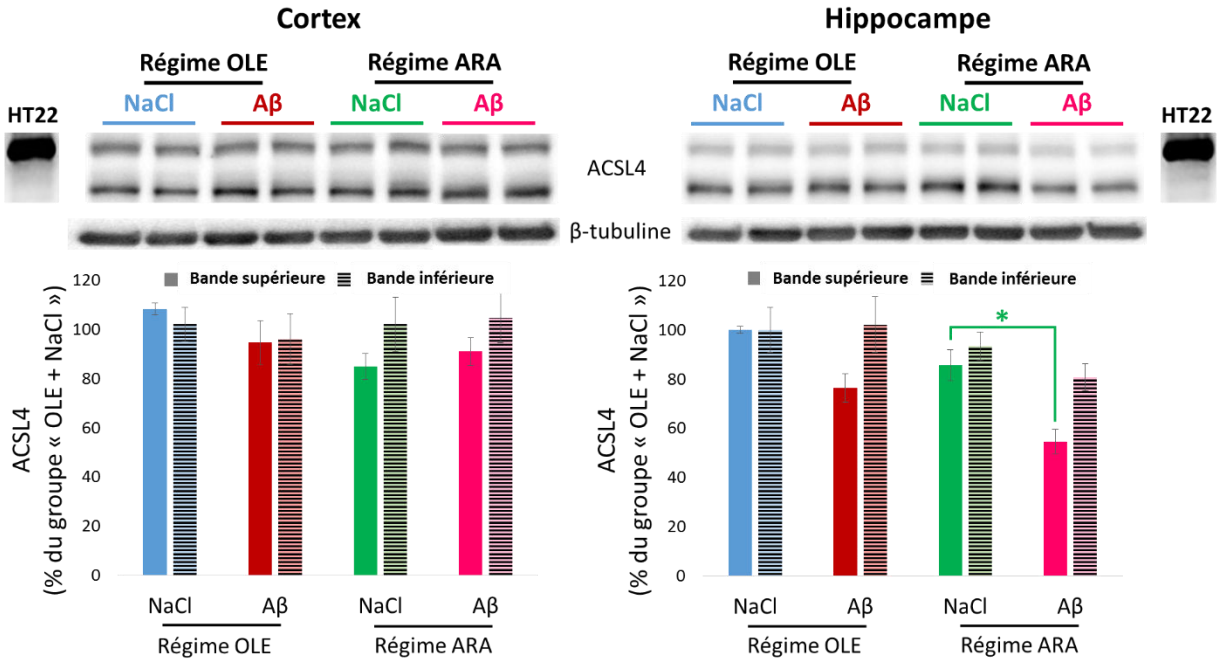


Figure 66 : Expression protéique d'ACSL4 dans le cortex (à gauche) et l'hippocampe (à droite) des souris des « OLE + NaCl », « OLE + Aβ », « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ » mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % du groupe « OLE + NaCl » et représentés en moyenne ± ESM (n=3 à 6). Les différentes conditions de régimes et injections intracérébroventriculaires sont représentées par les histogrammes bleus pour le groupe « OLE + NaCl », rouges pour le groupe « OLE + Aβ », verts pour le groupe « ARA + NaCl » et roses pour le groupe « ARA + Aβ ». * : $p<0,05$, comparaison entre les groupes « ARA + NaCl » et « ARA + Aβ ».

Nos expériences *in vivo* montrent qu'un apport alimentaire en ARA comparé à un apport en acide oléique, sans modifier les apports en AG saturés et ω-3, induit une sensibilisation aux effets des oligomères de peptide Aβ en termes de capacités cognitives et d'expression de protéines impliquées dans la fonction synaptique mais aussi en terme d'augmentation d'expression de marqueurs de la neuroinflammation. En outre, ces expériences suggèrent que l'enzyme ACSL4 pourrait être impliquée dans ces effets. Enfin, elles indiquent des phénomènes de compétition entre l'ARA, le DTA et le DHA pour l'incorporation dans les phospholipides. Le cerveau est un système pluricellulaire complexe. Pour approfondir l'étude des mécanismes sous-tendant les effets que nous avons observés *in vivo*, particulièrement l'implication d'ACSL4, nous avons utilisé un système *in vitro*, la lignée de neuroblastomes d'hippocampe de souris HT22.

II. Rôle de l'acyl-CoA synthétase 4 dans le développement des membranes neuronales

A. Introduction

Nous avons vu dans la synthèse bibliographique que les capacités cognitives reposent sur la plasticité synaptique qui est altérée au cours de la MA. La plasticité synaptique implique une réorganisation du réseau neuronal, la formation de nouvelles membranes et donc la synthèse et/ou le renouvellement des phospholipides membranaires ainsi que de leur contenu en AGPI, particulièrement en ARA et DHA. Ce renouvellement des phospholipides membranaires dépend de la disponibilité de ces AG et de l'activité des enzymes de mobilisation des AG. Parmi ces enzymes, les acyl-CoA synthétases catalysent l'activation des AG libres en acyl-CoA pour leur permettre d'incorporer différents lipides et notamment les phospholipides membranaires. L'ACSL4 active spécifiquement l'ARA en arachidonoyl-CoA. Dans cette seconde partie de notre travail, nous avons étudié le rôle de l'ACSL4 dans le développement neuronal et dans l'incorporation des AGPI dans les phospholipides membranaires. Cette étude a été réalisée sur la lignée neuronale HT22 dans laquelle nous avons mis en évidence une forte expression de l'ACSL4.

B. Développement d'un modèle de différenciation neuronale

1. Description de la lignée HT22

La sous-lignée cellulaire HT22 a été clonée à partir des cellules LT4 qui sont des cellules neuronales immortalisées à partir de neurones hippocampiques de souris. Les cellules HT22 ont été utilisées pour étudier différents champs de la biologie cellulaire en neurosciences comme les phénomènes de stress oxydant, l'excitotoxité au glutamate et les effets du peptide Aβ (Choi *et al.*, 2010; Cha *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). Nous avons choisi cette lignée car c'est une lignée murine d'origine hippocampique, l'hippocampe étant une région cérébrale critique pour beaucoup de composantes de la mémoire et atteinte en premier dans la MA. Nos résultats obtenus dans les expériences *in vivo* ont mis en évidence des altérations biochimiques

importantes dans l'hippocampe avec le régime « ARA » et l'administration d'oligomères de peptide Aβ. De plus, il est possible de différencier les cellules HT22 pour étudier la croissance neuritique qui peut refléter les phénomènes survenant dans le renouvellement des synapses.

2. *Modèle de cellules HT22 différenciées*

Nous avons mis en place un modèle de différenciation neuronale des cellules HT22 en s'inspirant d'un traitement décrit dans la publication de Zhao *et al.* (2012). Ce traitement contient 50 ng/mL de *NGF* permettant la croissance neuronale, 100 µM de dibutyryl cAMP stimulant la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique, 100 µM de phorbol 12,13-dibutyrate activant la protéine kinase C et du supplément N2 contenant un cocktail d'hormones. Les cellules HT22 ont été exposées au traitement de différenciation pendant 24 et 48h (Figure 67).

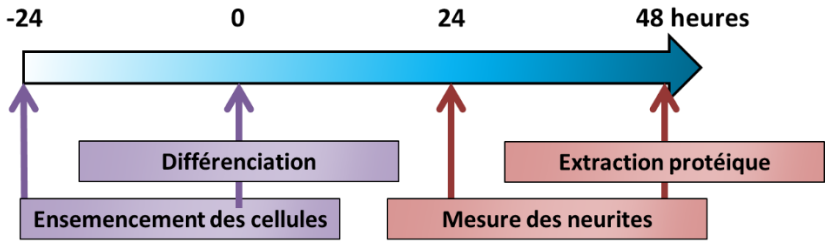


Figure 67 : Protocole de différenciation des cellules HT22

Nous avons observé un changement de morphologie des cellules HT22 avec une apparition de prolongements cellulaires dès 24 heures de traitement, plus prononcés à 48 heures (Figure 68). Ces prolongements sont assimilés à des neurites.

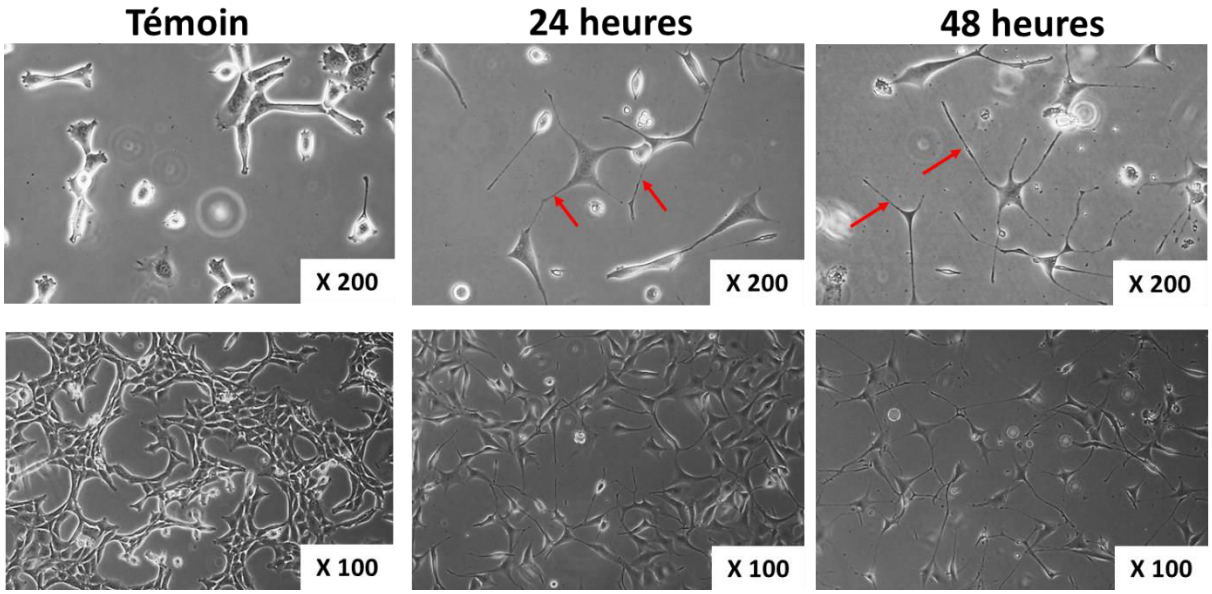


Figure 68 : Cellules HT22 avant différenciation (témoin) et après 24 et 48 heures de différenciation (grossissement X100 et X200)

3. Validation du modèle de différenciation

3.1. Analyse morphologique : mesure des neurites

Afin de valider le modèle de différenciation des cellules HT22, nous avons mesuré à l'aide du logiciel Image J la taille des prolongements cellulaires. Une cellule est considérée comme différenciée lorsqu'elle possède un ou plusieurs prolongement(s) cellulaires dont la longueur est égale ou supérieur au diamètre de son corps cellulaire (Costa *et al.*, 2011). La mesure des neurites nous a permis de calculer plusieurs paramètres se basant sur la longueur et le nombre de neurites. La longueur totale des neurites pour chaque cellule est multipliée par 8 après 24h et par 10 après 48h de différenciation par rapport aux HT22 non différenciées (temps 0). La longueur moyenne de la neurite la plus longue par cellule est multipliée par 4,5 après 24h et par 6 après 48h de différenciation. Ce dernier paramètre montre une différence entre 24h et 48h de différenciation. Il n'y a pas ou très peu de neurites au temps 0. Il y a en moyenne 1,3 neurites par cellule après 24h et 1,8 neurites par cellule après 48h de traitement de différenciation. Enfin le pourcentage de cellules avec neurites, et donc de cellules différenciées, est de moins de 5% au temps 0 alors que plus de 90% des cellules sont différenciées dès 24h de différenciation. Ces différents résultats nous permettent de

valider notre modèle de différenciation au niveau morphologique. La plupart des cellules sont différenciées dès 24h de traitement de différenciation mais cette différenciation est renforcée après 48h d'incubation (Figure 69).

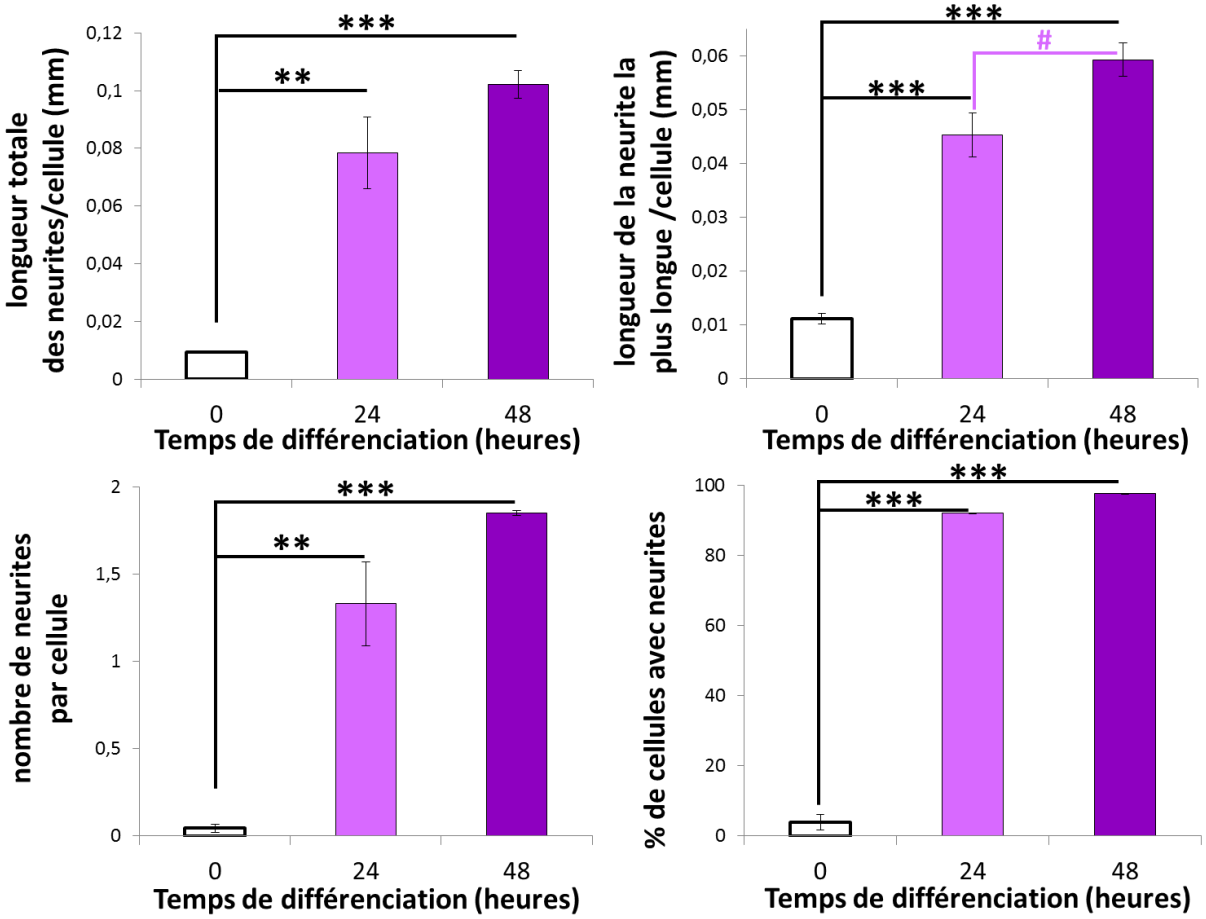


Figure 69 : Etude morphologique des cellules HT22 par la mesure des neurites avant différenciation et après 24 et 48h de différenciation

Les résultats sont représentés en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions) en fonction du temps. Les paramètres calculés sont la longueur totale des neurites par cellule (en mm), la longueur de la neurite la plus longue pour chaque cellule (en mm), le nombre de neurites par cellule et le pourcentage de cellules avec neurites. Les différentes conditions sont représentées par les histogrammes blancs pour les HT22 avant différenciation, parmes après 24h de différenciation et violets après 48h de différenciation. ** : p<0,01, *** : p<0,001, comparaison aux cellules avant différenciation ; # : comparaison entre 24 et 48h de différenciation.

3.2. Marqueur protéique de la différenciation

Nous avons mesuré l'expression de la sous-unité 1 du récepteur au glutamate NMDA-R car ce récepteur est considéré comme un marqueur de différenciation neuronale (Asahi *et al.*, 1998). NMDA-R1 a été mesuré par Western blot sur cellules non différenciées (avant le traitement de différenciation) et sur cellules différenciées

(après 48h de traitement de différenciation). Après 48h de différenciation, l'expression de NMDA-R1 est presque deux fois plus élevée que dans les cellules avant le traitement de différenciation (Figure 70). Ce résultat permet de valider le modèle de différenciation par un marqueur biochimique de différenciation : le NMDA-R1.

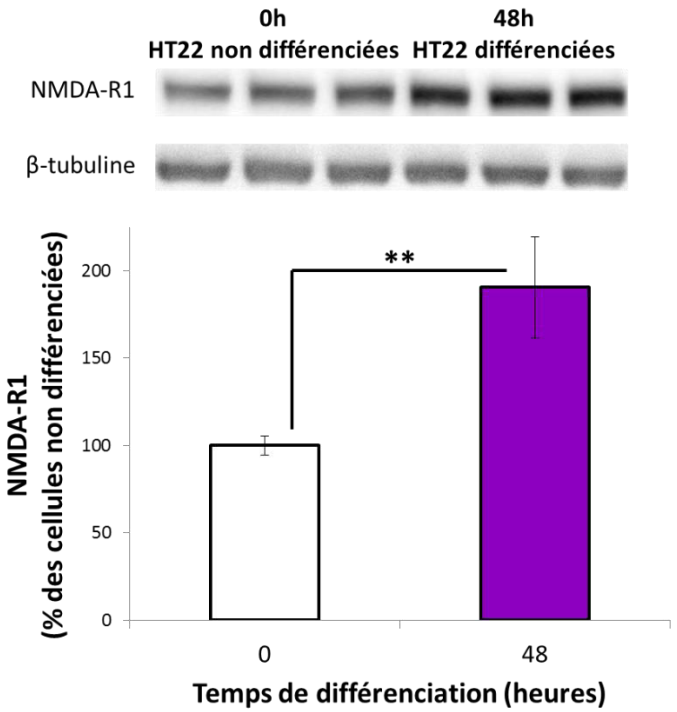


Figure 70 : Expression protéique du marqueur de différenciation NMDA-R1 dans les cellules HT22 non différenciées (avant le traitement de différenciation) et différenciées (après 48h de traitement de différenciation) mesurée par Western blotFigure 69

Les résultats sont exprimés en % des cellules non différenciées et représentés en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions) en fonction du temps. Les différentes conditions sont représentées par les histogrammes blanc pour les HT22 non différenciées et violet pour les HT22 différenciées. ** : p<0,01, comparaison entre les HT22 non différenciées et différenciées.

Une fois le modèle de différenciation neuronale validé aux niveaux morphologique et biochimique, nous avons utilisé ce modèle cellulaire pour étudier le rôle d'ACSL4 dans la différenciation neuronale.

C. Rôle de l'acyl-CoA synthétase 4 dans la différenciation neuronale

1. *Expression protéique des acyl-CoA synthétases 4 et 6 dans la différenciation neuronale*

La différenciation neuronale est un élément important dans le neurodéveloppement. Nous avons mesuré par Western blot l'expression d'ACSL4 dans les HT22 non différenciées et différenciées. Une augmentation de plus de 40% de l'expression protéique d'ACSL4 a été observée dans les cellules différenciées par rapport aux cellules non différenciées (Figure 71). Ce résultat suggère que l'ACSL4 pourrait avoir un rôle dans la différenciation neuronale.

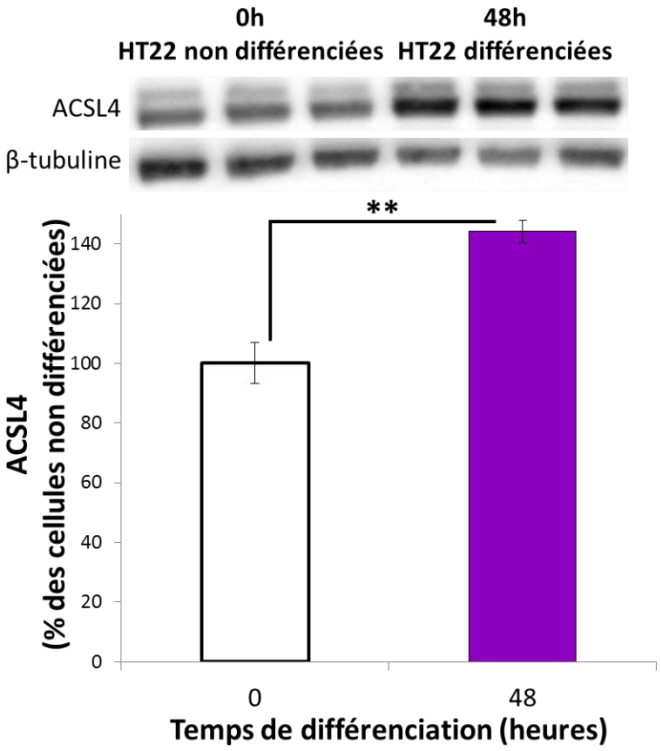


Figure 71 : Expression protéique de l'ACSL4 dans les cellules HT22 non différenciées (avant le traitement de différenciation) et différenciées (après 48h de traitement de différenciation) mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % des cellules non différenciées et représentés en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions) en fonction du temps. Les différentes conditions sont représentées par les histogrammes blanc pour les HT22 non différenciées et violet pour les HT22 différenciées. ** : p<0,01, comparaison entre les HT22 non différenciées et différenciées.

Nous avons également mesuré par Western blot l'expression d'ACSL6 dans les HT22 non différenciées et différenciées. Une augmentation non significative de 20% de

l'expression protéique d'ACSL6 a été observée dans les cellules différenciées par rapport aux cellules non différenciées (Figure 72). Cette différence ne permet pas de suggérer un rôle de l'ACSL6 dans la différenciation des HT22.

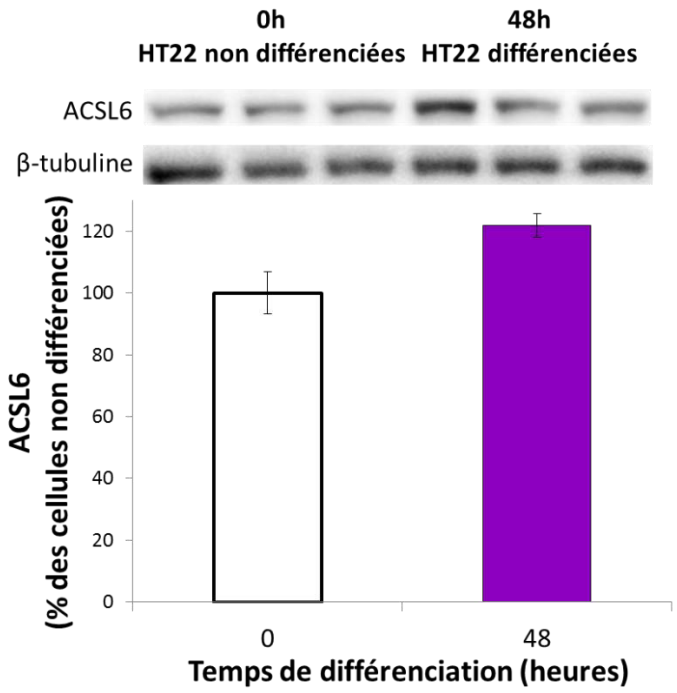


Figure 72 : Expression protéique de l'ACSL6 dans les cellules HT22 non différenciées (avant le traitement de différenciation) et différenciées (après 48h de traitement de différenciation) mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % des cellules non différenciées et représentés en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions) en fonction du temps. Les différentes conditions sont représentées par les histogrammes blanc pour les HT22 non différenciées et violet pour les HT22 différenciées.

2. Impact d'une diminution de l'expression de l'acyl-CoA synthétase 4 sur la différenciation neuronale

Nous avons diminué l'expression d'ACSL4 pour déterminer le rôle de cette enzyme dans la différenciation de la lignée HT22. Les cellules HT22 ont été transfectées avec des siRNA ciblant l'ACSL4 complexés avec l'interferrin® puis sont différenciées 24 heures après la transfection. La mesure des neurites et l'extraction protéique sont réalisées après 24h de différenciation (Figure 73).

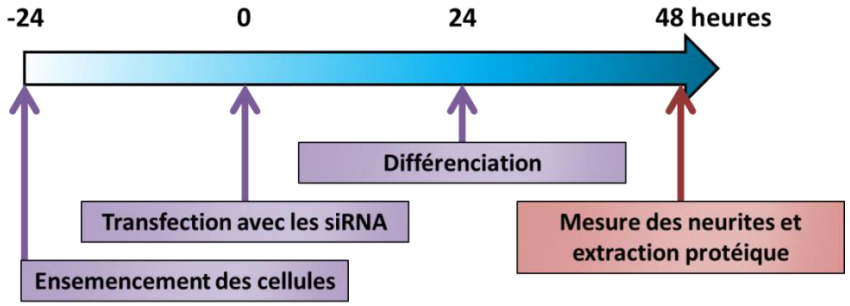


Figure 73 : Protocole de différenciation des cellules HT22 après une sous-expression d'ACSL4

L'expression protéique d'ACSL4 est mesurée par Western blot pour vérifier le taux de diminution de l'expression d'ACSL4 dans les cellules HT22. L'expression protéique d'ACSL4 diminue de 60% en présence des siRNA ciblant ACSL4, ce qui permet de valider le protocole de transfection des cellules avec les siRNA (Figure 74).

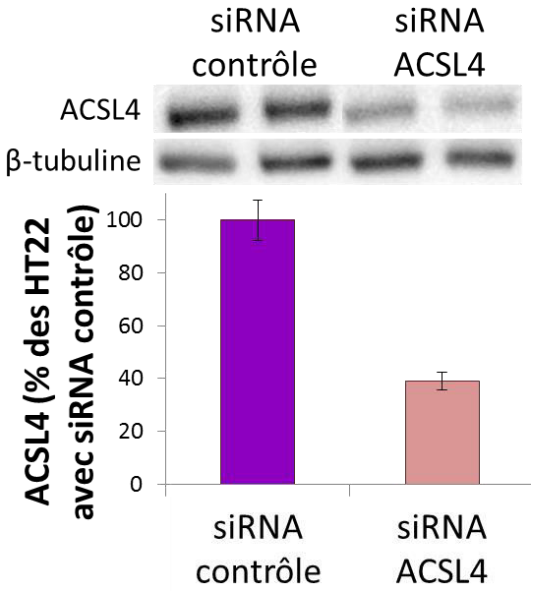


Figure 74 : Expression protéique d'ACSL4 dans les cellules HT22 après une transfection avec des siRNA ciblant l'ACSL4

Les résultats sont exprimés en % des cellules transfectées avec les siRNA contrôles et représentés en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions). Les différentes conditions sont représentées par les histogrammes violet pour les HT22 transfectées avec les siRNA contrôles et rose pour les HT22 transfectées avec les siRNA ACSL4.

La longueur des neurites a été mesurée dans les cellules transfectées avec les siRNA ACSL4 et dans les cellules témoins. Le pourcentage de cellules avec neurites a été mesuré mais aucune différence n'a été observée entre les deux groupes de cellules (Figure 75). Une sous-expression de 60% d'ACSL4 n'a pas d'influence sur la croissance

des neurites et donc sur la différenciation des cellules HT22. Bien qu'ACSL4 n'ait pas d'influence sur la croissance des neurites, un changement d'activité de cette enzyme pourrait affecter la répartition des AG dans les phospholipides membranaires. Nous avons par la suite étudié le rôle d'ACSL4 dans l'incorporation des AGPI dans les phospholipides membranaires, et plus particulièrement l'incorporation du DHA et de l'ARA.

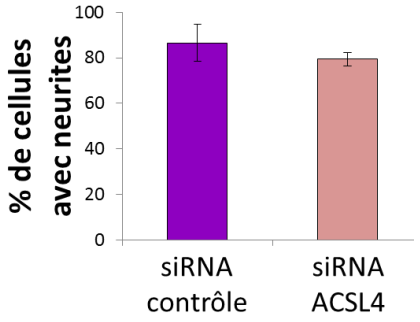


Figure 75 : Pourcentage de cellules HT22 avec neurites après une sous-expression de 60% d'ACSL4 et 24h de différenciation

Les résultats sont exprimés en % des cellules transfectées avec les siRNA contrôles et représentés en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions). Les différentes conditions sont représentées par les histogrammes violet pour les HT22 transfectées avec les siRNA contrôles et rose pour les HT22 transfectées avec les siRNA ACSL4.

D. Rôle de l'acyl-coA synthétase 4 dans l'incorporation des acides arachidonique et docosahexaénoïque au sein des phospholipides membranaires

1. Expression protéique des acyl-CoA synthétases 4 et 6 en présence des acides arachidonique et docosahexaénoïque

Après 24 heures de différenciation, les cellules HT22 différenciées ont été traitées pendant 24 heures avec 5 µM de DHA ou d'ARA en présence d'albumine délipidée (Figure 76).

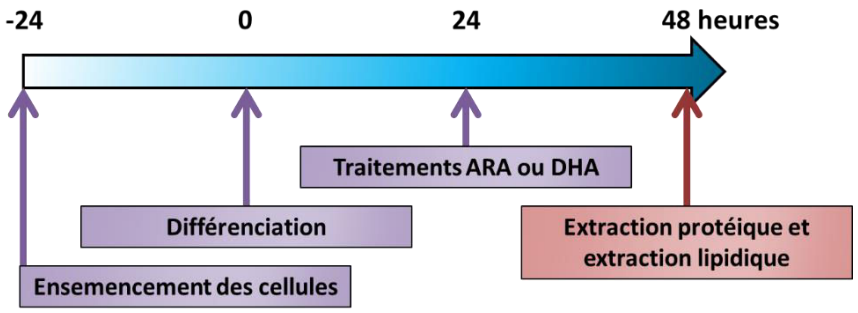


Figure 76 : Protocole de traitement des HT22 différenciées avec les acides arachidonique et docosahexaénoïque

Les expressions protéiques d'ACSL4 et d'ACSL6 ont été mesurées par Western blot dans ces cellules. Le traitement des cellules HT22 avec 5 µM de DHA ne modifie pas l'expression protéique d'ACSL4. En revanche cette expression augmente de 25% en présence de 5 µM d'ARA (Figure 77), ce qui suggère l'existence d'un phénomène de régulation positive entre ACSL4 et son substrat l'ARA dans les cellules HT22 alors que le régime « ARA » induisait une diminution de l'expression de la forme neuronale d'ACSL4 *in vivo*.

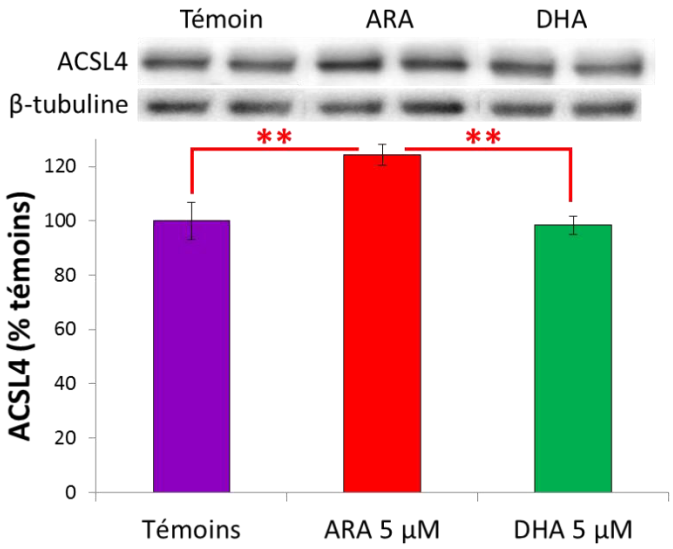


Figure 77 : Expression protéique de l'ACSL4 dans les cellules HT22 différenciées traitées avec 5 µM d'acide arachidonique ou docosahexaénoïque mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % des cellules témoins et représentés en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions). Les différentes conditions sont représentées par les histogrammes violet pour les HT22 non traitées (témoins), rouge pour les HT22 traitées avec l'acide arachidonique (ARA) et vert pour les HT22 traitées avec l'acide docosahexaénoïque (DHA). ** : p<0,01, comparaison avec les HT22 traitées avec l'ARA.

L'expression protéique d'ACSL6 augmente de 40% en présence de 5µM d'ARA et de 50% en présence de 5µM de DHA. La différence en présence de DHA n'est pas significative car les résultats sont très variables (Figure 78). Cela suggère l'existence d'un phénomène de régulation positive entre l'ACSL6 et l'ARA dans les cellules HT22. La variabilité des résultats en présence du DHA ne permet pas de conclure quant à une régulation positive entre l'ACSL6 et le DHA.

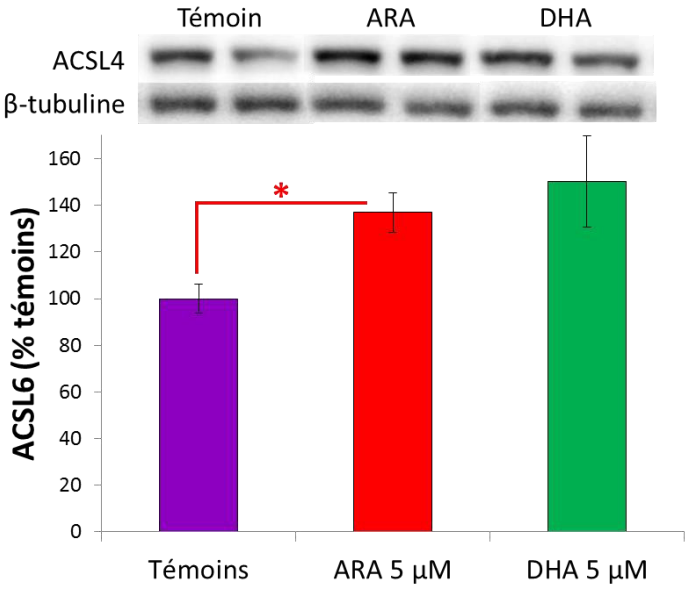


Figure 78 : Expression protéique de l'ACSL6 dans les cellules HT22 différenciées traitées avec 5 µM d'acide arachidonique ou docosahexaénoïque mesurée par Western blot

Les résultats sont exprimés en % des cellules témoins et représentés en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions). Les différentes conditions sont représentées par les histogrammes violet pour les HT22 non traitées (témoins), rouge pour les HT22 traitées avec l'acide arachidonique (ARA) et vert pour les HT22 traitées avec l'acide docosahexaénoïque (DHA). * : $p<0,05$, comparaison avec les HT22 traitées avec l'ARA.

2. Impact de traitements en acides arachidonique et docosahexaénoïque sur la répartition des phospholipides membranaires

La composition et les taux des espèces phospholipidiques des classes PE, PS, PI et PC a été analysée par LCMSMS dans les cellules HT22 différenciées transfectées avec des siRNA contrôles ou ciblant ACSL4 et traitées avec 5 µM d'ARA ou de DHA (Figure 79). Nous nous sommes intéressés aux espèces phospholipidiques contenant de l'ARA ou du DHA. Ces espèces ont été identifiées par la MS par leur ratio m/z (nombre de masses / nombre de charges) de même que dans les expériences *in vivo* (Tableau III, page 146). De même que dans les expériences *in vivo*, nous avons calculé la somme des aires de l'ensemble des espèces contenant du DHA, de l'ARA, du DTA ou du DPA dans la classe de phospholipides considérée (PI, PC, PS, PE) et exprimé la proportion de chaque espèce dans la classe par rapport à cette somme.

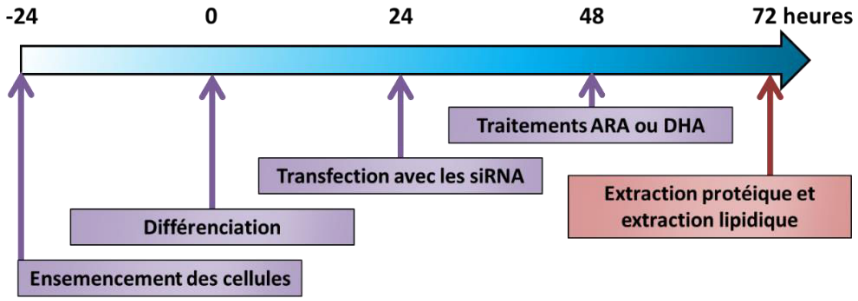


Figure 79 : Protocole de traitement des HT22 différenciées avec les acides arachidonique ou docosahexaénoïque après une transfection avec des siRNA contrôles ou ciblant ACSL4

Dans les cellules HT22, les espèces phospholipidiques PI contiennent majoritairement de l'ARA. En effet 95% des espèces PI analysées sont des espèces contenant de l'ARA. L'espèce la plus importante est le PI 18:0/20:4 qui représente 85% des PI. Aucune différence n'a été observée entre les différents traitements et les différentes transfections pour les espèces PI (Figure 80).

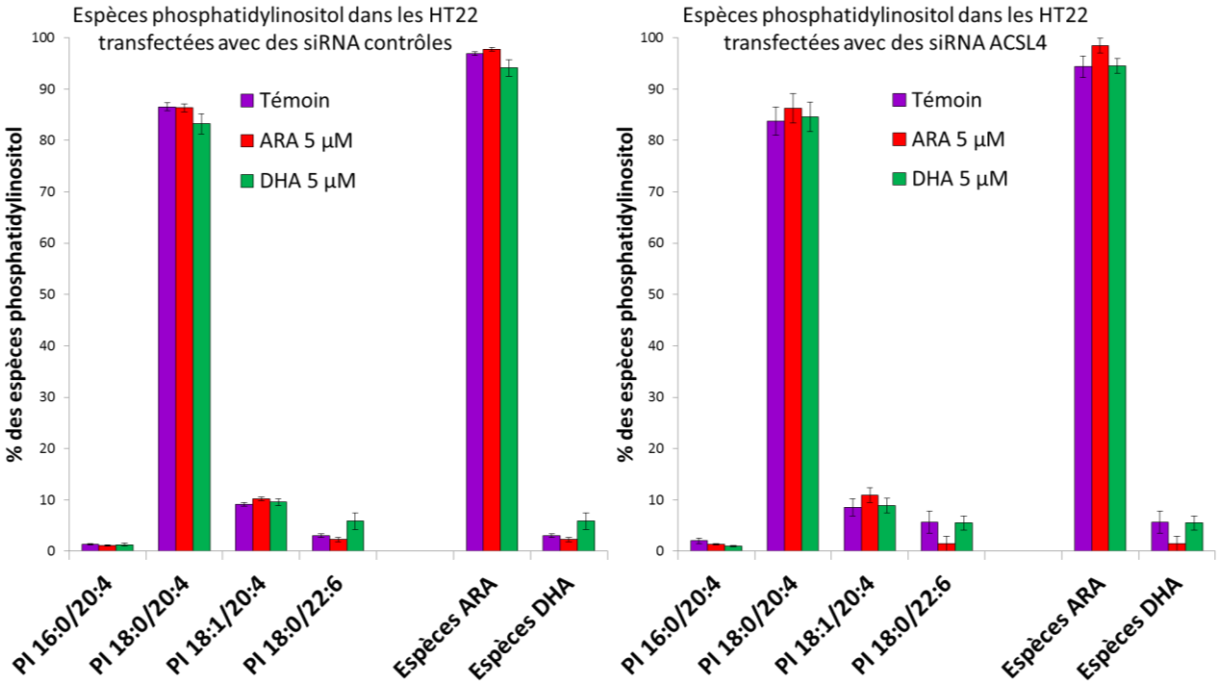


Figure 80 : Répartition des espèces phosphatidylinositol contenant les acides arachidonique et docosahexaénoïque dans les cellules HT22 transfectées avec des siRNA contrôles (à gauche) ou ACLS4 (à droite) et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylinositol (PI) et en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions). Les différents traitements sont représentés par les histogrammes violets pour les HT22 non traitées (témoins), rouges pour les HT22 traitées avec l'acide arachidonique (ARA) et verts pour les HT22 traitées avec l'acide docosahexaénoïque (DHA).

Les espèces phospholipidiques PS ne diffèrent pas non plus entre les différents traitements et transfections des cellules HT22. L'espèce majoritaire des PS est l'espèce PS 18:0/22:6 qui contient du DHA et représente entre 50% et 65% des espèces PS étudiées (Figure 81).

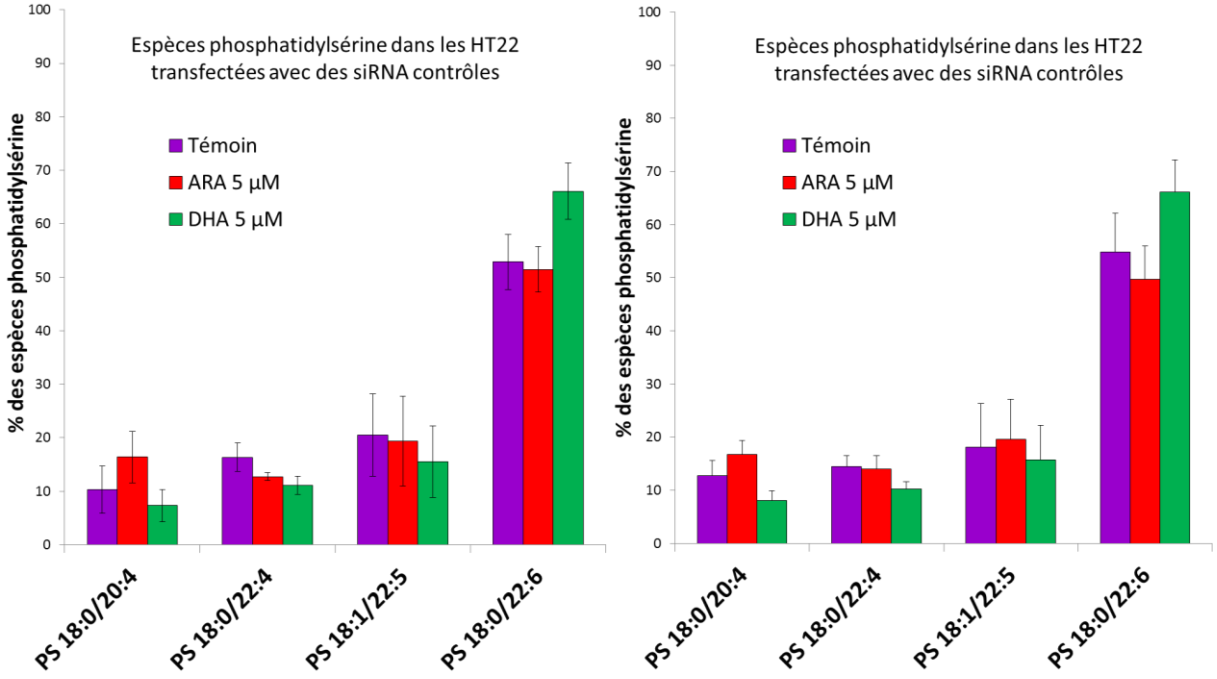


Figure 81 : Répartition des espèces phosphatidylsérine contenant les acides arachidonique et docosahexaénoïque dans les cellules HT22 transfectées avec des siRNA contrôles (à gauche) ou ACLS4 (à droite) et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylsérine (PS) et en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions). Les différents traitements sont représentés par les histogrammes violets pour les HT22 non traitées (témoins), rouges pour les HT22 traitées avec l'acide arachidonique (ARA) et verts pour les HT22 traitées avec l'acide docosahexaénoïque (DHA).

Les PC contiennent plus d'ARA (plus de 50% des espèces identifiées) que de DHA (entre 15 et 45% des espèces identifiées). Nous avons observé des variations en sens inverse des proportions des espèces contenant du DHA et de l'ARA lors des traitements en AG des cellules transfectées avec les siRNA contrôles. En présence d'ARA, les espèces contenant de l'ARA sont augmentées tandis que les espèces contenant du DHA sont diminuées. A l'inverse, en présence de DHA, les espèces contenant de l'ARA diminuent et les espèces contenant du DHA augmentent. Nous

n'avons pas observé de différence entre les cellules transfectées avec les siRNA contrôles et celles transfectées avec les siRNA ACSL4 (Figure 82).

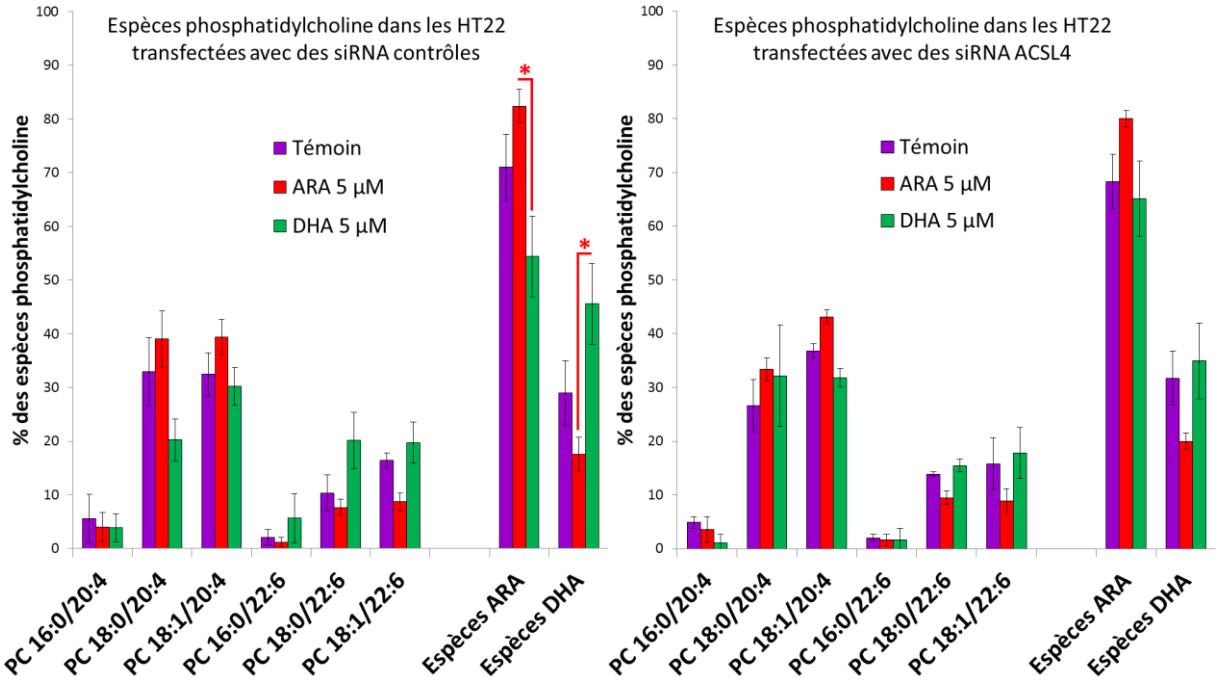


Figure 82 : Répartition des espèces phosphatidylcholine contenant les acides arachidonique et docosahexaénoïque dans les cellules HT22 transfectées avec des siRNA contrôles (à gauche) ou ACLS4 (à droite) et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylcholine (PC) et en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions). Les différents traitements sont représentés par les histogrammes violets pour les HT22 non traitées (témoins), rouges pour les HT22 traitées avec l'acide arachidonique (ARA) et verts pour les HT22 traitées avec l'acide docosahexaénoïque (DHA). * : $p<0,05$, comparaison entre les traitements ARA et DHA.

Les espèces PE contenant de l'ARA, du DHA, du DTA et du DPA sont particulièrement nombreuses et diverses dans les HT22 comme dans les structures cérébrales, cortex et hippocampe. Elles comportent aussi bien des espèces acyl (2 liaisons esters avec les AG) que plasmalogènes (une liaison ester et une liaison éther). Le traitement par l'ARA 5 µM des cellules HT22 transfectées par les siRNA contrôles augmente les espèces ARA acyl a18:1/20:4 et plasmalogène p18:1/20:4 au détriment des espèces contenant du DHA acyl a18:0/22:6 et plasmalogènes p18:0/22:6 et p18:1/22:6 (Figure 83). Quand ces cellules sont traitées avec du DHA 5 µM, les proportions des espèces acyl a18:0/22:6 et plasmalogène p18:0/22:6 et p18:1/22:6 augmentent alors qu'elles baissaient avec le traitement par l'ARA (Figure 83). Ces

variations des espèces individuelles se traduisent par une diminution globale des espèces contenant du DHA et une augmentation des espèces contenant de l'ARA avec le traitement des HT22 par l'ARA et la modification inverse avec le traitement par le DHA (Figure 83).

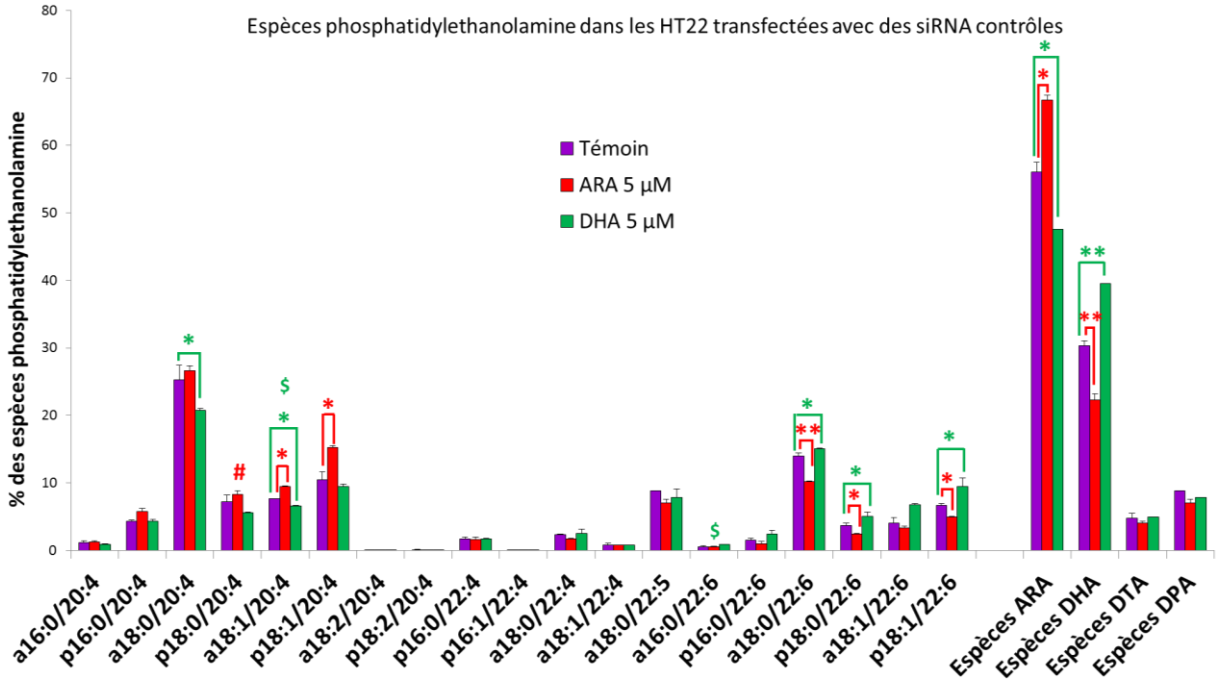


Figure 83 : Répartition des espèces phosphatidylethanolamine contenant les acides arachidonique ou docosahexaénoïque dans les HT22 transfectées avec des siRNA contrôles et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylethanolamine (PE) et en moyenne ± ESM (n=3 puits, N=3 répétitions). Les différents traitements sont représentés par les histogrammes violets pour les HT22 non traitées (témoins), rouges pour les HT22 traitées avec l'acide arachidonique (ARA) et verts pour les HT22 traitées avec l'acide docosahexaénoïque (DHA). * : p<0,05, ** : p<0,01, comparaison des HT22 témoins avec les HT22 traitées avec l'ARA ou le DHA ; # : p<0,05, comparaison sous traitement avec l'ARA entre les HT22 transfectées avec les siRNA contrôles et celles transfectées avec les siRNA ACSL4 ; $: p<0,05, comparaison sous traitement avec le DHA entre les HT22 transfectées avec les siRNA contrôles et celles transfectées avec les siRNA ACSL4 (Figure 84).

Après transfection des cellules HT22 par les siRNA ciblant ACSL4, la proportion de l'espèce plasmalogène p18:1/20:4 augmente avec le traitement par l'ARA comme dans les cellules transfectées avec les siRNA contrôles mais il n'y a plus d'augmentation significative de l'espèce a18:1/20:4. Par contre, des augmentations des taux des espèces plasmalogènes p18:0/20:4 et p16:0/20:4 dépassent le seuil de significativité (Figure 84). En ce qui concerne les espèces contenant du DHA, seule l'espèce plasmalogène p18:0/22:6 voit sa proportion décroître avec le traitement par

l'ARA alors que les espèces a18:0/22:6 et p18:1/22:6 ne sont plus affectées (Figure 84). La somme des espèces contenant du DHA en présence d'ARA n'est plus significativement différente de celle obtenue dans les cellules sans traitement par les AG (Figure 84**Error! Reference source not found.**). Après traitement par le DHA des cellules HT22 transfectées par les siRNA ciblant l'ACSL4, on observe les mêmes modifications des espèces a18:0/22:6, p18:0/22:6, p18;1/22:6, a18:0/20:4 et a18:1/20:4 que dans les cellules HT22 transfectées par les siRNA contrôles (Figure 84). Cependant, on observe une augmentation supplémentaire de la proportion de l'espèce p16:0/22:6 (Figure 84).

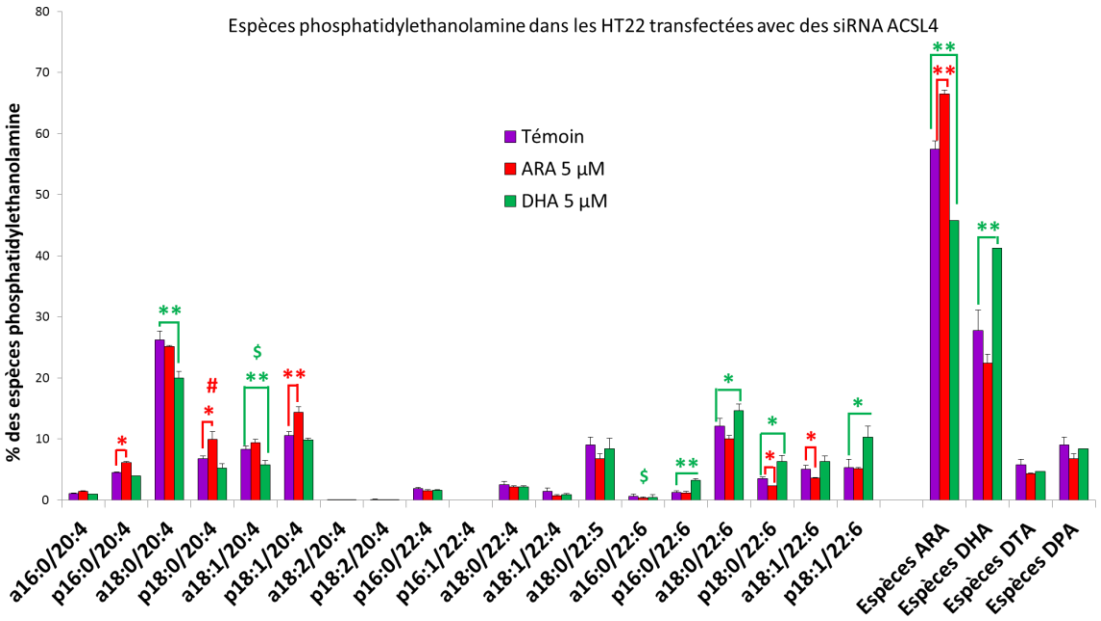


Figure 84 : Répartition des espèces phosphatidylethanolamine contenant les acides arachidonique ou docosahexaénoïque dans les HT22 transfectées avec des siRNA ciblant l'ACSL4 et traitées avec 5 µM d'acides arachidonique ou docosahexaénoïque

Les résultats sont exprimés en % des espèces phosphatidylethanolamine (PE) et en moyenne ± ESM (n=3 puits). Les différents traitements sont représentés par les histogrammes violets pour les HT22 non traitées (témoins), rouges pour les HT22 traitées avec l'acide arachidonique (ARA) et verts pour les HT22 traitées avec l'acide docosahexaénoïque (DHA). * : p<0,05, ** : p<0,01, comparaison des HT22 témoins avec les HT22 traitées avec l'ARA ou le DHA ; # : p<0,05, comparaison sous traitement avec l'ARA entre les HT22 transfectées avec les siRNA contrôles et celles transfectées avec les siRNA ACSL4 ; $: p<0,05, comparaison sous traitement avec le DHA entre les HT22 transfectées avec les siRNA contrôles (Figure 83) et celles transfectées avec les siRNA ACSL4.

Enfin, quand on compare chaque espèce pour le traitement par l'ARA entre les cellules transfectées par les siRNA ciblant ACSL4 et celles transfectées par les siRNA contrôles, on constate une augmentation significative de la proportion de l'espèce

p18:0/20:4 dans les cellules transfectées par les siRNA ACSL4. Pour le traitement par le DHA, on constate une diminution des espèces a18:1/20:4 et a16:0/22:6 dans les cellules transfectées par les siRNA ACSL4 par rapport aux cellules transfectées par les siRNA contrôles (Figure 83 et Figure 84).

Ainsi la diminution de l'expression d'ACSL4 dans les HT22 diminue les phénomènes de compétition entre l'ARA et le DHA pour l'incorporation dans les phospholipides et déplace l'incorporation d'ARA entre des espèces différentes. Ces modifications suggèrent qu'ACSL4 peut avoir un rôle dans les phénomènes d'incorporation et de mobilisation de l'ARA et constitue une cible pour réguler cette mobilisation.

Chapitre 4 : Discussion

En commençant ce travail, nous affrontions trois enjeux principaux :

1- Est-ce que nos régimes induiraient des modifications lipidiques aussi bien dans les tissus périphériques qu'au niveau cérébral ?
2- Est-ce que ces modifications des lipides cérébraux se traduiraient par une altération des capacités cognitives évaluées avec les tests du labyrinthe en Y et de la piscine de Morris, en situation de base (injection ICV d'une solution saline) ainsi qu'après injection d'oligomères de peptide Aβ ? Est-ce que l'administration des régimes « OLE » et « ARA » se traduirait par une sensibilisation ou une résistance à la neurotoxicité de ces oligomères ?
3- Quel(s) pourraient être les mécanismes sous-tendant les modifications des capacités cognitives observées en lien avec la plasticité synaptique ou la neuroinflammation ?

Nous allons discuter ces différents points à partir de nos résultats dans les paragraphes suivants.

I. Modifications lipidiques périphériques et centrales par les régimes « OLE » et « ARA »

A. Positionnement des régimes utilisés dans l'étude par rapport à ceux de la littérature

Dans de nombreux travaux portant sur les lipides chez l'animal, les régimes alimentaires étudiés consistent en une supplémentation lipidique par rapport aux régimes contrôles. C'est notamment le cas des régimes visant à étudier l'effet du DHA ou de l'ARA sur les fonctions physiologiques de l'animal. L'AG étudié est ajouté à la composition du régime contrôle, ce qui modifie également l'apport lipidique global et la répartition entre les classes d'AG (Bhatia *et al.*, 2011; Hajjar *et al.*, 2012). D'autres études font varier les AG saturés pour modifier la proportion d'AGPI ou induisent une déficience en ω-3 ou DHA afin d'étudier l'excès d'ω-6 dans l'alimentation

(Igarashi *et al.*, 2009; Hofacer *et al.*, 2011). Nous avons fait le choix de conserver les apports lipidiques globaux ainsi que les apports en acides saturés dans nos deux régimes « OLE », qui sert de régime contrôle, et « ARA ». De plus les quantités d'ω-3 et de DHA n'ont pas été diminuées afin d'étudier spécifiquement un excès en ω-6 et notamment en ARA et non une déficience en ω-3. Notre régime « ARA » est caractérisé par une légère augmentation du précurseur des ω-6 et surtout une forte augmentation du taux d'ARA. Cette augmentation en ω-6 est compensée par une diminution du taux d'acide oléique dans le régime « ARA » par rapport au régime « OLE ».

Dans ces deux régimes, la proportion de lipides (triglycérides) est légèrement plus élevée que dans les régimes de base, 10% et 25% au lieu de 5% et 15% respectivement en poids pour 100 g et en proportion de l'apport calorique. Ils ne peuvent pas être considérés comme des régimes « *high fat* » pour lesquels les lipides représentent plus de 20% en poids et 60% de l'apport calorique (Guilford *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2014). Ce fait est illustré par les courbes de poids des souris au cours des 12 semaines de régimes ainsi que par les évolutions des triglycéridémies et cholestérolémies. Ainsi Chung *et al.* (2014) ont administré à des souris mâles C57BL/6N de quatre semaines un régime comportant 3% d'huile de soja et 20% de saindoux. La prise de poids de ces souris fut de 21,5 g en 7 semaines contre 14 g pour les souris soumises au régime contrôle (5% d'huile de soja). Les taux plasmatiques de triglycérides et de cholestérol s'élevèrent jusqu'à 1,8 et 2 g/L respectivement. En regard de ces résultats, la prise de poids de nos souris Balb/C mâles âgées de 8 semaines au début des expériences fut inférieure à 6 g pour les deux régimes « ARA » et « OLE » au cours des 10 premières semaines, avant les injections ICV. De plus cette prise de poids et la prise alimentaire ont été identiques pour les deux régimes. La cholestérolémie des souris est restée inférieure à 1,6 g/L sans différence entre les deux groupes ni pour le taux à jeun, ni pour le taux en post prandial, ni pour la diminution entre les conditions post prandial et à jeun. Les triglycéridémies en post prandial et à jeun sont restées inférieures à 1,2 g/L et 0,8 g/L respectivement. La quantité d'ARA

présente dans l'alimentation n'a donc aucune influence sur la clairance et le taux plasmatiques de cholestérol. D'après nos résultats, un apport alimentaire en ARA dans l'alimentation diminuerait le taux de triglycérides plasmatiques, ce qui a également été montré dans la littérature (Ikeda *et al.*, 1996; Wielinga *et al.*, 2012). Cette diminution pourrait également être due au fait que le taux d'acide oléique est plus faible dans la composition du régime « ARA » que dans celle du régime « OLE ». En effet le contenu en triglycérides serait corrélé positivement avec le nombre de doubles liaisons des AG, qui sont plus nombreuses dans l'acide oléique (ω-9) que dans l'ARA (ω-6) (Titov and Lisitsyn, 2006). Cette modification des triglycérides, qu'elle provienne de l'ARA ou de l'acide oléique, n'est que transitoire puisqu'aucune différence de triglycéridémie n'a été observée entre les groupes de souris soumises aux deux régimes après 6h de mise à jeun.

Relativement peu d'études ont porté sur les effets d'une supplémentation ou d'un enrichissement du régime alimentaire en ARA chez le rongeur. Nous avons veillé à ce que la composition du régime « ARA » apporte suffisamment d'ARA durant les 12 semaines d'expérimentation et puisse induire des modifications au niveau des lipides périphériques et centraux sans constituer une situation caricaturale. Notre régime a apporté 1,15 g d'ARA pour 100 g de nourriture soit, pour une prise alimentaire de 3,47 g/j, un apport quotidien d'un peu moins de 40 mg pendant 12 semaines alors que le régime OLE apporte 0,67 mg/j. Cet apport est nettement inférieur à celui de certaines études allant jusqu'à 2 g d'ARA pour 100 g de nourriture pendant 20 semaines (Amtul *et al.*, 2012). Cet apport quotidien est dans l'intervalle de ceux utilisés dans d'autres études entre 30 et 40 mg chez des rats ou des souris (Okaichi *et al.*, 2005; Fukaya *et al.*, 2007; Maekawa *et al.*, 2010; Juman *et al.*, 2013). Des études plus récentes se sont basées sur des apports inférieurs, d'environ 0,2 g d'ARA pour 100 g de nourriture chez la souris (Tokuda *et al.*, 2014; Harauma *et al.*, 2015; Hosono *et al.*, 2015; Tateishi *et al.*, 2015). La pertinence de notre étude sur le plan des apports alimentaires en ARA par rapport à la situation chez l'homme est difficile à établir dans la mesure où nous avons trouvé

peu de données sur les apports alimentaires en ARA chez l'homme dans les pays développés et qu'ils passent inaperçus dans de nombreux aliments. Mann *et al.* (1995) ont indiqué des valeurs se situant entre 0,2 et 1 g par jour dans les régimes américains et australiens mais ont aussi suggéré que ces chiffres sont surestimés, au moins en Australie, et se situeraient vers 0,1-0,15 mg par jour.

B. Les acides gras érythrocytaires et hépatiques

L'analyse de la composition des AG des érythrocytes et du foie a montré une forte concentration en AG saturés, suivie par les AG monoinsaturés et les AGPI de type ω-6. On retrouve peu d'ω-3 au niveau périphérique, le plus présent étant le DHA qui représente moins de 5% des AG totaux dans les érythrocytes et de 10% des AG hépatiques. Cette composition en AG est proche de la répartition des AG montrée dans la littérature chez les rongeurs dans le plasma et le foie (Amusquivar *et al.*, 2000; Igarashi *et al.*, 2009, 2012).

Si l'on compare les AG saturés présents dans les érythrocytes et le foie des souris soumises à nos deux régimes, la proportion d'acide stéarique est plus importante dans le régime « ARA » que dans le régime « OLE » et cette différence est inversée pour l'acide palmitique. Ces variations se compensent, le régime « ARA » n'a donc pas d'influence sur la proportion globale d'AG saturés. Il est donc peu probable que les effets du régime « ARA » sur les profils d'AG soient dus aux variations en AG saturés. La diminution de l'acide oléique, AG monoinsaturé, dans le régime « ARA » par rapport au régime « OLE » est principalement due à la diminution d'acide oléique dans la composition du régime « ARA ». On observe également une faible diminution de l'acide palmitoléique dans le foie et les érythrocytes des souris sous régime « ARA », qui peut être liée à la baisse d'acide palmitique chez ces mêmes souris. En effet une partie de la synthèse d'acide palmitoléique provient de la désaturation de l'acide palmitique par la stearoyl-CoA désaturase 1. Cette enzyme convertit également l'acide stéarique en acide oléique. Il est aussi possible que l'apport en acide oléique dans le régime « OLE » induise une disponibilité plus grande de l'enzyme pour l'acide palmitique dans ce régime

et un peu plus de synthèse d'acide palmitoléique par rapport aux souris nourries avec le régime « ARA ». Cet AG a été associé avec les désordres métaboliques et le risque cardiovasculaire chez l'homme et la souris (Mozaffarian *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011).

En ce qui concerne les AGPI ω-6, la proportion d'ARA a presque doublé dans les érythrocytes et le foie des souris soumises au régime « ARA », ce qui prouve un enrichissement des membranes cellulaires en ARA. Le taux de DTA augmente aussi fortement après le régime « ARA » par rapport au régime « OLE ». Ce phénomène serait dû à l'élongation de l'ARA supplémentaire apporté par ce régime puisque le DTA (C22:4) est un produit d'élongation de l'ARA. En revanche la diminution du précurseur des ω-6, le LA, dans le foie et les érythrocytes des souris après le régime « ARA » par rapport aux souris soumises au régime « OLE » est indépendante de l'apport alimentaire en LA étant donné que le taux de LA dans la composition du régime « ARA » est multiplié par 1,6 par rapport au régime « OLE ». L'ARA semble donc remplacer le LA dans l'incorporation au niveau des lipides. Ce phénomène a déjà été observé dans le foie de rats nouveau nés dont les mères ont été nourries avec un régime enrichi en ARA (Lien *et al.*, 1994) et chez des jeunes rats ayant été nourris avec des doses élevées d'ARA (Mohrhauer and Holman, 1963). Une diminution de LA plasmatique a également été montrée après une administration d'ARA chez l'Homme à l'âge adulte (Seyberth *et al.*, 1975). L'augmentation d'ALA dans le foie des souris soumises au régime « ARA » par rapport aux souris sous régime « OLE » est également indépendante de l'apport alimentaire puisque le taux d'ALA varie peu dans la composition des deux régimes. La compétition existante entre les ω-3 et les ω-6 au niveau de l'activité Δ6-désaturase peut expliquer en première analyse ce résultat (Sprecher *et al.*, 1999). L'excès en LA dans le régime « ARA » limiterait la désaturation de l'ALA que l'on retrouverait à des taux plus fort au niveau du foie. Cette compétition au niveau de cette désaturase serait également à l'origine de la diminution de DHA et EPA dans le foie. Cette diminution de DHA et EPA dans le foie et les érythrocytes des souris du groupe « ARA » peut également être due au fait que l'ARA en excès prend leur place dans les phospholipides des membranes, au moins dans les érythrocytes. Ce

même phénomène de compétition entre les AGPI ω-3 et ω-6 au niveau des AG périphériques a été observé précédemment dans la littérature. Un régime enrichi en ω-3 ou déficient en ω-6 augmente le taux d'ω-3 dans les organes et à l'inverse les ω-6 prennent la place des ω-3 au niveau périphérique lorsqu'ils sont enrichis dans l'alimentation (Lien *et al.*, 1994; Kulakova *et al.*, 1999; Igarashi *et al.*, 2009; Kassem *et al.*, 2012).

C. Les acides gras et phospholipides du système nerveux central

De la même façon qu'au niveau périphérique, les AG saturés, et notamment l'acide palmitique, sont les AG les plus présents dans le cerveau. En revanche le DHA, qui est peu présent dans le foie et les érythrocytes, est l'AG insaturé le plus présent dans le cerveau, représentant environ 19% des AG totaux dans l'hippocampe et le cortex des souris, suivi par l'ARA et l'acide oléique. Les autres AG sont très peu présents dans le cerveau, l'ALA et l'EPA étant même indétectables par GC. Cette répartition est similaire à celle décrite dans la littérature (Tian *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2012).

En terme d'analyse des AG totaux, les variations observées au niveau périphérique sont en partie retrouvées au niveau central mais avec une amplitude plus réduite en général et avec quelques différences marquantes, notamment dans l'hippocampe. Ainsi l'acide oléique diminue de 10% environ dans le cortex et l'hippocampe des souris soumises au régime « ARA », alors que cette diminution est d'un tiers dans les érythrocytes. En revanche, la diminution de LA est de 50% dans l'hippocampe et le cortex ce qui est tout à fait comparable à ce qui a été observé dans les érythrocytes et non dans le foie où elle était beaucoup plus réduite. Les deux AGPI de type ω-6 ARA et DTA sont augmentés dans le cerveau des souris sous régime « ARA » par rapport au régime « OLE », mais seulement de 11% pour l'ARA et de 22-28% pour le DTA dans l'hippocampe et le cortex respectivement, alors que l'ARA et le DTA étaient respectivement doublé et quadruplé dans les érythrocytes et le foie. Enfin, si les taux de DHA ont été diminués de 2 à 3 fois dans les érythrocytes et le

foie, ils sont diminués de 10% dans le cortex et non significativement dans l'hippocampe qui est une zone critique pour la mémoire spatio-temporelle et particulièrement affectée dans la MA. Ceci confirme la forte conservation des AGPI ω-3 et ω-6 et leur faible taux de renouvellement dans le cerveau (Umhau *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2010). En outre, ces résultats suggèrent que le transfert des AG périphériques au cerveau n'est pas uniquement un phénomène de diffusion passive mais que des mécanismes de régulation active, plus ou moins spécifiques de tel ou tel type d'AG, doivent exister. Abbott *et al.* (2012) ont comparé l'influence des apports alimentaires en AGPI, ARA et DHA, sur leurs taux dans les membranes de différents organes périphériques et dans le cerveau chez le rat. Ils ont montré que si la composition en ces AGPI des organes reflète celle du régime quand le ratio ω-6/ω-3 est supérieur à 10, le régime alimentaire a peu d'influence quand ce ratio est inférieur à 10. Nos régimes « OLE » et « ARA » présentent des ratios ω-6/ω-3 de 2 et 5 respectivement. Nous avons analysé les espèces phospholipidiques contenant de l'ARA ou du DHA pour étudier si nous pouvions détecter des phénomènes de compétition entre le DHA et l'ARA dans les cerveaux des souris soumises aux deux régimes « OLE » et « ARA ».

Grâce à ces analyses en LCMSMS, nous avons pu observer dans l'hippocampe et le cortex des souris que l'ARA était particulièrement présent dans la classe des PI, ce qui a déjà été observé (Novak *et al.*, 2008). L'espèce PI majoritaire est l'espèce 18:0/20:4. L'ARA est également très présent dans les espèces PC. Les deux classes de phospholipides PI et PC n'ont pas été modifiées par le régime « ARA » par rapport au régime « OLE ». Comme décrit dans la littérature, le DHA se trouve majoritairement dans les espèces PS et PE (Novak *et al.*, 2008), et notamment dans les espèces PS et PE 18:0/22:6. Les espèces PS ω-6 sont toutes augmentées dans le cortex (et une seule espèce dans l'hippocampe, PS 18:0/22:4) des souris soumises au régime « ARA » par rapport au régime « OLE » tandis que l'espèce PS ω-3 est diminuée. Le même phénomène est observé dans les espèces PE : certaines espèces PE ω-6 sont augmentées dans le cerveau des souris après le régime « ARA » tandis que les

espèces PE ω-3 diminuent. La compétition entre les ω-6 et les ω-3 observée dans l'analyse globale des AG membranaires est donc retrouvée plus précisément dans les espèces PS et PE. Il a été montré dans la littérature qu'un régime enrichi en ω-3 donné à des rates gestantes induisait chez les nouveaux nés une augmentation du DHA dans les PE et PS des cellules gliales (Destaillats *et al.*, 2010). Ainsi les perturbations d'AGPI dans le cerveau induites par une variation entre les ω-6 et les ω-3 dans l'alimentation toucheraient spécifiquement les classes PE et PS et non les deux autres classes de phospholipides. Pour la classe des PE dans l'hippocampe, nous avons observé une augmentation de quatre espèces acyl (a18:1/20:4 ; a16:0/20:4 ; a18:0/22:4 ; a18:0/22:5) et la diminution de l'espèce a18:0/22:6 chez les souris soumises au régime « ARA » par rapport à celles nourries avec le régime « OLE ». Si on observe les espèces PE variant à la fois dans l'hippocampe et le cortex, on retrouve dans les deux structures une augmentation des espèces a18:1/20:4 et a18:0/22:4 au détriment de l'espèce a18:0/22:6. Nous n'avons pas observé de modifications des espèces plasmalogènes. Ces résultats confirment la compétition entre le DHA et l'ARA au niveau de leur incorporation dans les phospholipides, et notamment dans les PE.

D. Rôle de l'acyl-CoA synthétase 4 dans l'incorporation du DHA et de l'ARA dans les phospholipides neuronaux

D'après la littérature, les acyl-CoA synthétases jouent un rôle important dans l'activation des AG et donc dans leur incorporation dans les membranes. Les enzymes responsables de l'activation de l'ARA et du DHA, respectivement l'ACSL4 et l'ACSL6, peuvent être à l'origine des déséquilibres ω-6/ω-3 retrouvés au niveau du cerveau et ayant pour origine un déséquilibre dans l'alimentation. L'ACSL4 ayant montré une préférence plus marquée pour l'ARA (Kang *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2000), nous avons choisi d'étudier plus spécifiquement son rôle dans la mobilisation des AGPI dans une lignée de neuroblastome que nous avons différenciée. Nous avons retrouvé des variations des espèces PE dans les HT22 avec une supplémentation en ARA ou en DHA. En revanche les espèces PS ne varient pas, et les espèces PC sont modifiées en présence de DHA et d'ARA. De la même façon que dans l'hippocampe et le cortex

des souris, un traitement en ARA enrichit des espèces contenant de l'ARA et diminue des espèces contenant du DHA pour la classe PE. Le phénomène est inversé en présence de DHA pour les classes PE et PC. Une sous-expression de 60% de l'ACSL4 diminue les phénomènes de compétition entre l'ARA et le DHA pour l'incorporation dans certaines espèces de phospholipides et déplace l'incorporation d'ARA entre des espèces différentes de PE. En revanche, ces espèces sont différentes des espèces observées *in vivo* et comportent aussi bien des espèces plasmalogènes (p18:0/20:4, p18:1/20:4) qu'acyl (a18:0/20:4). Dans un modèle de fibroblastes, les cellules COS, il a été montré que les différentes isoformes d'ACSL4, et non l'ACSL1, augmentent préférentiellement le taux de PI synthétisées en présence d'AG exogènes (Küch *et al.*, 2014). Ces modifications suggèrent qu'ACSL4 peut avoir un rôle dans les phénomènes d'incorporation et de mobilisation des AGPI et notamment de l'ARA. En revanche, bien que l'expression d'ACSL4 augmente avec la différenciation des HT22, contrairement à celle d'ACSL6, l'inhibition de son expression par des siRNA, ne modifie pas le nombre et la longueur des neurites. Une confirmation du rôle d'ACSL4 relativement à d'autres ACSL dans l'incorporation neuronale d'ARA par rapport à celle du DHA nécessiterait d'autres expériences *in vitro* en modifiant l'expression exogène et endogène de ces protéines ainsi que l'utilisation de souris où l'expression si possible neuronale-spécifique d'ACLS4 serait invalidée. Ce dernier modèle n'est pas disponible actuellement.

En résumé de cette première série de résultats d'analyses lipidiques, nous avons confirmé qu'un régime représentant un apport modéré en ARA pendant 12 semaines modifie profondément la composition en AG en périphérie, de façon plus modérée au niveau du cortex et de l'hippocampe et s'accompagne d'une compétition de l'ARA et du DHA pour l'incorporation dans les phospholipides membranaires cérébraux.

II. Acide arachidonique et altérations des fonctions mnésiques

Le modèle que nous avons utilisé, basé sur une injection ICV unique de 500 pmoles d'oligomères de peptide Aβ, se traduit par une diminution des capacités mnésiques à court terme évalué par le test du labyrinthe en Y, de l'apprentissage et de

la mémoire à long terme évalués par le test de la piscine de Morris (Youssef et al., 2008). En ce qui concerne la mémoire à court terme et le test du labyrinthe en Y, nous avons observé avec le régime « OLE » une chute du pourcentage d'alternance de 70% à 55% quand les souris ont reçu une injection d'oligomères de peptide Aβ par rapport à celles qui ont reçu une injection de solution saline. Ces chiffres rejoignent ceux de l'étude antérieurement menée (Desbène *et al.*, 2012) sur la même lignée Balb/C selon le même protocole expérimental à l'exception du régime alimentaire qui était un régime standard avec 5% de lipides et peu d'AGPI ω-3 ou ω-6 (Figure 31). Le pourcentage moyen d'alternance que nous avons mesuré en condition contrôle (injection saline) est légèrement supérieur à celui observé dans cette étude antérieure (70% contre 65%). Après l'injection saline, les souris nourries avec le régime « ARA » présentent une altération de la mémoire à court terme équivalente à l'altération induite par le peptide Aβ après le régime « OLE ». L'injection d'oligomères de peptide Aβ ne provoque pas une chute supplémentaire du pourcentage d'alternance mais la valeur obtenue de 55% est déjà proche de l'aléatoire et il est possible que ce test ne permette pas de mettre en évidence une dégradation supplémentaire. L'autre possibilité, qui est équivalente, est que la mémoire à court terme de ces souris nourries avec le régime « ARA » est déjà trop dégradée pour que le peptide Aβ ne puisse amplifier la dégradation. En ce qui concerne la mémoire à long terme et l'apprentissage, nous n'avons pas constaté d'altération de ces capacités avec le régime ARA par rapport au régime « OLE » dans les conditions basales (injection saline). Les souris nourries avec le régime « OLE » ont une diminution des capacités d'apprentissage et présentent un temps de latence plus long pour atteindre le quadrant cible après injection d'oligomères de peptide Aβ. Mais ces souris conservent des capacités d'apprentissage même après cette injection délétère, ce qui est comparable à ce qui avait été observé dans l'étude antérieure (Desbène *et al.*, 2012). En revanche, les souris nourries avec le régime « ARA » présentent des capacités d'apprentissage quasi nulles et un temps de latence encore augmenté après injection ICV d'oligomères de peptide Aβ. Ceci traduit une sensibilisation de ces souris, ayant reçu le régime « ARA » pendant 10 semaines avant l'injection, aux effets délétères du peptide Aβ pour les capacités cognitives.

Discussion

Cette influence d'un régime alimentaire apportant des quantités modérées d'ARA sur une durée relativement courte sur la mémoire à court ou à long terme n'a guère été rapportée antérieurement dans la littérature. Okaichi *et al.* (2005) ont montré un effet favorable d'une supplémentation en ARA dans le test de la piscine de Morris en condition de base mais ils ont utilisé des rats âgés de 79 semaines. Ce résultat est à mettre en rapport avec l'étude de McGahon *et al.* (1997) qui a montré une modification de la LTP avec un régime enrichi en ARA et LA chez des rats âgés qui présentaient une diminution des taux d'ARA cérébraux. Wainwright *et al.* (1997) n'ont observé aucune modification des capacités d'apprentissage et de mémoire à long terme chez des souriceaux dont les mères avaient été nourries avec trois régimes présentant respectivement un ratio ω-6/ω-3 de 0,32 (bas), 4 (moyen) et 49 (élevé). Une étude récente a mis en évidence qu'une administration orale d'ARA induisait une altération des fonctions cognitives liées à la coordination motrice chez la souris (Harauma *et al.*, 2015), ce que nous n'avons pas retrouvé dans notre étude. Mais l'effet néfaste d'un régime enrichi en ARA sur la mémoire à court terme n'a pas été décrit dans la littérature jusqu'à présent. En ce qui concerne les relations entre un apport d'ARA et le rôle du peptide Aβ, quelques rares études ont rapporté une augmentation de la production et des dépôts de ce peptide dans des souris modèles transgéniques de la MA (Amtul *et al.*, 2011, 2012) bien que des résultats inverses aient été récemment rapportés dans des souris Tg2776 âgées de 17 mois (Hosono *et al.*, 2015). Mais aucune étude n'a été consacrée à la sensibilisation aux effets des oligomères de peptide Aβ sur les capacités cognitives qui sont spécifiquement évaluées par le modèle d'injection ICV que nous avons utilisé.

Nous avons donc répondu au deuxième enjeu de notre travail sur le retentissement d'un régime alimentaire enrichi en ARA et de la modification de la composition en AGPI des structures cérébrales sur les capacités mnésiques. Nous allons ci-dessous discuter de ce qui peut être dit à partir de nos résultats sur les mécanismes cellulaires et biochimiques sous tendant les altérations observées.

III. Acide arachidonique, neuroinflammation et fonction synaptique

A. Acide arachidonique et neuroinflammation

Dans notre synthèse bibliographique, nous avons vu que certaines études avaient indiqué que l'augmentation de précurseurs ω-6 ou d'ARA lui-même dans l'alimentation pouvait se traduire par une augmentation de production des dérivés pro-inflammatoires de l'ARA. D'autres études ont infirmé cette hypothèse et cette question est fortement débattue actuellement dans les mondes de la lipidologie, de la nutrition et de la santé publique. Nous avons donc recherché si notre régime « ARA » induisait une inflammation périphérique et/ou cérébrale. La mesure des taux de CRP dans le plasma des souris n'a pas mis en évidence d'état inflammatoire chronique. Cependant nous ne pouvons exclure l'existence d'un état subinflammatoire à bas bruit qui ne pourrait être détecté que par une mesure des cytokines pro-inflammatoires et de leurs transcripts en RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) quantitative.

Alors que les souris nourries avec le régime « OLE » ne présentent pas de prolifération gliale après injection ICV d'oligomères de peptide Aβ, conformément à ce qui avait été trouvé antérieurement pour les souris Balb/C nourries avec un régime standard (Desbène *et al.*, 2012), nous avons observé une augmentation de 40% de l'expression de la GFAP dans l'hippocampe des souris nourries avec le régime « ARA » après injection du peptide Aβ. L'administration du régime ARA induirait donc une sensibilisation aux effets pro-inflammatoires de ce peptide neurotoxique. Il n'est pas exclu que la neuroinflammation participe aux altérations des capacités mnésiques à long terme que nous avons observées. Ainsi, la neuroinflammation diminue les capacités cognitives des souris modèles PDAPP avant la formation de dépôt amyloïde (Beauquis *et al.*, 2014). Des expériences complémentaires, notamment l'examen du statut des cellules microgliales, seraient nécessaires pour compléter cette analyse de la neuroinflammation et de son rôle dans l'influence de l'ARA.

B. Acide arachidonique et fonction synaptique

Dans les études antérieures du laboratoire ayant utilisé le modèle d'injection ICV d'oligomères de peptide Aβ (Youssef *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2010; Desbène *et al.*, 2012), des diminutions importantes de l'expression des marqueurs synaptiques PSD95 et SNAP25 ont été observées dans l'hippocampe, après injection de ce peptide et soumission des souris aux tests cognitifs incluant celui de la piscine de Morris et ont été reliées à une baisse de la synaptogenèse. Dans cette étude nous n'avons pas observé ces diminutions, quelque soit le régime apporté aux souris, malgré l'utilisation de deux techniques de mesure différentes, Western blot et ELISA, et que ce soit dans des préparations de neurosynaptosomes ou sur les homogénats cellulaires. Nous avons cependant observé une diminution d'expression de la protéine postsynaptique PSD95 dans le cortex des souris soumises au régime « ARA ». Une étude a montré une diminution de ce marqueur postsynaptique dans un modèle d'inflammation associée à l'ARA et induite par des lipopolysaccharides (Kellom *et al.*, 2012). Cette altération de PSD95 pourrait donc être due à l'inflammation induite par le régime « ARA ». Il faut noter que les régimes « OLE » et « ARA » contiennent plus de précurseur ALA que les régimes standards utilisés dans les études antérieurs. Ces apports sont bien supérieurs aux apports minimum connus pour les rongeurs. Les taux globaux de DHA dans l'hippocampe n'ont pas été abaissés par les deux régimes utilisés. Dans les érythrocytes, le taux de DHA est plus élevé avec le régime « OLE » qu'avec le régime standard. Il est possible que ces apports en ALA et la production consécutive de DHA ait protégé en partie la synaptogenèse sans supprimer les altérations des capacités cognitives. Par ailleurs les deux régimes contiennent aussi plus d'acide oléique que le régime standard habituellement donné aux souris. L'analyse des érythrocytes des souris avant l'étude, donc nourries avec le régime standard, montre que le taux d'acide oléique avec le régime standard est inférieur au taux d'acide oléique après 12 semaines de régimes « OLE » ou « ARA ». Lors du développement cérébral chez le rat, un apport en acide oléique augmente l'expression de PSD95 et induit la formation de synapses (Polo-Hernández *et al.*, 2014). L'augmentation d'acide

oléique dans la composition des deux régimes « OLE » et « ARA », et surtout dans le régime « OLE », par rapport au régime standard habituellement utilisé au laboratoire pourrait donc expliquer le fait que nous n'avons pas trouvé d'altération des marqueurs synaptiques dans l'hippocampe après l'injection des oligomères du peptide Aβ.

Après l'injection de peptide Aβ, une forte altération des quatre sous-unités du AMPA-R (GLUR1 à 4) a été observée dans les homogénats d'hippocampe des souris sous régime « ARA ». Une altération des sous-unités GLUR2 et 4, moins marquée, est également observée avec le régime « ARA » lorsque les souris sont injectées avec la solution saline. Dans le cortex, seule la sous-unité GLUR2 est altérée par le régime « ARA ». La MA est associée à une altération du trafic intracellulaire et à la signalisation des AMPA-R (Keifer and Zheng, 2010). Certaines études ont établi une relation entre ces modifications et l'ARA ou l'activité de la $cPLA_2$. Ainsi Sanchez-Mejia *et al.* (2008) décrivirent une augmentation de l'expression de GLUR1 à la surface de cultures primaires de neurones exposées au peptide Aβ. Cette augmentation a été supprimée par le prétraitement avec un inhibiteur de la $cPLA_2$ et induite par l'administration d'ARA exogène. Miller *et al.* (2014) ont plus récemment décrit un effet inverse : le peptide Aβ induirait l'internalisation de GluR1 en activant l'activité phosphatase de la calcineurine qui cible la sérine 845 de GluR1 en présence de la protéine tau. En ce qui concerne GLUR2, l'activation de la $cPLA_2$ entraine son internalisation dans les cellules de Purkinje (Mashimo *et al.*, 2008). Peu d'articles ont décrit un effet du peptide Aβ sur l'expression des AMPA-R, en termes de taux d'ARN ou de protéine. Aucune étude n'a rapporté un lien entre l'ARA, la $cPLA_2$ et l'expression de ces récepteurs et nos résultats sont donc originaux en ce sens. L'expression neuronale des AMPA-R GLUR1 et GLUR2 est associée à l'arborisation dendritique, à la fonction synaptique et aux capacités cognitives bien que celles-ci puissent être conservées en grosse partie malgré une réduction importante de l'expression des AMPA-R (Yoon *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2015; Schroeter *et al.*, 2015). Les niveaux d'expression des AMPA-R peuvent être régulés à plusieurs niveaux. Quelques études ont décrit l'implication de certaines espèces de micro-ARN (Letellier *et al.*, 2014; Hu *et*

al., 2015; Olde Loohuis *et al.*, 2015) et d'autres ont établi l'importance des phénomènes d'ubiquinylation dans la régulation de la dégradation des protéines AMPA et leur destinée intraneuronale (Lin *et al.*, 2011; Lussier *et al.*, 2011; Huo *et al.*, 2015; Widagdo *et al.*, 2015). En l'absence de données sur le mécanisme d'action d'ARA ou de ses dérivés sur l'expression de ces récepteurs, des travaux supplémentaires seront nécessaires pour élucider ces mécanismes potentiels.

L'ampleur des diminutions d'expression des AMPA-R que nous avons observées dans l'hippocampe des souris nourries avec le régime « ARA » et le rôle de ces récepteurs dans la fonction synaptique nous amènent à penser qu'elles sont à la source de l'essentiel des altérations cognitives que nous avons par ailleurs mesurées.

C. Action(s) de l'acide arachidonique : implication du cycle de Lands ?

Nous avons vu dans notre synthèse bibliographique que l'acide arachidonique libéré des phospholipides membranaires intervenait dans la fonction synaptique en tant que messager rétrograde. Par ailleurs, après sa libération, l'acide arachidonique peut être converti en de nombreux eicosanoïdes qui sont impliqués dans les fonctions neuronales et la neuroinflammation. Nous savons par les travaux antérieurs du laboratoire et d'autres équipes que la $cPLA_2$ est activée par les oligomères de peptides Aβ dans les cultures primaires neuronales aussi bien qu'*in vivo* (Kriem *et al.*, 2005; Sanchez-Mejia *et al.*, 2008; Desbène *et al.*, 2012). Les acyl-CoA synthétases, activant l'ARA en arachidonoyl-CoA, favoriseraient sa réincorporation et diminueraient les taux intracellulaires d'ARA non estérifié. Puisque l'ARA est un substrat préférentiel de l'ACLS4, nous avons examiné l'expression de cette enzyme dans les cortex et hippocampes des souris nourries avec les régimes « ARA » et « OLE » après injection ICV de solution saline ou d'oligomères de peptide Aβ. Nous avons observé une diminution de l'expression de la forme neuronale d'ACSL4 dans les hippocampes des souris nourries avec le régime « ARA » sans modification de l'expression de la forme ubiquitaire. ACLS4 présente en effet une isoforme d'expression spécifiquement neuronale contenant 41 acides aminés N-terminaux en plus par rapport à l'isoforme ubiquitaire (Cho, 2012). Il semble donc que les oligomères de peptide Aβ induiraient dans les

neurones une diminution de l'expression d'ACSL4 en plus d'une activation de la $cPLA_2$, ce qui conduirait à une inhibition du cycle de Lands et une augmentation des taux intracellulaires d'ARA non estérifié dans le contexte d'un régime alimentaire riche en ARA.

En revanche l'expression d'ACSL4 n'est pas modifiée après administration du régime « ARA » et une injection ICV d'une solution saline. On peut donc supposer que le régime « ARA » ne diminue pas par lui-même l'expression d'ACSL4 et les possibilités d'incorporation d'ARA dans les phospholipides neuronaux. Ceci est cohérent avec l'observation que l'administration d'ARA ne diminue pas l'expression d'ACSL4 dans les cellules HT22 et l'augmente même légèrement. La régulation de l'expression du gène ACSL4 est mal connue surtout dans les cellules cérébrales. De façon intéressante, l'implication du facteur de transcription PPARβ/δ a été décrite dans une publication récente (Kan *et al.*, 2015). Ce facteur comme les autres membres de la famille PPAR peut être activé par les AG, y compris l'ARA et certains de ses dérivés (Shureiqi *et al.*, 2003; Zuo *et al.*, 2006; Mochizuki *et al.*, 2008). La détermination du rôle d'ACSL4 dans la mobilisation de l'ARA et la réponse aux oligomères de peptide Aβ bénéficierait d'expériences où son expression *in vivo* pourrait être modifiée. En l'absence de disponibilité d'une lignée murine transgénique offrant cette possibilité, nous avons tenté de diminuer l'expression d'ACSL4 *in vivo* avec des siRNA modifiés de type Accell (Dharmacon™). Malheureusement, les essais préliminaires n'ont pas mis en évidence de modification de l'expression d'ACSL4.

Conclusion et perspectives

L'augmentation de l'espérance de vie au cours des 50 dernières années a fait apparaitre des pathologies liées au vieillissement, comme la MA qui constitue désormais un des problèmes majeurs de santé publique au niveau mondial. Une grande partie de la recherche médicale est consacrée à l'étude de cette pathologie neurodégénérative et à l'élaboration de stratégies préventives ou thérapeutiques pour faire reculer son développement. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la MA très complexes entrent en jeu, progressent et provoquent silencieusement des dysfonctionnements et destructions dans le cerveau bien avant que le diagnostic puisse être établi. Les fonctions cérébrales sont déjà très altérées lors de l'apparition des symptômes et leur évolution varie d'un individu à l'autre. C'est probablement une des raisons pour lesquelles les essais thérapeutiques avec des molécules nouvelles ont échoué jusqu'à maintenant. On ne sait pas ce qui, chez un individu à un certain âge, va amener une suraccumulation intraneuronale puis intracérébrale de peptide Aβ, une hyperphosphorylation de la protéine tau et les autres dysfonctionnements neuronaux et synaptiques qui ont été observés dans les très nombreux travaux consacrés à cette maladie depuis plus de vingt ans. On ne connait pas le ou les évènements initiateurs qui amènent aux premières dysrégulations de la signalisation intraneuronale qui elles-mêmes aboutissent dans les étapes finales aux signes histologiques pathognomoniques de la MA qui sont les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. Connaître ces évènements initiaux permettrait de mieux cerner les facteurs de risque modifiables et de retarder ou prévenir cette évolution.

Parmi les facteurs de risque modifiables proposés pour la MA, plusieurs études ont montré une implication des AGPI. Ces travaux ont été centrés sur les AGPI de type ω-3 et notamment le DHA, AG quantitativement majeur dans le cerveau et mineur dans les apports alimentaires. Mais leur bénéfice sous forme d'une supplémentation n'a pas été prouvé chez les patients atteints par la MA bien que des effets positifs aient été observés chez les individus dans la phase prodromale. L'une des explications de la

contradiction existant entre les résultats expérimentaux sur les modèles animaux largement en faveur d'effets neuroprotecteurs et cet échec des essais chez l'homme est qu'il n'est pas possible de considérer le rôle d'un AG isolé sans prendre en compte le fait qu'il est apporté dans un bol alimentaire au milieu des autres AG, en particulier les AGPI ω-6. L'alimentation humaine, notamment dans les pays occidentaux, est caractérisée par un taux d'AGPI de type ω-6 largement plus élevé que le taux d'ω-3. Dans le cerveau, l'ARA est l'AGPI de type ω-6 le plus abondant et intervient dans la plasticité synaptique et la neuroinflammation. Il est libéré des membranes par la $cPLA_2$, enzyme activée dans la MA. Alors même qu'il constitue avec ses précurseurs une partie croissante du bol alimentaire occidental, qu'avec ses précurseurs il peut entrer en compétition non seulement au niveau des désaturases mais aussi des protéines et enzymes assurant le transport des AG dans l'organisme et leur incorporation dans les triglycérides et phospholipides, qu'il agit à plusieurs niveaux dans le cerveau, et que son implication dans la réponse aux oligomères de peptide Aβ a été démontrée, il n'y pas eu d'études sur son influence en tant que nutriment sur le processus de la MA. Des apports alimentaires en excès d'ARA sur une longue durée pourraient induire un état inflammatoire chronique, déséquilibrer la composition des membranes neuronales, suractiver des cascades de signalisation et favoriser la survenue et l'évolution d'une MA.

C'est pourquoi nous avons entrepris cette étude focalisée sur l'influence d'apports alimentaires en ARA sur l'incorporation de ce même AGPI dans les phospholipides membranaires et sur la sensibilité au peptide Aβ. Nous avons visé quatre objectifs dans ce travail combinant une étude sur modèle animal et une étude sur modèle cellulaire pour préciser le rôle d'enzymes régulant la mobilité intraneuronale de l'ARA. Ces objectifs ont été atteints en utilisant à la fois des évaluations comportementales et des analyses lipidiques et protéiques *in vitro* et *in vivo*.

- Le premier objectif consistait à déterminer si une supplémentation en ARA dans l'alimentation pouvait se traduire par une incorporation supplémentaire de cet AGPI dans les phospholipides membranaires et à préciser la nature de ces

phospholipides. Nous avons pu montrer par les analyses des AG qu'une supplémentation en ARA dans l'alimentation induisait un enrichissement des membranes en ARA au niveau périphérique, et aussi au niveau des membranes du cortex et de l'hippocampe mais avec une ampleur réduite. Un apport exogène en ARA sur le modèle cellulaire HT22 a également entrainé une augmentation de l'ARA dans les phospholipides membranaires. Les espèces touchées par cet enrichissement des membranes sont principalement les espèces PE, mais aussi les espèces PS pour le modèle animal et les espèces PC pour le modèle *in vitro*.

- Le deuxième objectif était de déterminer si cet apport alimentaire et cette incorporation supplémentaire en ARA pouvaient se traduire par une sensibilisation aux effets des oligomères de peptide Aβ en terme de capacités mnésiques à court et long terme et des marqueurs biochimiques liés à la fonction synaptique et à la neuroinflammation. Les études comportementales ont montré qu'un apport alimentaire en ARA affectait la mémoire à court terme même en absence du peptide Aβ et qu'il sensibilisait les souris aux effets du peptide Aβ au niveau de l'apprentissage. Les analyses biochimiques ont montré qu'un apport en ARA diminuait l'expression de la protéine postsynaptique PSD95 et des sous-unités GLUR2 et GLUR4 du AMPA-R et sensibilisait toutes les sous-unités du AMPA-R au peptide Aβ. Enfin nous avons mis en évidence une prolifération astrocytaire, marqueur de la neuroinflammation, due à l'enrichissement du cerveau en ARA.
- Le troisième objectif, cette fois considéré comme un objectif secondaire, consistait à évaluer le rôle de l'ACSL4 dans les phénomènes d'incorporation et de renouvellement de l'ARA dans les phospholipides cérébraux. La sous expression d'ACSL4 a montré que cette enzyme jouait un rôle dans la mobilisation des AGPI et notamment de l'ARA. Cependant, au regard des faibles variations observées dans les espèces phospholipidiques, d'autres expériences seraient nécessaires pour confirmer l'hypothèse selon laquelle l'ACSL4 pourrait contrebalancer l'effet négatif de la $cPLA_2$ dans la réponse aux oligomères du peptide Aβ et préciser son rôle par rapport à d'autres enzymes pouvant utiliser

l'ARA comme substrat et moduler sa mobilisation à partir de et vers les phospholipides neuronaux, *in vitro* et *in vivo*.

1- Enfin, le dernier objectif secondaire était d'évaluer les phénomènes de compétition éventuelle entre l'ARA, les AG ω-6 résultant de son élongation et le DHA pour l'incorporation dans les phospholipides cérébraux, et identifier les espèces impliquées. Nous avons pu observer une compétition entre les ω-6 à longue chaine, ARA et DPA, et le DHA au niveau des espèces phospholipidiques PS et PE du cerveau. Notre travail constitue en ce sens une base de réflexion pour ce qui peut survenir chez l'homme. Les conséquences en termes de recommandations nutritionnelles éventuelles nécessitent évidemment des travaux complémentaires que nous évoquons ci-dessous.

Le rôle d'ACSL4 dans l'incorporation de l'ARA et sa compétition avec le DHA au niveau des phospholipides membranaires pourrait être affiné par une surexpression de l'ACSL4 dans les HT22. L'ACSL4 n'étant pas la seule enzyme responsable de la mobilisation de l'ARA au niveau des membranes neuronales, il serait judicieux d'étudier le rôle de la $cPLA_2$, de la LPCAT3 et de la LPIAT1 ainsi que d'autres acyl-CoA synthétases comme l'ACSL6 dans la compétition ARA/DHA au niveau membranaire et dans la sensibilité au peptide Aβ en utilisant d'abord des modèles cellulaires comme la lignée HT22 où l'expression d'ACSL4 ainsi que des enzymes citées ci-dessus serait modifiée. Les résultats obtenus permettraient de choisir les meilleurs candidats cibles pour élaborer des modèles murins où l'expression de ces enzymes serait diminuée, de préférence de façon neuronale spécifique. Ceci peut être réalisé avec les techniques d'invalidation inductible ou à l'aide de siRNA stabilisés et ciblant des types cellulaires spécifiques.

Un enrichissement en ARA dans l'alimentation de nos souris s'est traduit par des perturbations des espèces phospholipidiques cérébrales contenant du DHA, notamment des PE. Ces perturbations sont en partie médiées par l'ACSL4 et s'associent à des diminutions d'expression de protéines jouant un rôle clé dans la transmission synaptique

et la mémoire, une prolifération gliale ainsi qu'une sensibilité accrue au peptide Aβ. Ceci signifie qu'un excès en ARA dans l'alimentation pourrait être un facteur d'aggravation des effets du peptide Aβ produit dans le cerveau, alors même que les apports en ω-3 sont élevés. La notion de rapport ω-6/ω-3 pourrait avoir une importance limitée dans la mesure où nos résultats ont été obtenus avec des ratios inférieurs aux recommandations existantes et qu'il faut prendre en compte les autres AG, saturés ou monoinsaturés, comme l'acide oléique dont nous avons vu qu'il pourrait être à la source de certains de nos résultats. Enfin et surtout, les individus peuvent ne pas être égaux devant les effets du contenu en AG de leur régime alimentaire. Les niveaux d'activités des enzymes régulant le transport et l'incorporation des AG en périphérie et au niveau du cerveau pourraient fortement influencer les conséquences à long terme du régime alimentaire. Pour apporter des réponses à ces questions, il serait nécessaire tout d'abord de mener des études plus minutieuses sur l'évaluation quantitative des apports non seulement en AGPI ω-3 mais aussi en ARA et ses précurseurs dans les régimes alimentaires actuels de nos pays, dont nous avons évoqué les insuffisances dans notre discussion. Il serait également nécessaire de construire les outils nécessaires à la détermination du polymorphisme génétique des populations vis-à-vis de ces enzymes afin de parvenir à déterminer des groupes à risque pouvant bénéficier de recommandations nutritionnelles spécifiques.

Pour conclure, une accumulation de peptide Aβ au niveau de la synapse, que l'on observe dans la MA, active la $cPLA_2$ et induit par conséquent une libération de l'ARA à partir des phospholipides membranaires. Cet ARA libéré peut induire une modification de l'expression des AMPA-R par des mécanisme encore inconnus. Ainsi une accumulation d'ARA due à une supplémentation alimentaire en ARA combinée, au peptide Aβ diminue l'expression des différentes sous-unités de l'AMPA-R et notamment de GLUR2. La réponse des AMPA-R au glutamate est alors inhibée, compromettant la plasticité synaptique. Cette altération synaptique induite par l'ARA pourrait être à l'origine des dysfonctionnements de la mémoire dans la MA (Figure 85).

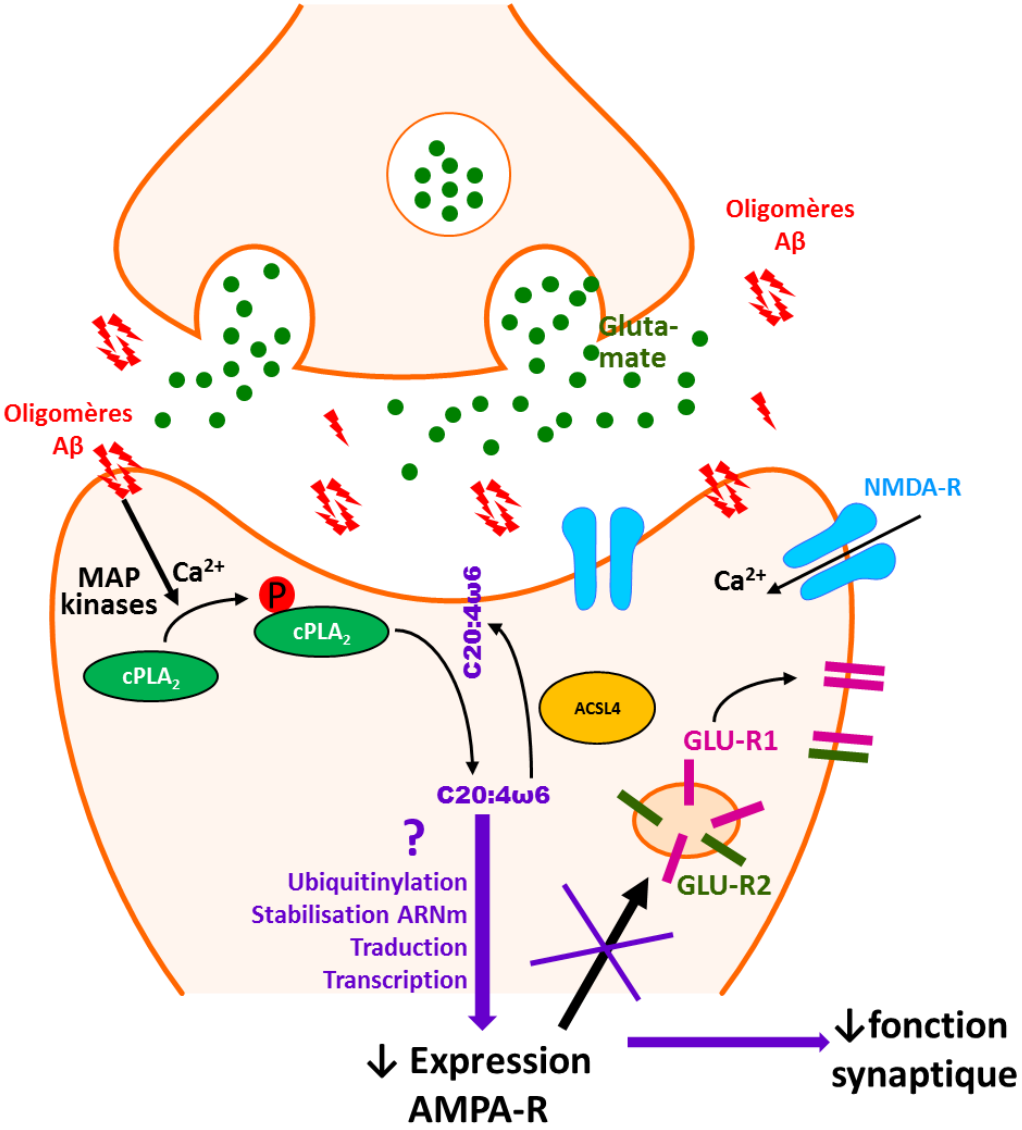


Figure 85 : L'ARA est impliqué dans l'altération synaptique induite par les oligomères du peptide β-amyloïde

Aβ : peptide β-amyloïde ; ACSL4 : acyl-CoA synthétase 4 ; AMPA-R : récepteurs α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic au glutamate ; C20:4ω6 : acide arachidonique ; GLU-R : sous-unités des AMPA-R ; MAP kinase : Mitogen-Activated Protein Kinases ; NMDA-R : récepteur N-methyl-D-aspartate au glutamate.

Références bibliographiques

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat. Rev. Neurosci. *7*, 41–53.

Abbott, S. K., Else, P. L., Atkins, T. A., and Hulbert, A. J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: importance of diet polyunsaturated fat balance. Biochim. Biophys. Acta *1818*, 1309–1317.

Abete, I., Astrup, A., Martínez, J. A., Thorsdottir, I., and Zulet, M. A. (2010). Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance. Nutr. Rev. *68*, 214–231.

Abraham, W. C., and Bear, M. F. (1996). Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. Trends Neurosci. *19*, 126–130.

Abraham, W. C., Mason-Parker, S. E., Bear, M. F., Webb, S., and Tate, W. P. (2001). Heterosynaptic metaplasticity in the hippocampus in vivo: a BCM-like modifiable threshold for LTP. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 10924–10929.

Aevarsson, O., and Skoog, I. (2000). A longitudinal population study of the mini-mental state examination in the very old: relation to dementia and education. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. *11*, 166–175.

Ahmad, R., Goffin, K., Van den Stock, J., De Winter, F.-L., Cleeren, E., Bormans, G., Tournoy, J., Persoons, P., Van Laere, K., and Vandenbulcke, M. (2014). In vivo type 1 cannabinoid receptor availability in Alzheimer's disease. Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol. *24*, 242–250.

Ahn, K., McKinney, M. K., and Cravatt, B. F. (2008). Enzymatic Pathways That Regulate Endocannabinoid Signaling in the Nervous System. Chem. Rev. *108*, 1687–1707.

Aïd, S., and Bosetti, F. (2011). Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. Biochimie *93*, 46–51.

Ailhaud, G., Massiera, F., Weill, P., Legrand, P., Alessandri, J.-M., and Guesnet, P. (2006). Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. Prog. Lipid Res. *45*, 203–236.

Akaneya, Y. (2008). The Remarkable Mechanism of Prostaglandin E2 on Synaptic Plasticity. Gene Regul. Syst. Biol. *1*, 83–89.

Akitake, Y., Nakatani, Y., Kamei, D., Hosokawa, M., Akatsu, H., Uematsu, S., Akira, S., Kudo, I., Hara, S., and Takahashi, M. (2013). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in alzheimer's disease and its deletion mitigates alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. J. Neurosci. Res. *91*, 909–919.

Allinquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C., and Prochiantz, A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. J. Cell Biol. *128*, 919–927.

Allinson, T. M. J., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. J. Neurosci. Res. *74*, 342–352.

Amtul, Z., Uhrig, M., Rozmahel, R. F., and Beyreuther, K. (2011). Structural insight into the differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on the production of Abeta peptides and amyloid plaques. J. Biol. Chem. *286*, 6100–6107.

Amtul, Z., Uhrig, M., Wang, L., Rozmahel, R. F., and Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease: structural insight. Neurobiol. Aging *33*, 831.e21–e31.

Amusquivar, E., Rupérez, F. J., Barbas, C., and Herrera, E. (2000). Low arachidonic acid rather than alpha-tocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. J. Nutr. *130*, 2855–2865.

Andrade da Costa, B. L. da S., Kang, K. D., Rittenhouse, K. D., and Osborne, N. N. (2009). The localization of PGE2 receptor subtypes in rat retinal cultures and the neuroprotective effect of the EP2 agonist butaprost. Neurochem. Int. *55*, 199–207.

Andreasson, K. (2010). Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *91*, 104–112.

Angelova, P. R., and Müller, W. S. (2009). Arachidonic acid potently inhibits both postsynaptic-type Kv4.2 and presynaptic-type Kv1.4 IA potassium channels. Eur. J. Neurosci. *29*, 1943–1950.

Anggono, V., and Huganir, R. L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. Curr. Opin. Neurobiol. *22*, 461–469.

Anoop, A., Singh, P. K., Jacob, R. S., and Maji, S. K. (2010). CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. Int. J. Alzheimers Dis. *2010*.

Aparoy, P., Reddy, R. N., Guruprasad, L., Reddy, M. R., and Reddanna, P. (2008). Homology modeling of 5-lipoxygenase and hints for better inhibitor design. J. Comput. Aided Mol. Des. *22*, 611–619.

Apelt, J., Ach, K., and Schliebs, R. (2003). 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. *339*, 183–186.

Arbuckle, L. D., MacKinnon, M. J., and Innis, S. M. (1994). Formula 18:2(n-6) and 18:3(n-3) content and ratio influence long-chain polyunsaturated fatty acids in the developing piglet liver and central nervous system. J. Nutr. *124*, 289–298.

Arendt, T., Holzer, M., Fruth, R., Brückner, M. K., and Gärtner, U. (1998). Phosphorylation of tau, Abeta-formation, and apoptosis after in vivo inhibition of PP-1 and PP-2A. Neurobiol. Aging *19*, 3–13.

Asahi, M., Hoshimaru, M., Hojo, M., Matsuura, N., Kikuchi, H., and Hashimoto, N. (1998). Induction of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in the immortalized neuronal progenitor cell line HC2S2 during differentiation into neurons. J. Neurosci. Res. *52*, 699–708.

Aso, E., and Ferrer, I. (2014). Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. Front. Pharmacol. *5*, 37.

Bader, M.-F., and Vitale, N. (2009). Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. Biochim. Biophys. Acta *1791*, 936–941.

Bahr, B. A., Karanian, D. A., Makanji, S. S., and Makriyannis, A. (2006). Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. Expert Opin. Investig. Drugs *15*, 351–365.

Bailey, C. H., and Chen, M. (1983). Morphological basis of long-term habituation and sensitization in Aplysia. Science *220*, 91–93.

Bailey, C. H., and Chen, M. (1988a). Long-term memory in Aplysia modulates the total number of varicosities of single identified sensory neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 2373–2377.

Bailey, C. H., and Chen, M. (1988b). Long-term sensitization in Aplysia increases the number of presynaptic contacts onto the identified gill motor neuron L7. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 9356–9359.

Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. Lancet Lond. Engl. *377*, 1019–1031.

Barger, S. W., and Mattson, M. P. (1996). Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor. Brain Res. Mol. Brain Res. *40*, 116–126.

Bauer, C. S., Woolley, R. J., Teschemacher, A. G., and Seward, E. P. (2007). Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13-1. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 212–219.

Bazan, N. G., Packard, M. G., Teather, L., and Allan, G. (1997). Bioactive lipids in excitatory neurotransmission and neuronal plasticity. Neurochem. Int. *30*, 225–231.

Beauquis, J., Vinuesa, A., Pomilio, C., Pavía, P., Galván, V., and Saravia, F. (2014). Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease. Hippocampus *24*, 257–269.

Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D., and Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. J. Geriatr. Psychiatry Neurol. *23*, 213–227.

Beltz, B. S., Tlusty, M. F., Benton, J. L., and Sandeman, D. C. (2007). Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. Neurosci. Lett. *415*, 154–158.

Bensinger, S. J., and Tontonoz, P. (2008). Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. Nature *454*, 470–477.

Bentzer, P., Mattiasson, G., McIntosh, T. K., Wieloch, T., and Grande, P. O. (2001). Infusion of prostacyclin following experimental brain injury in the rat reduces cortical lesion volume. J. Neurotrauma *18*, 275–285.

Bentzer, P., Venturoli, D., Carlsson, O., and Grände, P.-O. (2003). Low-dose prostacyclin improves cortical perfusion following experimental brain injury in the rat. J. Neurotrauma *20*, 447–461.

Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B. J., Mayshar, Y., Yan, H., and Gu, C. (2014). Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. Nature *509*, 507–511.

Berrios, G. E. (1987). Dementia during the seventeenth and eighteenth centuries: a conceptual history. Psychol. Med. *17*, 829–837.

Betsholtz, C. (2014). Physiology: Double function at the blood-brain barrier. Nature *509*, 432–433.

Bézard, J., Blond, J. P., Bernard, A., and Clouet, P. (1994). The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. Reprod. Nutr. Dev. *34*, 539–568.

Bhatia, H. S., Agrawal, R., Sharma, S., Huo, Y.-X., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2011). Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. PloS One *6*, e28451.

Billingsley, M. L., and Kincaid, R. L. (1997). Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. Biochem. J. *323 (Pt 3)*, 577–591.

Birch, E. E., Castañeda, Y. S., Wheaton, D. H., Birch, D. G., Uauy, R. D., and Hoffman, D. R. (2005). Visual maturation of term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented or control formula for 12 mo. Am. J. Clin. Nutr. *81*, 871–879.

Birks, J., and Harvey, R. J. (2006). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. Cochrane Database Syst. Rev., CD001190.

Blanchard, H., Pédrono, F., Boulier-Monthéan, N., Catheline, D., Rioux, V., and Legrand, P. (2013). Comparative effects of well-balanced diets enriched in α-linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *88*, 383–389.

Blankman, J. L., Simon, G. M., and Cravatt, B. F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Chem. Biol. *14*, 1347–1356.

Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F., and Rawlings, R. R. (2011). Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. Am. J. Clin. Nutr. *93*, 950–962.

Blennow, K., de Leon, M. J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. Lancet Lond. Engl. *368*, 387–403.

Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. *37*, 911–917.

Bliss, T. V. P., Collingridge, G. L., and Morris, R. G. M. (2014). Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *369*, 20130129.

Block, M. L., Zecca, L., and Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 57–69.

Bois, T. M. du, Bell, W., Deng, C., and Huang, X.-F. (2005). A high n-6 polyunsaturated fatty acid diet reduces muscarinic M2/M4 receptor binding in the rat brain. J. Chem. Neuroanat. *29*, 282–288.

Bolshakov, V. Y., and Siegelbaum, S. A. (1995). Hippocampal long-term depression: arachidonic acid as a potential retrograde messenger. Neuropharmacology *34*, 1581–1587.

Bordji, K., Becerril-Ortega, J., Nicole, O., and Buisson, A. (2010). Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ß production. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 15927–15942.

Bosetti, F. (2007). Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models. J. Neurochem. *102*, 577–586.

Boundless (2015). Synaptic Plasticity. Boundless.

Bourne, J. N., and Harris, K. M. (2011). Coordination of size and number of excitatory and inhibitory synapses results in a balanced structural plasticity along mature hippocampal CA1 dendrites during LTP. Hippocampus *21*, 354–373.

Bourre, J. M., Bonneil, M., Clément, M., Dumont, O., Durand, G., Lafont, H., Nalbone, G., and Piciotti, M. (1993). Function of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *48*, 5–15.

Bourre, J. M., Piciotti, M., Dumont, O., Pascal, G., and Durand, G. (1990). Dietary linoleic acid and polyunsaturated fatty acids in rat brain and other organs. Minimal requirements of linoleic acid. Lipids *25*, 465–472.

Braak, H., and Braak, E. (1995). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neurobiol. Aging *16*, 271–278; discussion 278–284.

Braak, H., and Braak, E. (1997). Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories. Neurobiol. Aging *18*, 351–357.

Brash, A. R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. J. Clin. Invest. *107*, 1339–1345.

Brightman, M. W., and Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J. Cell Biol. *40*, 648–677.

Brown, A. M., Tummolo, D. M., Rhodes, K. J., Hofmann, J. R., Jacobsen, J. S., and Sonnenberg-Reines, J. (1997). Selective aggregation of endogenous beta-amyloid peptide and soluble amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid by zinc. J. Neurochem. *69*, 1204–1212.

Brown, W. J., Chambers, K., and Doody, A. (2003). Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. Traffic Cph. Den. *4*, 214–221.

Buggia-Prevot, V., Sevalle, J., Rossner, S., and Checler, F. (2008). NFkappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by Abeta42. J. Biol. Chem. *283*, 10037–10047.

Burri, L., Hoem, N., Banni, S., and Berge, K. (2012). Marine omega-3 phospholipids: metabolism and biological activities. Int. J. Mol. Sci. *13*, 15401–15419.

Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., and Black, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. J. Biol. Chem. *273*, 27765–27767.

Cabral, G. A., and Dove Pettit, D. A. (1998). Drugs and immunity: cannabinoids and their role in decreased resistance to infectious disease. J. Neuroimmunol. *83*, 116–123.

Cabral, G. A., and Griffin-Thomas, L. (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. Expert Rev. Mol. Med. *11*, e3.

Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., and Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 3934–3942.

Caggiano, A. O., and Kraig, R. P. (1998). Prostaglandin E2 and 4-aminopyridine prevent the lipopolysaccharide-induced outwardly rectifying potassium current and interleukin-1beta production in cultured rat microglia. J. Neurochem. *70*, 2357–2368.

Cansev, M., and Wurtman, R. J. (2007). Chronic administration of docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid, but not arachidonic acid, alone or in combination with uridine, increases brain phosphatide and synaptic protein levels in gerbils. Neuroscience *148*, 421–431.

Cao, Y., Murphy, K. J., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M. (2000). Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. FEBS Lett. *467*, 263–267.

Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. J. Biol. Chem. *275*, 30849–30854.

Carrier, E. J., Kearn, C. S., Barkmeier, A. J., Breese, N. M., Yang, W., Nithipatikom, K., Pfister, S. L., Campbell, W. B., and Hillard, C. J. (2004). Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. Mol. Pharmacol. *65*, 999–1007.

Castleden, J. A. (1969). Phospholipid cell-membrane models. J. Pharm. Sci. *58*, 149–165.

Cederholm, T., Salem, N., and Palmblad, J. (2013). ω-3 fatty acids in the prevention of cognitive decline in humans. Adv. Nutr. Bethesda Md *4*, 672–676.

Chabowski, A., Górski, J., Luiken, J. J. F. P., Glatz, J. F. C., and Bonen, A. (2007). Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *77*, 345–353.

Chalon, S. (2006). Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *75*, 259–269.

Cha, M.-Y., Han, S.-H., Son, S. M., Hong, H.-S., Choi, Y.-J., Byun, J., and Mook-Jung, I. (2012). Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. PloS One *7*, e34929.

Chandrasekharan, N. V., and Simmons, D. L. (2004). The cyclooxygenases. Genome Biol. *5*, 241.

Chatfield, M., Matthews, F. E., Brayne, C., and Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (2007). Using the Mini-Mental State Examination for tracking cognition in the older population based on longitudinal data. J. Am. Geriatr. Soc. *55*, 1066–1071.

Chen, R., Zhang, J., Fan, N., Teng, Z.-Q., Wu, Y., Yang, H., Tang, Y.-P., Sun, H., Song, Y., and Chen, C. (2013a). Δ9-THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling. Cell *155*, 1154–1165.

Chen, S., Ge, X., Chen, Y., Lv, N., Liu, Z., and Yuan, W. (2013b). Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research. Drug Des. Devel. Ther. *7*, 117–125.

Chen, X. *et al.* (2006). Haplotypes spanning SPEC2, PDZ-GEF2 and ACSL6 genes are associated with schizophrenia. Hum. Mol. Genet. *15*, 3329–3342.

Chen, Y.-C., Wu, J.-S., Tsai, H.-D., Huang, C.-Y., Chen, J.-J., Sun, G. Y., and Lin, T.-N. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) and neurodegenerative disorders. Mol. Neurobiol. *46*, 114–124.

Chew, E. Y., Clemons, T. E., Agrón, E., Launer, L. J., Grodstein, F., Bernstein, P. S., and Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research Group (2015). Effect of Omega-3 Fatty Acids, Lutein/Zeaxanthin, or Other Nutrient Supplementation on Cognitive Function: The AREDS2 Randomized Clinical Trial. JAMA *314*, 791–801.

Choi, J. H., Choi, A. Y., Yoon, H., Choe, W., Yoon, K.-S., Ha, J., Yeo, E.-J., and Kang, I. (2010). Baicalein protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through inhibition of reactive oxygen species production and CHOP induction. Exp. Mol. Med. *42*, 811–822.

Choi, S.-H., Aid, S., Caracciolo, L., Minami, S. S., Niikura, T., Matsuoka, Y., Turner, R. S., Mattson, M. P., and Bosetti, F. (2013). Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. J. Neurochem. *124*, 59–68.

Chong, Y. H., and Ng, T. K. (1991). Effects of palm oil on cardiovascular risk. Med. J. Malaysia *46*, 41–50.

Chopra, B., Giblett, S., Little, J. G., Donaldson, L. F., Tate, S., Evans, R. J., and Grubb, B. D. (2000). Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. Eur. J. Neurosci. *12*, 911–920.

Cho, Y.-Y. (2012). A novel role of brain-type ACS4 isotype in neuronal differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *419*, 505–510.

Cho, Y. Y., Kang, M. J., Ogawa, S., Yamashita, Y., Fujino, T., and Yamamoto, T. T. (2000). Regulation by adrenocorticotropic hormone and arachidonate of the expression of acyl-CoA synthetase 4, an arachidonate-preferring enzyme expressed in steroidogenic tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. *274*, 741–745.

Chu, J., and Praticò, D. (2011). 5-lipoxygenase as an endogenous modulator of amyloid β formation in vivo. Ann. Neurol. *69*, 34–46.

Chung, S. I., Kim, T. H., Rico, C. W., and Kang, M. Y. (2014). Effect of instant cooked giant embryonic rice on body fat weight and plasma lipid profile in high fat-fed mice. Nutrients *6*, 2266–2278.

Clark, A. M., Sousa, K. M., Chisolm, C. N., MacDougald, O. A., and Kennedy, R. T. (2010). REVERSIBLY-SEALED MULTILAYER MICROFLUIDIC DEVICE FOR INTEGRATED CELL PERFUSION AND ON-LINE CHEMICAL ANALYSIS OF CULTURED ADIPOCYTE SECRETIONS. Anal. Bioanal. Chem. *397*, 2939–2947.

Clements, M. P., Bliss, T. V., and Lynch, M. A. (1991). Increase in arachidonic acid concentration in a postsynaptic membrane fraction following the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus. Neuroscience *45*, 379–389.

Colangelo, V., Schurr, J., Ball, M. J., Pelaez, R. P., Bazan, N. G., and Lukiw, W. J. (2002). Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. J. Neurosci. Res. *70*, 462–473.

Colciaghi, F., Borroni, B., Pastorino, L., Marcello, E., Zimmermann, M., Cattabeni, F., Padovani, A., and Di Luca, M. (2002). [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. Mol. Med. Camb. Mass *8*, 67–74.

Coleman, R. A., and Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. Prog. Lipid Res. *43*, 134–176.

Colton, C. A., and Wilcock, D. M. (2010). Assessing activation states in microglia. CNS Neurol. Disord. Drug Targets *9*, 174–191.

Combrinck, M., Williams, J., De Berardinis, M. A., Warden, D., Puopolo, M., Smith, A. D., and Minghetti, L. (2006). Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *77*, 85–88.

Combs, C. K., Johnson, D. E., Karlo, J. C., Cannady, S. B., and Landreth, G. E. (2000). Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 558–567.

Connell, E., Darios, F., Broersen, K., Gatsby, N., Peak-Chew, S.-Y., Rickman, C., and Davletov, B. (2007). Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc18. EMBO Rep. *8*, 414–419.

Cooke, M., Orlando, U., Maloberti, P., Podestá, E. J., and Cornejo Maciel, F. (2011). Tyrosine phosphatase SHP2 regulates the expression of acyl-CoA synthetase ACSL4. J. Lipid Res. *52*, 1936–1948.

Cordain, L., Eaton, S. B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B. A., O'Keefe, J. H., and Brand-Miller, J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. Am. J. Clin. Nutr. *81*, 341–354.

Cordain, L., Watkins, B. A., Florant, G. L., Kelher, M., Rogers, L., and Li, Y. (2002). Fatty acid analysis of wild ruminant tissues: evolutionary implications for reducing diet-related chronic disease. Eur. J. Clin. Nutr. *56*, 181–191.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science *261*, 921–923.

Cornejo Maciel, F., Maloberti, P., Neuman, I., Cano, F., Castilla, R., Castillo, F., Paz, C., and Podestá, E. J. (2005). An arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase is a hormone-dependent and obligatory protein in the signal transduction pathway of steroidogenic hormones. J. Mol. Endocrinol. *34*, 655–666.

Coti Bertrand, P., O'Kusky, J. R., and Innis, S. M. (2006). Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. J. Nutr. *136*, 1570–1575.

Cotman, C. W., and Head, E. (2008). The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. J. Alzheimers Dis. JAD *15*, 685–707.

Cupp, D., Kampf, J. P., and Kleinfeld, A. M. (2004). Fatty acid-albumin complexes and the determination of the transport of long chain free fatty acids across membranes. Biochemistry (Mosc.) *43*, 4473–4481.

Van Dam, D., and De Deyn, P. P. (2011). Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. Br. J. Pharmacol. *164*, 1285–1300.

Dangour, A. D., Andreeva, V. A., Sydenham, E., and Uauy, R. (2012). Omega 3 fatty acids and cognitive health in older people. Br. J. Nutr. *107 Suppl 2*, S152–S158.

Darios, F., and Davletov, B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. Nature *440*, 813–817.

Davis, R. J., Murdoch, C. E., Ali, M., Purbrick, S., Ravid, R., Baxter, G. S., Tilford, N., Sheldrick, R. L. G., Clark, K. L., and Coleman, R. A. (2004). EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. Br. J. Pharmacol. *141*, 580–585.

Davletov, B. A., Meunier, F. A., Ashton, A. C., Matsushita, H., Hirst, W. D., Lelianova, V. G., Wilkin, G. P., Dolly, J. O., and Ushkaryov, Y. A. (1998). Vesicle exocytosis stimulated by alpha-latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca2+. EMBO J. *17*, 3909–3920.

Desbène, C. *et al.* (2012). Critical role of cPLA2 in Aβ oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit. Neurobiol. Aging *33*, 1123.e17–e29.

Destaillats, F. *et al.* (2010). Differential effect of maternal diet supplementation with alpha-Linolenic adcid or n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on glial cell phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine fatty acid profile in neonate rat brains. Nutr. Metab. *7*, 2.

Dhopeshwarkar, G. A., and Mead, J. F. (1973). Uptake and transport of fatty acids into the brain and the role of the blood-brain barrier system. Adv. Lipid Res. *11*, 109–142.

Dinamarca, M. C., Ríos, J. A., and Inestrosa, N. C. (2012). Postsynaptic Receptors for Amyloid-β Oligomers as Mediators of Neuronal Damage in Alzheimer's Disease. Front. Physiol. *3*, 464.

Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 10819–10824.

Dobolyi, A., Vincze, C., Pál, G., and Lovas, G. (2012). The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. Int. J. Mol. Sci. *13*, 8219–8258.

Doege, H., and Stahl, A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. Physiol. Bethesda Md *21*, 259–268.

Dogné, J.-M., Hanson, J., and Pratico, D. (2005). Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis. Trends Pharmacol. Sci. *26*, 639–644.

Drewnowski, A. (2000). Nutrition transition and global dietary trends. Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif *16*, 486–487.

Dudek, S. M., and Bear, M. F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 4363–4367.

Du, Q., Martin, J.-C., Agnani, G., Pages, N., Leruyet, P., Carayon, P., and Delplanque, B. (2012). Dairy fat blends high in α-linolenic acid are superior to n-3 fatty-acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brains of young rats. J. Nutr. Biochem. *23*, 1573–1582.

Ebert, U., and Kirch, W. (1998). Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. Eur. J. Clin. Invest. *28*, 944–949.

Eilander, A., Hundscheid, D. C., Osendarp, S. J., Transler, C., and Zock, P. L. (2007). Effects of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on visual and cognitive development throughout childhood: a review of human studies. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *76*, 189–203.

Emken, E. A. (1994). Metabolism of dietary stearic acid relative to other fatty acids in human subjects. Am. J. Clin. Nutr. *60*, 1023S – 1028S.

Erta, M., Quintana, A., and Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. Int. J. Biol. Sci. *8*, 1254–1266.

Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. Science *248*, 1122–1124.

Esposito, G., De Filippis, D., Steardo, L., Scuderi, C., Savani, C., Cuomo, V., and Iuvone, T. (2006). CB1 receptor selective activation inhibits beta-amyloid-induced iNOS protein expression in C6 cells and subsequently blunts tau protein hyperphosphorylation in co-cultured neurons. Neurosci. Lett. *404*, 342–346.

Eto, M., Shindou, H., Koeberle, A., Harayama, T., Yanagida, K., and Shimizu, T. (2012). Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 is the key enzyme for incorporating arachidonic acid into glycerophospholipids during adipocyte differentiation. Int. J. Mol. Sci. *13*, 16267–16280.

Eto, M., Shindou, H., and Shimizu, T. (2014). A novel lysophosphatidic acid acyltransferase enzyme (LPAAT4) with a possible role for incorporating docosahexaenoic acid into brain glycerophospholipids. Biochem. Biophys. Res. Commun. *443*, 718–724.

Farooqui, A. A., Horrocks, L. A., and Farooqui, T. (2000). Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. J. Mol. Neurosci. MN *14*, 123–135.

Firuzi, O., Zhuo, J., Chinnici, C. M., Wisniewski, T., and Praticò, D. (2008). 5-Lipoxygenase gene disruption reduces amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *22*, 1169–1178.

Fish, J. E., Jameson, L. S., Albright, A., and Norman, P. S. (1984). Modulation of the bronchomotor effects of chemical mediators by prostaglandin F2 alpha in asthmatic subjects. Am. Rev. Respir. Dis. *130*, 571–574.

Flamand, N., Mancuso, P., Serezani, C. H. C., and Brock, T. G. (2007). Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *64*, 2657–2670.

Flatt, J. P. (1995). Use and storage of carbohydrate and fat. Am. J. Clin. Nutr. *61*, 952S – 959S.

Fleck, M. W., Barrionuevo, G., and Palmer, A. M. (2001). Synaptosomal and vesicular accumulation of L-glutamate, L-aspartate and D-aspartate. Neurochem. Int. *39*, 217–225.

Fleith, M., and Clandinin, M. T. (2005). Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. *45*, 205–229.

Flicker, C., Bartus, R. T., Crook, T. H., and Ferris, S. H. (1984). Effects of aging and dementia upon recent visuospatial memory. Neurobiol. Aging *5*, 275–283.

Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. *226*, 497–509.

Foster, M., Sherrington, C. S., and University College, L. L. S. (1897). A textbook of physiology. With C.S. Sherrington. Part 3. The central nervous system [electronic resource], London : Macmillan.

Francis, H., and Stevenson, R. (2013). The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. Appetite *63*, 119–128.

Freeman, E. J., Terrian, D. M., and Dorman, R. V. (1990). Presynaptic facilitation of glutamate release from isolated hippocampal mossy fiber nerve endings by arachidonic acid. Neurochem. Res. *15*, 743–750.

Fujiwara, T., Mishima, T., Kofuji, T., Chiba, T., Tanaka, K., Yamamoto, A., and Akagawa, K. (2006). Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 5767–5776.

Fukaya, T., Gondaira, T., Kashiyae, Y., Kotani, S., Ishikura, Y., Fujikawa, S., Kiso, Y., and Sakakibara, M. (2007). Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. Neurobiol. Aging *28*, 1179–1186.

Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science *294*, 1871–1875.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., and Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. Nature *373*, 523–527.

García-Bueno, B., Serrats, J., and Sawchenko, P. E. (2009). Cerebrovascular cyclooxygenase-1 expression, regulation, and role in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by inflammatory stimuli. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 12970–12981.

Garcia, P. *et al.* (2010). Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 7516–7527.

Gauthier, S., Loft, H., and Cummings, J. (2008). Improvement in behavioural symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis. Int. J. Geriatr. Psychiatry *23*, 537–545.

Gerdeman, G. L., and Lovinger, D. M. (2003). Emerging roles for endocannabinoids in long-term synaptic plasticity. Br. J. Pharmacol. *140*, 781–789.

Ghosh, S., Wu, M. D., Shaftel, S. S., Kyrkanides, S., LaFerla, F. M., Olschowka, J. A., and O'Banion, M. K. (2013). Sustained Interleukin-1β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 5053–5064.

Gibson, R. A., Muhlhausler, B., and Makrides, M. (2011). Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. Matern. Child. Nutr. *7 Suppl 2*, 17–26.

Giles, H., and Leff, P. (1988). The biology and pharmacology of PGD2. Prostaglandins *35*, 277–300.

Girardet, C. *et al.* (2011). Central Inflammation and Sickness-Like Behavior Induced by the Food Contaminant Deoxynivalenol: A PGE2-Independent Mechanism. Toxicol. Sci. *124*, 179–191.

Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., and Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. Physiol. Rev. *90*, 367–417.

Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. *120*, 885–890.

Glenn, M. J., Nesbitt, C., and Mumby, D. G. (2003). Perirhinal cortex lesions produce variable patterns of retrograde amnesia in rats. Behav. Brain Res. *141*, 183–193.

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature *349*, 704–706.

Gong, C. X., Lidsky, T., Wegiel, J., Zuck, L., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2000). 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. *275*, 5535–5544.

Götz, J., Schild, A., Hoerndli, F., and Pennanen, L. (2004a). Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci. *22*, 453–465.

Götz, J., Streffer, J. R., David, D., Schild, A., Hoerndli, F., Pennanen, L., Kurosinski, P., and Chen, F. (2004b). Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. Mol. Psychiatry *9*, 664–683.

Grande, P. O., Möller, A. D., Nordström, C. H., and Ungerstedt, U. (2000). Low-dose prostacyclin in treatment of severe brain trauma evaluated with microdialysis and jugular bulb oxygen measurements. Acta Anaesthesiol. Scand. *44*, 886–894.

Gray, J. A., and McNaughton, N. (1983). Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. Neurosci. Biobehav. Rev. *7*, 119–188.

Green, J. T., Liu, Z., and Bazinet, R. P. (2010). Brain phospholipid arachidonic acid half-lives are not altered following 15 weeks of N-3 polyunsaturated fatty acid adequate or deprived diet. J. Lipid Res. *51*, 535–543.

Green, R. C., Schneider, L. S., Amato, D. A., Beelen, A. P., Wilcock, G., Swabb, E. A., Zavitz, K. H., and Tarenflurbil Phase 3 Study Group (2009). Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. JAMA *302*, 2557–2564.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 4913–4917.

Guerreiro, R., Besson, A. A., Bellenger, J., Ragot, K., Lizard, G., Faivre, B., and Sorci, G. (2012). Correlational Selection on Pro- and Anti-Inflammatory Effectors. Evolution *66*, 3615–3623.

Guilford, B. L., Ryals, J. M., and Wright, D. E. (2011). Phenotypic changes in diabetic neuropathy induced by a high-fat diet in diabetic C57BL/6 mice. Exp. Diabetes Res. *2011*, 848307.

Gu, Z., Cheng, J., Zhong, P., Qin, L., Liu, W., and Yan, Z. (2014). Aβ selectively impairs mGluR7 modulation of NMDA signaling in basal forebrain cholinergic neurons: implication in Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 13614–13628.

Haas, L. T., Kostylev, M. A., and Strittmatter, S. M. (2014). Therapeutic molecules and endogenous ligands regulate the interaction between brain cellular prion protein (PrPC) and metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). J. Biol. Chem. *289*, 28460–28477.

Haeggström, J. Z., and Funk, C. D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. Chem. Rev. *111*, 5866–5898.

Haga, S., Akai, K., and Ishii, T. (1989). Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. An immunohistochemical study using a novel monoclonal antibody. Acta Neuropathol. (Berl.) *77*, 569–575.

Hajjar, T., Goh, Y. M., Rajion, M. A., Vidyadaran, S., Li, T. A., and Ebrahimi, M. (2013). Alterations in neuronal morphology and synaptophysin expression in the rat brain as a result of changes in dietary n-6: n-3 fatty acid ratios. Lipids Health Dis. *12*, 113.

Hajjar, T., Meng, G. Y., Rajion, M. A., Vidyadaran, S., Othman, F., Farjam, A. S., Li, T. A., and Ebrahimi, M. (2012). Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPARα and PPARγ) gene expression in rats. BMC Neurosci. *13*, 109.

Hambrecht, G. S., Adesuyi, S. A., Holt, S., and Ellis, E. F. (1987). Brain 12-HETE formation in different species, brain regions, and in brain microvessels. Neurochem. Res. *12*, 1029–1033.

Hamilton, A., Esseltine, J. L., DeVries, R. A., Cregan, S. P., and Ferguson, S. S. G. (2014). Metabotropic glutamate receptor 5 knockout reduces cognitive impairment and pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. Mol. Brain *7*, 40.

Hamilton, A., Zamponi, G. W., and Ferguson, S. S. G. (2015). Glutamate receptors function as scaffolds for the regulation of β-amyloid and cellular prion protein signaling complexes. Mol. Brain *8*, 18.

Hamilton, J. A. (2007). New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *77*, 355–361.

Hammarberg, T., Kuprin, S., Rådmark, O., and Holmgren, A. (2001). EPR investigation of the active site of recombinant human 5-lipoxygenase: inhibition by selenide. Biochemistry (Mosc.) *40*, 6371–6378.

Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat. Neurosci. *10*, 1387–1394.

Hansen, A. E., and Burr, G. O. (1946). Essential fatty acids and human nutrition. J. Am. Med. Assoc. *132*, 855–859.

Hao, C.-M., and Breyer, M. D. (2007). Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. Kidney Int. *71*, 1105–1115.

Harauma, A., Tomita, M., Muto, D., and Moriguchi, T. (2015). Effect of long-term administration of arachidonic acid on n-3 fatty acid deficient mice. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *95*, 41–45.

Hardy, J., Bogdanovic, N., Winblad, B., Portelius, E., Andreasen, N., Cedazo-Minguez, A., and Zetterberg, H. (2014). Pathways to Alzheimer's disease. J. Intern. Med. *275*, 296–303.

Harkany, T., O'Mahony, S., Kelly, J. P., Soós, K., Törõ, I., Penke, B., Luiten, P. G., Nyakas, C., Gulya, K., and Leonard, B. E. (1998). Beta-amyloid(Phe(SO3H)24)25-35 in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. Behav. Brain Res. *90*, 133–145.

Harmon, C. M., and Abumrad, N. A. (1993). Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. J. Membr. Biol. *133*, 43–49.

Harris, K. M., and Kater, S. B. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. Annu. Rev. Neurosci. *17*, 341–371.

Harris, K. M., and Weinberg, R. J. (2012). Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*.

Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., and Phipps, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. *23*, 144–150.

Harry, G. J., and Kraft, A. D. (2012). Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. Neurotoxicology *33*, 191–206.

Harvey, B. S., Ohlsson, K. S., Mååg, J. L. V., Musgrave, I. F., and Smid, S. D. (2012). Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid-β evoked neurotoxicity in vitro. Neurotoxicology *33*, 138–146.

Hashidate-Yoshida, T. *et al.* (2015). Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. eLife *4*.

Hawkins, B. T., and Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. Pharmacol. Rev. *57*, 173–185.

Hawkins, R. D., Kandel, E. R., and Bailey, C. H. (2006). Molecular mechanisms of memory storage in Aplysia. Biol. Bull. *210*, 174–191.

Heird, W. C., and Lapillonne, A. (2005). The role of essential fatty acids in development. Annu. Rev. Nutr. *25*, 549–571.

He, M., Liu, J., Cheng, S., Xing, Y., and Suo, W. Z. (2013). Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. Neural Regen. Res. *8*, 1297–1306.

Henley, J. M., Barker, E. A., and Glebov, O. O. (2011). Routes, destinations and delays: recent advances in AMPA receptor trafficking. Trends Neurosci. *34*, 258–268.

Henley, J. M., and Wilkinson, K. A. (2013). AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. Dialogues Clin. Neurosci. *15*, 11–27.

Hewett, S. J., Bell, S. C., and Hewett, J. A. (2006). Contributions of cyclooxygenase-2 to neuroplasticity and neuropathology of the central nervous system. Pharmacol. Ther. *112*, 335–357.

Hirata, T., and Narumiya, S. (2011). Prostanoid receptors. Chem. Rev. *111*, 6209–6230.

Hishikawa, D., Shindou, H., Kobayashi, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2008). Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 2830–2835.

Hofacer, R., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Magrisso, I. J., Benoit, S. C., and McNamara, R. K. (2011). Omega-3 fatty acid deficiency selectively up-regulates delta6-desaturase expression and activity indices in rat liver: prevention by normalization of omega-3 fatty acid status. Nutr. Res. N. Y. N *31*, 715–722.

Hoozemans, J. J., Rozemuller, A. J., Janssen, I., De Groot, C. J., Veerhuis, R., and Eikelenboom, P. (2001). Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. Acta Neuropathol. (Berl.) *101*, 2–8.

Hosono, T., Nishitsuji, K., Nakamura, T., Jung, C.-G., Kontani, M., Tokuda, H., Kawashima, H., Kiso, Y., Suzuki, T., and Michikawa, M. (2015). Arachidonic acid diet attenuates brain Aβ deposition in Tg2576 mice. Brain Res. *1613*, 92–99.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science *274*, 99–102.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. Neuron *52*, 831–843.

Hsu, T. M., and Kanoski, S. E. (2014). Blood-brain barrier disruption: mechanistic links between Western diet consumption and dementia. Front. Aging Neurosci. *6*, 88.

Huff, F. J., Becker, J. T., Belle, S. H., Nebes, R. D., Holland, A. L., and Boller, F. (1987). Cognitive deficits and clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Neurology *37*, 1119–1124.

Hu, N.-W., Nicoll, A. J., Zhang, D., Mably, A. J., O'Malley, T., Purro, S. A., Terry, C., Collinge, J., Walsh, D. M., and Rowan, M. J. (2014). mGlu5 receptors and cellular prion protein mediate amyloid-β-facilitated synaptic long-term depression in vivo. Nat. Commun. *5*, 3374.

Huo, Y., Khatri, N., Hou, Q., Gilbert, J., Wang, G., and Man, H.-Y. (2015). The deubiquitinating enzyme USP46 regulates AMPA receptor ubiquitination and trafficking. J. Neurochem. *134*, 1067–1080.

Hu, Z., Zhao, J., Hu, T., Luo, Y., Zhu, J., and Li, Z. (2015). miR-501-3p mediates the activity-dependent regulation of the expression of AMPA receptor subunit GluA1. J. Cell Biol. *208*, 949–959.

Hwang, S. H., Wecksler, A. T., Wagner, K., and Hammock, B. D. (2013). Rationally designed multitarget agents against inflammation and pain. Curr. Med. Chem. *20*, 1783–1799.

Igarashi, M., Gao, F., Kim, H.-W., Ma, K., Bell, J. M., and Rapoport, S. I. (2009). Dietary n-6 PUFA deprivation for 15 weeks reduces arachidonic acid concentrations while increasing n-3 PUFA concentrations in organs of post-weaning male rats. Biochim. Biophys. Acta *1791*, 132–139.

Igarashi, M., Kim, H.-W., Chang, L., Ma, K., and Rapoport, S. I. (2012). Dietary n-6 polyunsaturated fatty acid deprivation increases docosahexaenoic acid metabolism in rat brain. J. Neurochem. *120*, 985–997.

Ikeda, I., Mitsui, K., and Imaizumi, K. (1996). Effect of dietary linoleic, alpha-linolenic and arachidonic acids on lipid metabolism, tissue fatty acid composition and eicosanoid production in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) *42*, 541–551.

Imig, J. D. (2012). Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. Physiol. Rev. *92*, 101–130.

Iqbal, K., Alonso, A. C., Gong, C. X., Khatoon, S., Singh, T. J., and Grundke-Iqbal, I. (1994). Mechanism of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. Mol. Neurobiol. *9*, 119–123.

Iremonger, K. J., Kuzmiski, J. B., Baimoukhametova, D. V., and Bains, J. S. (2011). Dual regulation of anterograde and retrograde transmission by endocannabinoids. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 12011–12020.

Ittner, L. M. *et al.* (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. Cell *142*, 387–397.

Ittner, L. M., and Götz, J. (2011). Amyloid-β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. Nat. Rev. Neurosci. *12*, 65–72.

Iwamoto, N., Kobayashi, K., and Kosaka, K. (1989). The formation of prostaglandins in the postmortem cerebral cortex of Alzheimer-type dementia patients. J. Neurol. *236*, 80–84.

Jacqmin-Gadda, H., Fabrigoule, C., Commenges, D., and Dartigues, J. F. (1997). A 5-year longitudinal study of the Mini-Mental State Examination in normal aging. Am. J. Epidemiol. *145*, 498–506.

Jahn, R., and Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 631–643.

Jakobsson, P. J., Thorén, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 7220–7225.

Janefjord, E., Mååg, J. L. V., Harvey, B. S., and Smid, S. D. (2014). Cannabinoid effects on β amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. Cell. Mol. Neurobiol. *34*, 31–42.

Jessell, T. M., and Kandel, E. R. (1993). Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. Cell *72 Suppl*, 1–30.

Jewell, J. L., Oh, E., and Thurmond, D. C. (2010). Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *298*, R517–R531.

Jiang, H., Kruger, N., Lahiri, D. R., Wang, D., Vatèle, J. M., and Balazy, M. (1999). Nitrogen dioxide induces cis-trans-isomerization of arachidonic acid within cellular phospholipids. Detection of trans-arachidonic acids in vivo. J. Biol. Chem. *274*, 16235–16241.

Jin, I., Udo, H., Rayman, J. B., Puthanveettil, S., Kandel, E. R., and Hawkins, R. D. (2012). Spontaneous transmitter release recruits postsynaptic mechanisms of long-term and intermediate-term facilitation in Aplysia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 9137–9142.

Johansson, J. U., Woodling, N. S., Wang, Q., Panchal, M., Liang, X., Trueba-Saiz, A., Brown, H. D., Mhatre, S. D., Loui, T., and Andreasson, K. I. (2015). Prostaglandin signaling suppresses beneficial microglial function in Alzheimer's disease models. J. Clin. Invest. *125*, 350–364.

Jordà, M. A., Verbakel, S. E., Valk, P. J. M., Vankan-Berkhoudt, Y. V., Maccarrone, M., Finazzi-Agrò, A., Löwenberg, B., and Delwel, R. (2002). Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Blood *99*, 2786–2793.

Joshi, Y. B., Di Meco, A., and Praticó, D. (2014). Modulation of amyloid-β production by leukotriene B4 via the γ-secretase pathway. J. Alzheimers Dis. JAD *38*, 503–506.

Juman, S., Hashimoto, M., Katakura, M., Inoue, T., Tanabe, Y., Arita, M., Miki, T., and Shido, O. (2013). Effects of long-term oral administration of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on the immune functions of young rats. Nutrients *5*, 1949–1961.

Jung, K.-M., Astarita, G., Yasar, S., Vasilevko, V., Cribbs, D. H., Head, E., Cotman, C. W., and Piomelli, D. (2012). An amyloid β42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *33*, 1522–1532.

Kamp, F., Guo, W., Souto, R., Pilch, P. F., Corkey, B. E., and Hamilton, J. A. (2003). Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. J. Biol. Chem. *278*, 7988–7995.

Kampf, J. P., and Kleinfeld, A. M. (2007). Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? An unknown protein mediates free fatty acid transport across the adipocyte plasma membrane. Physiol. Bethesda Md *22*, 7–14.

Kan, C. F. K., Singh, A. B., Dong, B., Shende, V. R., and Liu, J. (2015). PPARδ activation induces hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 4 expression in vivo and in vitro. Biochim. Biophys. Acta *1851*, 577–587.

Kan, C. F. K., Singh, A. B., Stafforini, D. M., Azhar, S., and Liu, J. (2014). Arachidonic acid downregulates acyl-CoA synthetase 4 expression by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation. J. Lipid Res. *55*, 1657–1667.

Kang, M. J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., Iijima, H., and Yamamoto, T. T. (1997). A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 2880–2884.

Kanoski, S. E., and Davidson, T. L. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. Physiol. Behav. *103*, 59–68.

Kassem, A. A., Abu Bakar, M. Z., Yong Meng, G., and Mustapha, N. M. (2012). Dietary (n-6 : n-3) Fatty Acids Alter Plasma and Tissue Fatty Acid Composition in Pregnant Sprague Dawley Rats. Sci. World J. *2012*.

Katsuki, H., and Okuda, S. (1995). Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. Prog. Neurobiol. *46*, 607–636.

Kawakita, E., Hashimoto, M., and Shido, O. (2006). Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. Neuroscience *139*, 991–997.

Kee, H. J., Koh, J. T., Yang, S. Y., Lee, Z. H., Baik, Y. H., and Kim, K. K. (2003). A novel murine long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain participates in neuronal cell proliferation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *305*, 925–933.

Keene, C. D. *et al.* (2010). Suppressed accumulation of cerebral amyloid {beta} peptides in aged transgenic Alzheimer's disease mice by transplantation with wild-type or prostaglandin E2 receptor subtype 2-null bone marrow. Am. J. Pathol. *177*, 346–354.

Keifer, J., and Zheng, Z. (2010). AMPA receptor trafficking and learning. Eur. J. Neurosci. *32*, 269–277.

Kellom, M., Basselin, M., Keleshian, V. L., Chen, M., Rapoport, S. I., and Rao, J. S. (2012). Dose-dependent changes in neuroinflammatory and arachidonic acid cascade markers with synaptic marker loss in rat lipopolysaccharide infusion model of neuroinflammation. BMC Neurosci. *13*, 50.

Kelly, L., Grehan, B., Chiesa, A. D., O'Mara, S. M., Downer, E., Sahyoun, G., Massey, K. A., Nicolaou, A., and Lynch, M. A. (2011). The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. Neurobiol. Aging *32*, 2318.e1–e15.

Kennedy, E. P., and Weiss, S. B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. J. Biol. Chem. *222*, 193–214.

Kennedy, M. B. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. Science *290*, 750–754.

Kervern, M., Angeli, A., Nicole, O., Léveillé, F., Parent, B., Villette, V., Buisson, A., and Dutar, P. (2012). Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-β peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors. J. Alzheimers Dis. JAD *32*, 183–196.

Kim, H.-W., Rao, J. S., Rapoport, S. I., and Igarashi, M. (2011). Dietary n-6 PUFA deprivation downregulates arachidonate but upregulates docosahexaenoate metabolizing enzymes in rat brain. Biochim. Biophys. Acta *1811*, 111–117.

Kim, H.-Y. (2007). Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. J. Biol. Chem. *282*, 18661–18665.

Kiso, Y. (2011). Pharmacology in health foods: effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on the age-related decline in brain and cardiovascular system function. J. Pharmacol. Sci. *115*, 471–475.

Klein, T. W. (2005). Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. Nat. Rev. Immunol. *5*, 400–411.

Klein, T. W., Friedman, H., and Specter, S. (1998). Marijuana, immunity and infection. J. Neuroimmunol. *83*, 102–115.

Koppel, J., Bradshaw, H., Goldberg, T. E., Khalili, H., Marambaud, P., Walker, M. J., Pazos, M., Gordon, M. L., Christen, E., and Davies, P. (2009). Endocannabinoids in Alzheimer's disease and their impact on normative cognitive performance: a case-control and cohort study. Lipids Health Dis. *8*, 2.

Koppel, J., and Davies, P. (2008). Targeting the endocannabinoid system in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *15*, 495–504.

Kosik, K. S. (1990). Tau protein and neurodegeneration. Mol. Neurobiol. *4*, 171–179.

Kotani, S., Nakazawa, H., Tokimasa, T., Akimoto, K., Kawashima, H., Toyoda-Ono, Y., Kiso, Y., Okaichi, H., and Sakakibara, M. (2003). Synaptic plasticity preserved with arachidonic acid diet in aged rats. Neurosci. Res. *46*, 453–461.

Kovalchuk, Y., Miller, B., Sarantis, M., and Attwell, D. (1994). Arachidonic acid depresses non-NMDA receptor currents. Brain Res. *643*, 287–295.

Kövari, E., Hof, P. R., and Bouras, C. (2011). The Geneva brain collection. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1225 Suppl 1*, E131–E146.

Kozak, K. R., and Marnett, L. J. (2002). Oxidative metabolism of endocannabinoids. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *66*, 211–220.

Kriem, B. *et al.* (2005). Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *19*, 85–87.

Krishna, M., and Narang, H. (2008). The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *65*, 3525–3544.

Küch, E.-M., Vellaramkalayil, R., Zhang, I., Lehnen, D., Brügger, B., Sreemmel, W., Ehehalt, R., Poppelreuther, M., and Füllekrug, J. (2014). Differentially localized acyl-CoA synthetase 4 isoenzymes mediate the metabolic channeling of fatty acids towards phosphatidylinositol. Biochim. Biophys. Acta *1841*, 227–239.

Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S. F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. EMBO J. *29*, 3020–3032.

Kulakova, S. N., Gapparova, K. M., Pogozheva, A. V., and Levachev, M. M. (1999). [Evaluation of the effects of fish and vegetable omega-3 PUFA complex on the erythrocyte fatty acid composition in patients with ischemic heart disease and impaired glucose tolerance]. Vopr. Pitan. *68*, 26–29.

Kulmacz, R. J. (1998). Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis. FEBS Lett. *430*, 154–157.

Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J., and Roher, A. E. (1996). Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. J. Biol. Chem. *271*, 4077–4081.

Kurumbail, R. G. *et al.* (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature *384*, 644–648.

Kuusisto, J., Koivisto, K., Kervinen, K., Mykkänen, L., Helkala, E. L., Vanhanen, M., Hänninen, T., Pyörälä, K., Kesäniemi, Y. A., and Riekkinen, P. (1994). Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. BMJ *309*, 636–638.

Kuwata, H., Yoshimura, M., Sasaki, Y., Yoda, E., Nakatani, Y., Kudo, I., and Hara, S. (2014). Role of long-chain acyl-coenzyme A synthetases in the regulation of arachidonic acid metabolism in interleukin 1β-stimulated rat fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta *1841*, 44–53.

Laitinen, M. H., Ngandu, T., Rovio, S., Helkala, E.-L., Uusitalo, U., Viitanen, M., Nissinen, A., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Kivipelto, M. (2006). Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based study. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. *22*, 99–107.

Lands, W. E. (1958). Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. J. Biol. Chem. *231*, 883–888.

Lands, W. E. (2000). Stories about acyl chains. Biochim. Biophys. Acta *1483*, 1–14.

Latham, C. F., Osborne, S. L., Cryle, M. J., and Meunier, F. A. (2007). Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc18a. J. Neurochem. *100*, 1543–1554.

Lee, G., Newman, S. T., Gard, D. L., Band, H., and Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. J. Cell Sci. *111 (Pt 21)*, 3167–3177.

Legler, D. F., Bruckner, M., Uetz-von Allmen, E., and Krause, P. (2010). Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. Int. J. Biochem. Cell Biol. *42*, 198–201.

Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M. P., and Selkoe, D. J. (2003). Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. Neuron *40*, 1087–1093.

Lepage, G., and Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. J. Lipid Res. *27*, 114–120.

Letellier, M., Elramah, S., Mondin, M., Soula, A., Penn, A., Choquet, D., Landry, M., Thoumine, O., and Favereaux, A. (2014). miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling. Nat. Neurosci. *17*, 1040–1042.

Leung, R. *et al.* (2013). Inflammatory proteins in plasma are associated with severity of Alzheimer's disease. PloS One *8*, e64971.

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., and Wang, K. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science *269*, 973–977.

Lewis, J. *et al.* (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. Science *293*, 1487–1491.

Lewis, R. A., Soter, N. A., Diamond, P. T., Austen, K. F., Oates, J. A., and Roberts, L. J. (1982). Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *129*, 1627–1631.

Liang, X., Wu, L., Hand, T., and Andreasson, K. (2005). Prostaglandin D2 mediates neuronal protection via the DP1 receptor. J. Neurochem. *92*, 477–486.

Lien, E. L., Boyle, F. G., Yuhas, R. J., and Kuhlman, C. F. (1994). Effect of maternal dietary arachidonic or linoleic acid on rat pup fatty acid profiles. Lipids *29*, 53–59.

Li, L., Liu, Z., Liu, J., Tai, X., Hu, X., Liu, X., Wu, Z., Zhang, G., Shi, M., and Zhao, G. (2013). Ginsenoside Rd attenuates beta-amyloid-induced tau phosphorylation by altering the functional balance of glycogen synthase kinase 3beta and protein phosphatase 2A. Neurobiol. Dis. *54*, 320–328.

Lim, G. P. *et al.* (2000). Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 5709–5714.

Lin, A., Hou, Q., Jarzylo, L., Amato, S., Gilbert, J., Shang, F., and Man, H.-Y. (2011). Nedd4-mediated AMPA receptor ubiquitination regulates receptor turnover and trafficking. J. Neurochem. *119*, 27–39.

Linder, M., Fanni, J., and Parmentier, M. (2005). Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases. Mar. Biotechnol. N. Y. N *7*, 70–76.

Li, R., Dozmorov, M., Hellberg, F., Tian, Y., Jilderos, B., and Wigström, H. (2004). Characterization of NMDA induced depression in rat hippocampus: involvement of AMPA and NMDA receptors. Neurosci. Lett. *357*, 87–90.

Li, R., and Singh, M. (2014). Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. Front. Neuroendocrinol. *35*, 385–403.

Little, S. J., Lynch, M. A., Manku, M., and Nicolaou, A. (2007). Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: a lipidomic analysis. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *77*, 155–162.

Liu, C., and Götz, J. (2013). Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. PloS One *8*, e84849.

Liu, J. J., Green, P., John Mann, J., Rapoport, S. I., and Sublette, M. E. (2015). Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. Brain Res. *1597*, 220–246.

Liu, L. *et al.* (2014). Higher efficacy of dietary DHA provided as a phospholipid than as a triglyceride for brain DHA accretion in neonatal piglets. J. Lipid Res. *55*, 531–539.

Liu, Z., Huang, Y., Zhang, Y., Chen, D., and Zhang, Y. Q. (2011). Drosophila Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 regulates axonal transport of synaptic vesicles and is required for synaptic development and transmission. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 2052–2063.

Li, W., Poteet, E., Xie, L., Liu, R., Wen, Y., and Yang, S.-H. (2011). Regulation of matrix metalloproteinase 2 by oligomeric amyloid β protein. Brain Res. *1387*, 141–148.

Logan, A. C. (2004). Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional. Lipids Health Dis. *3*, 25.

Lopez, O. L., Becker, J. T., Wahed, A. S., Saxton, J., Sweet, R. A., Wolk, D. A., Klunk, W., and Dekosky, S. T. (2009). Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *80*, 600–607.

Loy, C., and Schneider, L. (2006). Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Cochrane Database Syst. Rev., CD001747.

Lu, B., Jiang, Y. J., Zhou, Y., Xu, F. Y., Hatch, G. M., and Choy, P. C. (2005). Cloning and characterization of murine 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferases and their regulation by PPARalpha in murine heart. Biochem. J. *385*, 469–477.

Luchtman, D. W., and Song, C. (2013). Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: findings from animal and clinical studies. Neuropharmacology *64*, 550–565.

Lukiw, W. J., Cui, J.-G., Marcheselli, V. L., Bodker, M., Botkjaer, A., Gotlinger, K., Serhan, C. N., and Bazan, N. G. (2005). A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. J. Clin. Invest. *115*, 2774–2783.

Lussier, M. P., Nasu-Nishimura, Y., and Roche, K. W. (2011). Activity-dependent ubiquitination of the AMPA receptor subunit GluA2. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 3077–3081.

Lynch, A. M., Loane, D. J., Minogue, A. M., Clarke, R. M., Kilroy, D., Nally, R. E., Roche, O. J., O'Connell, F., and Lynch, M. A. (2007). Eicosapentaenoic acid confers neuroprotection in the amyloid-beta challenged aged hippocampus. Neurobiol. Aging *28*, 845–855.

Lynch, M. A., and Voss, K. L. (1990). Arachidonic acid increases inositol phospholipid metabolism and glutamate release in synaptosomes prepared from hippocampal tissue. J. Neurochem. *55*, 215–221.

Maekawa, M. *et al.* (2009). Arachidonic acid drives postnatal neurogenesis and elicits a beneficial effect on prepulse inhibition, a biological trait of psychiatric illnesses. PloS One *4*, e5085.

Maekawa, M. *et al.* (2010). Excessive ingestion of long-chain polyunsaturated fatty acids during developmental stage causes strain- and sex-dependent eye abnormalities in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. *402*, 431–437.

Maesaka, J. K., Sodam, B., Palaia, T., Ragolia, L., Batuman, V., Miyawaki, N., Shastry, S., Youmans, S., and El-Sabban, M. (2013). Prostaglandin D2 synthase: Apoptotic factor in alzheimer plasma, inducer of reactive oxygen species, inflammatory cytokines and dialysis dementia. J. Nephropathol. *2*, 166–180.

Malaplate-Armand, C., Florent-Béchard, S., Youssef, I., Koziel, V., Sponne, I., Kriem, B., Leininger-Muller, B., Olivier, J.-L., Oster, T., and Pillot, T. (2006). Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. Neurobiol. Dis. *23*, 178–189.

Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron *44*, 5–21.

Maloberti, P. M., Duarte, A. B., Orlando, U. D., Pasqualini, M. E., Solano, A. R., López-Otín, C., and Podestá, E. J. (2010). Functional interaction between acyl-CoA synthetase 4, lipooxygenases and cyclooxygenase-2 in the aggressive phenotype of breast cancer cells. PloS One *5*, e15540.

Mann, N. J., Johnson, L. G., Warrick, G. E., and Sinclair, A. J. (1995). The arachidonic acid content of the Australian diet is lower than previously estimated. J. Nutr. *125*, 2528–2535.

Maresz, K. *et al.* (2007). Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. Nat. Med. *13*, 492–497.

Marrone, D. F. (2005). The morphology of bi-directional experience-dependent cortical plasticity: a meta-analysis. Brain Res. Brain Res. Rev. *50*, 100–113.

Marsicano, G. *et al.* (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. Science *302*, 84–88.

Marszalek, J. R., Kitidis, C., Dararutana, A., and Lodish, H. F. (2004). Acyl-CoA synthetase 2 overexpression enhances fatty acid internalization and neurite outgrowth. J. Biol. Chem. *279*, 23882–23891.

Marszalek, J. R., Kitidis, C., Dirusso, C. C., and Lodish, H. F. (2005). Long-chain acyl-CoA synthetase 6 preferentially promotes DHA metabolism. J. Biol. Chem. *280*, 10817–10826.

Martinelli, N., Consoli, L., and Olivieri, O. (2009). A "desaturase hypothesis" for atherosclerosis: Janus-faced enzymes in omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid metabolism. J. Nutr. Nutr. *2*, 129–139.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., and Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature *372*, 686–691.

Mashimo, M., Hirabayashi, T., Murayama, T., and Shimizu, T. (2008). Cytosolic PLA2(alpha) activation in Purkinje neurons and its role in AMPA-receptor trafficking. J. Cell Sci. *121*, 3015–3024.

Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E., and Bateman, R. J. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. Science *330*, 1774.

Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature *309*, 261–263.

McGahon, B., Clements, M. P., and Lynch, M. A. (1997). The ability of aged rats to sustain long-term potentiation is restored when the age-related decrease in membrane arachidonic acid concentration is reversed. Neuroscience *81*, 9–16.

McGahon, B., Murray, C. A., Clements, M. P., and Lynch, M. A. (1998). Analysis of the effect of membrane arachidonic acid concentration on modulation of glutamate release by interleukin-1: an age-related study. Exp. Gerontol. *33*, 343–354.

McGowan, E., Eriksen, J., and Hutton, M. (2006). A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. Trends Genet. TIG *22*, 281–289.

McShane, R., Areosa Sastre, A., and Minakaran, N. (2006). Memantine for dementia. Cochrane Database Syst. Rev., CD003154.

Meirer, K., Steinhilber, D., and Proschak, E. (2014). Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. *114*, 83–91.

Meloni, I. *et al.* (2009). The XLMR gene ACSL4 plays a role in dendritic spine architecture. Neuroscience *159*, 657–669.

Mendonsa, R., and Engebrecht, J. (2009). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and phospholipase D-generated phosphatidic acid specify SNARE-mediated vesicle fusion for prospore membrane formation. Eukaryot. Cell *8*, 1094–1105.

Mensink, R. P., Temme, E. H., and Hornstra, G. (1994). Dietary saturated and trans fatty acids and lipoprotein metabolism. Ann. Med. *26*, 461–464.

Michelassi, F., Landa, L., Hill, R. D., Lowenstein, E., Watkins, W. D., Petkau, A. J., and Zapol, W. M. (1982). Leukotriene D4: a potent coronary artery vasoconstrictor associated with impaired ventricular contraction. Science *217*, 841–843.

Mielke, M. M., Vemuri, P., and Rocca, W. A. (2014). Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. Clin. Epidemiol. *6*, 37–48.

Milatovic, D., Montine, T. J., and Aschner, M. (2011). Prostanoid signaling: dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity. Neurotoxicology *32*, 312–319.

Miller, E. C., Teravskis, P. J., Dummer, B. W., Zhao, X., Huganir, R. L., and Liao, D. (2014). Tau phosphorylation and tau mislocalization mediate soluble Aβ oligomer-induced AMPA glutamate receptor signaling deficits. Eur. J. Neurosci. *39*, 1214–1224.

Mincheva-Tasheva, S., and Soler, R. M. (2013). NF-κB signaling pathways: role in nervous system physiology and pathology. Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry *19*, 175–194.

Miners, J. S., van Helmond, Z., Kehoe, P. G., and Love, S. (2010). Changes with age in the activities of beta-secretase and the Abeta-degrading enzymes neprilysin, insulin-degrading enzyme and angiotensin-converting enzyme. Brain Pathol. Zurich Switz. *20*, 794–802.

Minich, D. M., Vonk, R. J., and Verkade, H. J. (1997). Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid-deficient conditions. J. Lipid Res. *38*, 1709–1721.

Misura, K. M., Scheller, R. H., and Weis, W. I. (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. Nature *404*, 355–362.

Mitchell, R. W., Edmundson, C. L., Miller, D. W., and Hatch, G. M. (2009). On the mechanism of oleate transport across human brain microvessel endothelial cells. J. Neurochem. *110*, 1049–1057.

Mitchell, R. W., and Hatch, G. M. (2011). Fatty acid transport into the brain: of fatty acid fables and lipid tails. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *85*, 293–302.

Mitchell, R. W., On, N. H., Del Bigio, M. R., Miller, D. W., and Hatch, G. M. (2011). Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. J. Neurochem. *117*, 735–746.

Mochizuki, K., Suzuki, T., and Goda, T. (2008). PPAR alpha and PPAR delta transactivity and p300 binding activity induced by arachidonic acid in colorectal cancer cell line Caco-2. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) *54*, 298–302.

Mohrhauer, H., and Holman, R. T. (1963). THE EFFECT OF DOSE LEVEL OF ESSENTIAL FATTY ACIDS UPON FATTY ACID COMPOSITION OF THE RAT LIVER. J. Lipid Res. *4*, 151–159.

Mohri, I. *et al.* (2007). Hematopoietic prostaglandin D synthase and DP1 receptor are selectively upregulated in microglia and astrocytes within senile plaques from human patients and in a mouse model of Alzheimer disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *66*, 469–480.

Mokhtar, S. H., Bakhuraysah, M. M., Cram, D. S., and Petratos, S. (2013). The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. Int. J. Alzheimers Dis. *2013*, 910502.

Molofsky, A. V., Krencik, R., Krenick, R., Ullian, E. M., Ullian, E., Tsai, H., Deneen, B., Richardson, W. D., Barres, B. A., and Rowitch, D. H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. Genes Dev. *26*, 891–907.

Moncada, S., and Vane, J. R. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2, and prostacyclin. Pharmacol. Rev. *30*, 293–331.

de la Monte, S. M., and Wands, J. R. (2006). Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 167–181.

Montine, T. J., Sidell, K. R., Crews, B. C., Markesbery, W. R., Marnett, L. J., Roberts, L. J., and Morrow, J. D. (1999). Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. Neurology *53*, 1495–1498.

Moore, S. A. (2001). Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. J. Mol. Neurosci. MN *16*, 195–200; discussion 215–221.

Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., and Maccioni, R. B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. Front. Cell. Neurosci. *8*, 112.

Morimoto, K., Horio, J., Satoh, H., Sue, L., Beach, T., Arita, S., Tooyama, I., and Konishi, Y. (2011). Expression profiles of cytokines in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients compared to the brains of non-demented patients with and without increasing AD pathology. J. Alzheimers Dis. JAD *25*, 59–76.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods *11*, 47–60.

Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature *319*, 774–776.

Motta, M., Imbesi, R., Di Rosa, M., Stivala, F., and Malaguarnera, L. (2007). Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: correlation with the disease progression. Immunol. Lett. *114*, 46–51.

Mozaffarian, D., Cao, H., King, I. B., Lemaitre, R. N., Song, X., Siscovick, D. S., and Hotamisligil, G. S. (2010). Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. Am. J. Clin. Nutr. *92*, 1350–1358.

Mrak, R. E., Sheng, J. G., and Griffin, W. S. (1996). Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *55*, 273–279.

Mukherjee, S., and Manahan-Vaughan, D. (2013). Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. Neuropharmacology *66*, 65–81.

Mulder, J. *et al.* (2011). Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. Brain J. Neurol. *134*, 1041–1060.

Munoz, L., and Ammit, A. J. (2010). Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. Neuropharmacology *58*, 561–568.

Murphy, T., Dias, G. P., and Thuret, S. (2014). Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap. Neural Plast. *2014*, 563160.

Nakajima, K., Matsushita, Y., Tohyama, Y., Kohsaka, S., and Kurihara, T. (2006). Differential suppression of endotoxin-inducible inflammatory cytokines by nuclear factor kappa B (NFkappaB) inhibitor in rat microglia. Neurosci. Lett. *401*, 199–202.

Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Annoura, H., and Ohno, T. (2001). Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. Brain Res. *912*, 128–136.

Narumiya, S., Ogorochi, T., Nakao, K., and Hayaishi, O. (1982). Prostaglandin D2 in rat brain, spinal cord and pituitary: basal level and regional distribution. Life Sci. *31*, 2093–2103.

Ngatcha-Ribert, L. (2004). Maladie d'Alzheimer et société : une analyse des représentations sociales. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil. *2*, 49–66.

Nguyen, L. N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M. R., Goh, E. L. K., and Silver, D. L. (2014). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. Nature *509*, 503–506.

Nielsen, S. J., Siega-Riz, A. M., and Popkin, B. M. (2002). Trends in energy intake in U.S. between 1977 and 1996: similar shifts seen across age groups. Obes. Res. *10*, 370–378.

Nisbet, R. M., Polanco, J.-C., Ittner, L. M., and Götz, J. (2015). Tau aggregation and its interplay with amyloid-β. Acta Neuropathol. (Berl.) *129*, 207–220.

Nishizaki, T., Nomura, T., Matsuoka, T., and Tsujishita, Y. (1999). Arachidonic acid as a messenger for the expression of long-term potentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *254*, 446–449.

Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, D. C., and Liao, J. K. (1999). Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. Science *285*, 1276–1279.

Nouvelot, A., Delbart, C., and Bourre, J. M. (1986). Hepatic metabolism of dietary alpha-linolenic acid in suckling rats, and its possible importance in polyunsaturated fatty acid uptake by the brain. Ann. Nutr. Metab. *30*, 316–323.

Novak, E. M., Dyer, R. A., and Innis, S. M. (2008). High dietary omega-6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. Brain Res. *1237*, 136–145.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature *307*, 462–465.

O'Connor, D. L. *et al.* (2001). Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. Pediatrics *108*, 359–371.

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., and LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *24*, 1063–1070.

Oishi, Y., Yoshida, K., Scammell, T. E., Urade, Y., Lazarus, M., and Saper, C. B. (2015). The roles of prostaglandin E2 and D2 in lipopolysaccharide-mediated changes in sleep. Brain. Behav. Immun. *47*, 172–177.

Okaichi, Y., Ishikura, Y., Akimoto, K., Kawashima, H., Toyoda-Ono, Y., Kiso, Y., and Okaichi, H. (2005). Arachidonic acid improves aged rats' spatial cognition. Physiol. Behav. *84*, 617–623.

Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., and Ueda, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. J. Biol. Chem. *279*, 5298–5305.

Olde Loohuis, N. F. M., Ba, W., Stoerchel, P. H., Kos, A., Jager, A., Schratt, G., Martens, G. J. M., van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N., and Aschrafi, A. (2015). MicroRNA-137 Controls AMPA-Receptor-Mediated Transmission and mGluR-Dependent LTD. Cell Rep. *11*, 1876–1884.

Olson, J. K., and Miller, S. D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *173*, 3916–3924.

Orehek, J., Douglas, J. S., Lewis, A. J., and Bouhuys, A. (1973). Prostaglandin regulation of airway smooth muscle tone. Nature. New Biol. *245*, 84–85.

Orejana, L., Barros-Miñones, L., Aguirre, N., and Puerta, E. (2013). Implication of JNK pathway on tau pathology and cognitive decline in a senescence-accelerated mouse model. Exp. Gerontol. *48*, 565–571.

Orlando, U. D., Garona, J., Ripoll, G. V., Maloberti, P. M., Solano, Á. R., Avagnina, A., Gomez, D. E., Alonso, D. F., and Podestá, E. J. (2012). The functional interaction between Acyl-CoA synthetase 4, 5-lipooxygenase and cyclooxygenase-2 controls tumor growth: a novel therapeutic target. PloS One *7*, e40794.

Pandey, S. P., Singh, H. K., and Prasad, S. (2015). Alterations in Hippocampal Oxidative Stress, Expression of AMPA Receptor GluR2 Subunit and Associated Spatial Memory Loss by Bacopa monnieri Extract (CDRI-08) in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus Type 2 Mice. PloS One *10*, e0131862.

Pawlosky, R. J., and Salem, N. (2004). Perspectives on alcohol consumption: liver polyunsaturated fatty acids and essential fatty acid metabolism. Alcohol Fayettev. N *34*, 27–33.

Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2001). The Mouse Brain: In Stereotaxic Coordinates, Academic Press.

Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., and Troadec, J.-D. (2009). Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. Physiol. Behav. *97*, 279–292.

Pellerin, L., and Wolfe, L. S. (1991). Release of arachidonic acid by NMDA-receptor activation in the rat hippocampus. Neurochem. Res. *16*, 983–989.

Peng, X., Zhang, C., Alkayed, N. J., Harder, D. R., and Koehler, R. C. (2004). Dependency of cortical functional hyperemia to forepaw stimulation on epoxygenase and nitric oxide synthase activities in rats. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. *24*, 509–517.

Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Ruipérez, V., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2010). Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 1071–1078.

Pertwee, R. G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Pharmacol. Ther. *74*, 129–180.

Petersen, R. C., Doody, R., Kurz, A., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rabins, P. V., Ritchie, K., Rossor, M., Thal, L., and Winblad, B. (2001). Current concepts in mild cognitive impairment. Arch. Neurol. *58*, 1985–1992.

Petersen, R. C., Smith, G. E., Waring, S. C., Ivnik, R. J., Tangalos, E. G., and Kokmen, E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. Arch. Neurol. *56*, 303–308.

Phan, C. T., and Tso, P. (2001). Intestinal lipid absorption and transport. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *6*, D299–D319.

Phillis, J. W., Horrocks, L. A., and Farooqui, A. A. (2006). Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. Brain Res. Rev. *52*, 201–243.

Pillot, T., Drouet, B., Queillé, S., Labeur, C., Vandekerchkhove, J., Rosseneu, M., Pinçon-Raymond, M., and Chambaz, J. (1999). The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. J. Neurochem. *73*, 1626–1634.

Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talussot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., and Lins, L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. J. Biol. Chem. *271*, 28757–28765.

Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 873–884.

Poeckel, D., and Funk, C. D. (2010). The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. Cardiovasc. Res. *86*, 243–253.

Poirier, J., Miron, J., Picard, C., Gormley, P., Théroux, L., Breitner, J., and Dea, D. (2014). Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *35 Suppl 2*, S3–S10.

Polo-Hernández, E., Tello, V., Arroyo, Á. A., Domínguez-Prieto, M., de Castro, F., Tabernero, A., and Medina, J. M. (2014). Oleic acid synthesized by stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) in the lateral periventricular zone of the developing rat brain mediates neuronal growth, migration and the arrangement of prospective synapses. Brain Res. *1570*, 13–25.

Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A., and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 7212–7221.

Qu, B.-X., Gong, Y., Sinclair, D., Fu, M., Perl, D., and Diaz-Arrastia, R. (2013). cPLA2α knockout mice exhibit abnormalities in the architecture and synapses of cortical neurons. Brain Res. *1497*, 101–105.

Quinn, J. F. *et al.* (2010). Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. JAMA J. Am. Med. Assoc. *304*, 1903–1911.

Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C., and Maccioni, R. B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. Exp. Cell Res. *295*, 245–257.

Qu, W.-M., Huang, Z.-L., Xu, X.-H., Aritake, K., Eguchi, N., Nambu, F., Narumiya, S., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2006). Lipocalin-type prostaglandin D synthase produces prostaglandin D2 involved in regulation of physiological sleep. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 17949–17954.

Radmark, O., Serhan, C., Hamberg, M., Lundberg, U., Ennis, M. D., Bundy, G. L., Oglesby, T. D., Aristoff, P. A., Harrison, A. W., and Slomp, G. (1984). Stereochemistry, total synthesis, and biological activity of 14,15-dihydroxy-5,8,10,12-eicosatetraenoic acid. J. Biol. Chem. *259*, 13011–13016.

Rahm, J. J., and Holman, R. T. (1964). EFFECT OF LINOLEIC ACID UPON THE METABOLISM OF LINOLENIC ACID. J. Nutr. *84*, 15–19.

Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C. U., Werner, A., Jones, L. L., and Kreutzberg, G. W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. Brain Res. Brain Res. Rev. *30*, 77–105.

Rakonjac, M., Fischer, L., Provost, P., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B., and Rådmark, O. (2006). Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 13150–13155.

Ramakers, J. D., Mensink, R. P., Verstege, M. I., Velde, A. A. Te, and Plat, J. (2008). An arachidonic acid-enriched diet does not result in more colonic inflammation as compared with fish oil-or oleic acid-enriched diets in mice with experimental colitis. Br. J. Nutr. *100*, 347–354.

Ramirez, S. H. *et al.* (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *32*, 4004–4016.

Rao, A. M., Hatcher, J. F., Kindy, M. S., and Dempsey, R. J. (1999). Arachidonic acid and leukotriene C4: role in transient cerebral ischemia of gerbils. Neurochem. Res. *24*, 1225–1232.

Rapoport, S. I., Chang, M. C., and Spector, A. A. (2001). Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. J. Lipid Res. *42*, 678–685.

Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochem. Pharmacol. *88*, 640–651.

Rett, B. S., and Whelan, J. (2011). Increasing dietary linoleic acid does not increase tissue arachidonic acid content in adults consuming Western-type diets: a systematic review. Nutr. Metab. *8*, 36.

Rhein, V. *et al.* (2009). Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 20057–20062.

Ribé, E. M. *et al.* (2005). Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. Neurobiol. Dis. *20*, 814–822.

Richardson, A. J., Cyhlarova, E., and Ross, M. A. (2003). Omega-3 and omega-6 fatty acid concentrations in red blood cell membranes relate to schizotypal traits in healthy adults. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *69*, 461–466.

Rich, J. B., Rasmusson, D. X., Folstein, M. F., Carson, K. A., Kawas, C., and Brandt, J. (1995). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. Neurology *45*, 51–55.

Rickman, C., and Davletov, B. (2005). Arachidonic acid allows SNARE complex formation in the presence of Munc18. Chem. Biol. *12*, 545–553.

Rickman, C., Medine, C. N., Bergmann, A., and Duncan, R. R. (2007). Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin 1 interaction. J. Biol. Chem. *282*, 12097–12103.

Rinaldo-Matthis, A., and Haeggström, J. Z. (2010). Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. Biochimie *92*, 676–681.

Rink, C., and Khanna, S. (2011). Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. Antioxid. Redox Signal. *14*, 1889–1903.

Rizo, J., and Südhof, T. C. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. Nat. Rev. Neurosci. *3*, 641–653.

Rodríguez, J. J., Witton, J., Olabarria, M., Noristani, H. N., and Verkhratsky, A. (2010). Increase in the density of resting microglia precedes neuritic plaque formation and microglial activation in a transgenic model of Alzheimer's disease. Cell Death Dis. *1*, e1.

Roseth, S., Fykse, E. M., and Fonnum, F. (1998). The effect of arachidonic acid and free fatty acids on vesicular uptake of glutamate and gamma-aminobutyric acid. Eur. J. Pharmacol. *341*, 281–288.

Rossner, S., Lange-Dohna, C., Zeitschel, U., and Perez-Polo, J. R. (2005). Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. J. Neurochem. *92*, 226–234.

Rouzer, C. A., and Marnett, L. J. (2008). Non-redundant functions of cyclooxygenases: oxygenation of endocannabinoids. J. Biol. Chem. *283*, 8065–8069.

Rouzer, C. A., Matsumoto, T., and Samuelsson, B. (1986). Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 857–861.

Rubio-Perez, J. M., and Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. ScientificWorldJournal *2012*, 756357.

Rudy, C. C., Hunsberger, H. C., Weitzner, D. S., and Reed, M. N. (2015). The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Aging Dis. *6*, 131–148.

Ruiz-Valdepeñas, L., Benito, C., Tolón, R. M., Martínez Orgado, J. A., and Romero, J. (2010). The endocannabinoid system and amyloid-related diseases. Exp. Neurol. *224*, 66–73.

Sakamoto, T., Cansev, M., and Wurtman, R. J. (2007). Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. Brain Res. *1182*, 50–59.

Samuelsson, B. (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. Science *220*, 568–575.

Sanchez-Mejia, R. O. *et al.* (2008). Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Nat. Neurosci. *11*, 1311–1318.

Sanchez-Mejia, R. O., and Mucke, L. (2010). Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta *1801*, 784–790.

Sarasa, M., and Pesini, P. (2009). Natural non-trasgenic animal models for research in Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. *6*, 171–178.

Sarkar, P., Narayanan, J., and Harder, D. R. (2011). Differential effect of amyloid β on the cytochrome P450 epoxygenase activity in rat brain. Neuroscience *194*, 241–249.

Saunders, N. R. (1977). Ontogeny of the blood-brain barrier. Exp. Eye Res. *25 Suppl*, 523–550.

Savonenko, A., Munoz, P., Melnikova, T., Wang, Q., Liang, X., Breyer, R. M., Montine, T. J., Kirkwood, A., and Andreasson, K. (2009). Impaired cognition, sensorimotor gating, and hippocampal long-term depression in mice lacking the prostaglandin E2 EP2 receptor. Exp. Neurol. *217*, 63–73.

Schaefer, E. J., Bongard, V., Beiser, A. S., Lamon-Fava, S., Robins, S. J., Au, R., Tucker, K. L., Kyle, D. J., Wilson, P. W. F., and Wolf, P. A. (2006). Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. Arch. Neurol. *63*, 1545–1550.

Schaffer, J. E. (2002). Fatty acid transport: the roads taken. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *282*, E239–E246.

Schaloske, R. H., and Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim. Biophys. Acta *1761*, 1246–1259.

Scheffler, K., Stenzel, J., Krohn, M., Lange, C., Hofrichter, J., Schumacher, T., Brüning, T., Plath, A.-S., Walker, L., and Pahnke, J. (2011). Determination of spatial and temporal distribution of microglia by 230nm-high-

resolution, high-throughput automated analysis reveals different amyloid plaque populations in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. *8*, 781–788.

Schenk, D. *et al.* (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature *400*, 173–177.

Schmid, P. C., Reddy, P. V., Natarajan, V., and Schmid, H. H. (1983). Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. J. Biol. Chem. *258*, 9302–9306.

Schmidt, J. T. (2004). Activity-driven sharpening of the retinotectal projection: the search for retrograde synaptic signaling pathways. J. Neurobiol. *59*, 114–133.

Schmidt, J. T., Mariconda, L., Morillo, F., and Apraku, E. (2014). A role for the polarity complex and PI3 kinase in branch formation within retinotectal arbors of zebrafish. Dev. Neurobiol. *74*, 591–601.

Schmitz, D., Breustedt, J., and Gundlfinger, A. (2014). Retrograde signaling causes excitement. Neuron *81*, 717–719.

Schroeter, A., Wen, S., Mölders, A., Erlenhardt, N., Stein, V., and Klöcker, N. (2015). Depletion of the AMPAR reserve pool impairs synaptic plasticity in a model of hepatic encephalopathy. Mol. Cell. Neurosci. *68*, 331–339.

Schwenk, R. W., Holloway, G. P., Luiken, J. J. F. P., Bonen, A., and Glatz, J. F. C. (2010). Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *82*, 149–154.

Sclip, A. *et al.* (2011). c-Jun N-terminal kinase regulates soluble Aβ oligomers and cognitive impairment in AD mouse model. J. Biol. Chem. *286*, 43871–43880.

Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol. Rev. *81*, 741–766.

Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science *298*, 789–791.

Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. Behav. Brain Res. *192*, 106–113.

Selkoe, D. J. (2011). Alzheimer's disease. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*.

Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., and Thal, L. J. (1993). Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. Nature *361*, 260–263.

Seyberth, H. W., Oelz, O., Kennedy, T., Sweetman, B. J., Danon, A., Frölich, J. C., Heimberg, M., and Oates, J. A. (1975). Increased arachidonate in lipids after administration to man: effects on prostaglandin biosynthesis. Clin. Pharmacol. Ther. *18*, 521–529.

Shankar, G. M. *et al.* (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. Nat. Med. *14*, 837–842.

Sharp, E. S., and Gatz, M. (2011). Relationship between education and dementia: an updated systematic review. Alzheimer Dis. Assoc. Disord. *25*, 289–304.

Shastri, A., Bonifati, D. M., and Kishore, U. (2013). Innate immunity and neuroinflammation. Mediators Inflamm. *2013*, 342931.

Shelat, P. B., Chalimoniuk, M., Wang, J.-H., Strosznajder, J. B., Lee, J. C., Sun, A. Y., Simonyi, A., and Sun, G. Y. (2008). Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. J. Neurochem. *106*, 45–55.

Sheng, M., and Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. Annu. Rev. Biochem. *76*, 823–847.

Shen, J., Tareste, D. C., Paumet, F., Rothman, J. E., and Melia, T. J. (2007a). Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. Cell *128*, 183–195.

Shen, Y., Kishimoto, K., Linden, D. J., and Sapirstein, A. (2007b). Cytosolic phospholipase A(2) alpha mediates electrophysiologic responses of hippocampal pyramidal neurons to neurotoxic NMDA treatment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 6078–6083.

Sherrington, R. *et al.* (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature *375*, 754–760.

Sherwood, C. C. *et al.* (2006). Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 13606–13611.

Shi, J. *et al.* (2012). Inflammatory prostaglandin E2 signaling in a mouse model of Alzheimer disease. Ann. Neurol. *72*, 788–798.

Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Eto, M., and Shimizu, T. (2013). Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases. J. Biochem. (Tokyo) *154*, 21–28.

Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Yuki, K., and Shimizu, T. (2009). Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. J. Lipid Res. *50 Suppl*, S46–S51.

Shindou, H., and Shimizu, T. (2009). Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. J. Biol. Chem. *284*, 1–5.

Shi, Y., and Cheng, D. (2009). Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *297*, E10–E18.

Shoemaker, J. L., Ruckle, M. B., Mayeux, P. R., and Prather, P. L. (2005). Agonist-directed trafficking of response by endocannabinoids acting at CB2 receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. *315*, 828–838.

Shoji, M., Iwakami, N., Takeuchi, S., Waragai, M., Suzuki, M., Kanazawa, I., Lippa, C. F., Ono, S., and Okazawa, H. (2000). JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. Brain Res. Mol. Brain Res. *85*, 221–233.

Shureiqi, I., Jiang, W., Zuo, X., Wu, Y., Stimmel, J. B., Leesnitzer, L. M., Morris, J. S., Fan, H.-Z., Fischer, S. M., and Lippman, S. M. (2003). The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 9968–9973.

Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Wegrzynowicz, M., Lee, E., Bowman, A. B., and Aschner, M. (2011). Role of astrocytes in brain function and disease. Toxicol. Pathol. *39*, 115–123.

de Silva, P. S. A., Luben, R., Shrestha, S. S., Khaw, K. T., and Hart, A. R. (2014). Dietary arachidonic and oleic acid intake in ulcerative colitis etiology: a prospective cohort study using 7-day food diaries. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. *26*, 11–18.

Silverman, W., Wisniewski, H. M., Bobinski, M., and Wegiel, J. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. Neurobiol. Aging *18*, 377–379; discussion 389–392.

Silvestri, C., and Di Marzo, V. (2013). The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. Cell Metab. *17*, 475–490.

Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.-P., and Rivest, S. (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. Neuron *49*, 489–502.

Simopoulos, A. P. (2011). Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. Mol. Neurobiol. *44*, 203–215.

Sinha, S. *et al.* (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature *402*, 537–540.

Sioen, I., Huybrechts, I., Verbeke, W., Camp, J. V., and De Henauw, S. (2007). n-6 and n-3 PUFA intakes of pre-school children in Flanders, Belgium. Br. J. Nutr. *98*, 819–825.

Slanina, K. A., and Schweitzer, P. (2005). Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. Neuropharmacology *49*, 653–659.

Sloan, H. L., Good, M., and Dunnett, S. B. (2006). Double dissociation between hippocampal and prefrontal lesions on an operant delayed matching task and a water maze reference memory task. Behav. Brain Res. *171*, 116–126.

Smith, M. E., Saraceno, G. E., Capani, F., and Castilla, R. (2013). Long-chain acyl-CoA synthetase 4 is regulated by phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *430*, 272–277.

Smith, W. L., DeWitt, D. L., and Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu. Rev. Biochem. *69*, 145–182.

Smith, W. L., Urade, Y., and Jakobsson, P.-J. (2011). Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. Chem. Rev. *111*, 5821–5865.

Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., and FitzGerald, G. A. (2009). Prostanoids in health and disease. J. Lipid Res. *50 Suppl*, S423–S428.

Snyder, E. M., Philpot, B. D., Huber, K. M., Dong, X., Fallon, J. R., and Bear, M. F. (2001). Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. Nat. Neurosci. *4*, 1079–1085.

Solas, M., Francis, P. T., Franco, R., and Ramirez, M. J. (2013). CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. Neurobiol. Aging *34*, 805–808.

Soldano, A., and Hassan, B. A. (2014). Beyond pathology: APP, brain development and Alzheimer's disease. Curr. Opin. Neurobiol. *27*, 61–67.

Soper, J. H., Sugiyama, S., Herbst-Robinson, K., James, M. J., Wang, X., Trojanowski, J. Q., Smith, A. B., Lee, V. M.-Y., Ballatore, C., and Brunden, K. R. (2012). Brain-penetrant tetrahydronaphthalene thromboxane A2-

prostanoid (TP) receptor antagonists as prototype therapeutics for Alzheimer's disease. ACS Chem. Neurosci. *3*, 928–940.

Sosa-Ortiz, A. L., Acosta-Castillo, I., and Prince, M. J. (2012). Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. Arch. Med. Res. *43*, 600–608.

Soupene, E., and Kuypers, F. A. (2008). Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. Exp. Biol. Med. Maywood NJ *233*, 507–521.

Sperling, R. A., Karlawish, J., and Johnson, K. A. (2013). Preclinical Alzheimer disease-the challenges ahead. Nat. Rev. Neurol. *9*, 54–58.

Spillantini, M. G., Goedert, M., Jakes, R., and Klug, A. (1990). Different configurational states of beta-amyloid and their distributions relative to plaques and tangles in Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 3947–3951.

Sprecher, H., Chen, Q., and Yin, F. Q. (1999). Regulation of the biosynthesis of 22:5n-6 and 22:6n-3: a complex intracellular process. Lipids *34 Suppl*, S153–S156.

Sridhar, G. R., Lakshmi, G., and Nagamani, G. (2015). Emerging links between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. World J. Diabetes *6*, 744–751.

Stables, M. J., and Gilroy, D. W. (2011). Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. Prog. Lipid Res. *50*, 35–51.

Stanley, A. C., and Lacy, P. (2010). Pathways for Cytokine Secretion. Physiology *25*, 218–229.

Stefanovic, B., Bosetti, F., and Silva, A. C. (2006). Modulatory role of cyclooxygenase-2 in cerebrovascular coupling. NeuroImage *32*, 23–32.

Steinman, L. (2013). Inflammatory cytokines at the summits of pathological signal cascades in brain diseases. Sci. Signal. *6*, pe3.

Stella, N., Schweitzer, P., and Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. Nature *388*, 773–778.

van der Stelt, M. *et al.* (2006). Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *63*, 1410–1424.

Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C. H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G., and Glass, C. K. (2000). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 4844–4849.

Streit, W. J., Mrak, R. E., and Griffin, W. S. T. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. J. Neuroinflammation *1*, 14.

Stremmel, W., Lotz, G., Strohmeyer, G., and Berk, P. D. (1985). Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. J. Clin. Invest. *75*, 1068–1076.

Stuchlik, A. (2014). Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. Front. Behav. Neurosci. *8*, 106.

Sturchler-Pierrat, C. *et al.* (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 13287–13292.

Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., and Gokoh, M. (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. Prog. Lipid Res. *45*, 405–446.

Su, L.-D., Wang, D.-J., Yang, D., Shen, Y., and Hu, Y.-H. (2013). Retrograde cPLA2α/arachidonic acid/2-AG signaling is essential for cerebellar depolarization-induced suppression of excitation and long-term potentiation. Cerebellum Lond. Engl. *12*, 297–299.

Sunderland, T., Tariot, P. N., Weingartner, H., Murphy, D. L., Newhouse, P. A., Mueller, E. A., and Cohen, R. M. (1986). Pharmacologic modelling of Alzheimer's disease. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *10*, 599–610.

Sun, G. Y., Shelat, P. B., Jensen, M. B., He, Y., Sun, A. Y., and Simonyi, A. (2010). Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. Neuromolecular Med. *12*, 133–148.

Swerdlow, R. H. (2007). Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? Neurobiol. Aging *28*, 1465–1480.

Swietochowska, K., Jaroszewicz, K., Komenda, W., and Januszko, T. (1983). Composition of phospholipids in various rat tissues. Acta Physiol. Hung. *62*, 145–149.

Sydenham, E., Dangour, A. D., and Lim, W.-S. (2012). Omega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia. Cochrane Database Syst. Rev. *6*, CD005379.

Szczepanik, A. M., Funes, S., Petko, W., and Ringheim, G. E. (2001). IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1--42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. J. Neuroimmunol. *113*, 49–62.

Szczepanik, A. M., and Ringheim, G. E. (2003). IL-10 and glucocorticoids inhibit Abeta(1-42)- and lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine induction in the central nervous system. J. Alzheimers Dis. JAD *5*, 105–117.

Tackenberg, C., Grinschgl, S., Trutzel, A., Santuccione, A. C., Frey, M. C., Konietzko, U., Grimm, J., Brandt, R., and Nitsch, R. M. (2013). NMDA receptor subunit composition determines beta-amyloid-induced neurodegeneration and synaptic loss. Cell Death Dis. *4*, e608.

Takadera, T., Shiraishi, Y., and Ohyashiki, T. (2004). Prostaglandin E2 induced caspase-dependent apoptosis possibly through activation of EP2 receptors in cultured hippocampal neurons. Neurochem. Int. *45*, 713–719.

Takeda, S., Sato, N., Ikimura, K., Nishino, H., Rakugi, H., and Morishita, R. (2013). Increased blood-brain barrier vulnerability to systemic inflammation in an Alzheimer disease mouse model. Neurobiol. Aging *34*, 2064–2070.

Takeuchi, K., and Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *296*, E1195–E1209.

Talantova, M. *et al.* (2013). Aβ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, E2518–E2527.

Tamburri, A., Dudilot, A., Licea, S., Bourgeois, C., and Boehm, J. (2013). NMDA-receptor activation but not ion flux is required for amyloid-beta induced synaptic depression. PloS One *8*, e65350.

Tang, B. L. (2009). Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors. Cell Adhes. Migr. *3*, 118–128.

Tang, S.-S., Hong, H., Chen, L., Mei, Z.-L., Ji, M.-J., Xiang, G.-Q., Li, N., and Ji, H. (2014). Involvement of cysteinyl leukotriene receptor 1 in Aβ1-42-induced neurotoxicity in vitro and in vivo. Neurobiol. Aging *35*, 590–599.

Tan, Z. S. *et al.* (2012). Red blood cell ω-3 fatty acid levels and markers of accelerated brain aging. Neurology *78*, 658–664.

Tateishi, N., Kaneda, Y., Kakutani, S., Kawashima, H., Shibata, H., and Morita, I. (2015). Dietary supplementation with arachidonic acid increases arachidonic acid content in paw, but does not affect arthritis severity or prostaglandin E2 content in rat adjuvant-induced arthritis model. Lipids Health Dis. *14*, 3.

Terwel, D., Muyllaert, D., Dewachter, I., Borghgraef, P., Croes, S., Devijver, H., and Van Leuven, F. (2008). Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. Am. J. Pathol. *172*, 786–798.

Thal, D. R. (2012). The role of astrocytes in amyloid β-protein toxicity and clearance. Exp. Neurol. *236*, 1–5.

Tian, C., Fan, C., Liu, X., Xu, F., and Qi, K. (2011). Brain histological changes in young mice submitted to diets with different ratios of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids during maternal pregnancy and lactation. Clin. Nutr. Edinb. Scotl. *30*, 659–667.

Titova, O. E. *et al.* (2013). Dietary intake of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids is linked to gray matter volume and cognitive function in elderly. Age Dordr. Neth. *35*, 1495–1505.

Titov, V. N., and Lisitsyn, D. M. (2006). Plasma content of cholesterol and glycerol alcohols depends on the number of fatty acid double bonds in lipoprotein lipid pool. Bull. Exp. Biol. Med. *142*, 577–580.

Tokuda, H., Kontani, M., Kawashima, H., Kiso, Y., Shibata, H., and Osumi, N. (2014). Differential effect of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on age-related decreases in hippocampal neurogenesis. Neurosci. Res. *88*, 58–66.

Toonen, R. F. G., and Verhage, M. (2003). Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. Trends Cell Biol. *13*, 177–186.

Toonen, R. F. G., and Verhage, M. (2007). Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control. Trends Neurosci. *30*, 564–572.

Toonen, R. F. G., de Vries, K. J., Zalm, R., Südhof, T. C., and Verhage, M. (2005). Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. J. Neurochem. *93*, 1393–1400.

Toonen, R. F., Kochubey, O., de Wit, H., Gulyas-Kovacs, A., Konijnenburg, B., Sørensen, J. B., Klingauf, J., and Verhage, M. (2006). Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. EMBO J. *25*, 3725–3737.

Trivedi, S. G., Newson, J., Rajakariar, R., Jacques, T. S., Hannon, R., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Colville-Nash, P., and Gilroy, D. W. (2006). Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of delayed type hypersensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 5179–5184.

Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., and Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. Prog. Neurobiol. *70*, 1–32.

Ubeda, N., Achón, M., and Varela-Moreiras, G. (2012). Omega 3 fatty acids in the elderly. Br. J. Nutr. *107 Suppl 2*, S137–S151.

Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., and Ohnishi, T. (2011). Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. BioFactors Oxf. Engl. *37*, 1–7.

Umhau, J. C. *et al.* (2009). Imaging incorporation of circulating docosahexaenoic acid into the human brain using positron emission tomography. J. Lipid Res. *50*, 1259–1268.

Um, J. W. *et al.* (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer aβ oligomer bound to cellular prion protein. Neuron *79*, 887–902.

Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000). Prostaglandin D synthase: structure and function. Vitam. Horm. *58*, 89–120.

Valerio, A., Boroni, F., Benarese, M., Sarnico, I., Ghisi, V., Bresciani, L. G., Ferrario, M., Borsani, G., Spano, P., and Pizzi, M. (2006). NF-kappaB pathway: a target for preventing beta-amyloid (Abeta)-induced neuronal damage and Abeta42 production. Eur. J. Neurosci. *23*, 1711–1720.

Vane, J. R., and Botting, R. M. (1995). Pharmacodynamic profile of prostacyclin. Am. J. Cardiol. *75*, 3A – 10A.

Vassar, R. *et al.* (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science *286*, 735–741.

Vaswani, K. K., and Ledeen, R. W. (1987). Long-chain acyl-coenzyme A synthetase in rat brain myelin. J. Neurosci. Res. *17*, 65–70.

Velasco, M. E., Smith, M. A., Siedlak, S. L., Nunomura, A., and Perry, G. (1998). Striation is the characteristic neuritic abnormality in Alzheimer disease. Brain Res. *813*, 329–333.

Venneti, S., Wiley, C. A., and Kofler, J. (2009). Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol. *4*, 227–243.

Vercambre, M.-N., Boutron-Ruault, M.-C., Ritchie, K., Clavel-Chapelon, F., and Berr, C. (2009). Long-term association of food and nutrient intakes with cognitive and functional decline: a 13-year follow-up study of elderly French women. Br. J. Nutr. *102*, 419–427.

Verkhratsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C.-Y., and Rodriguez, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease. Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother. *7*, 399–412.

Vitale, N., Caumont, A. S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V. A., Morris, A. J., Frohman, M. A., and Bader, M. F. (2001). Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. EMBO J. *20*, 2424–2434.

Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T. C., Neher, E., and Verhage, M. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. Neuron *31*, 581–591.

Volterra, A., Trotti, D., Cassutti, P., Tromba, C., Galimberti, R., Lecchi, P., and Racagni, G. (1992). A role for the arachidonic acid cascade in fast synaptic modulation: ion channels and transmitter uptake systems as target proteins. Adv. Exp. Med. Biol. *318*, 147–158.

Wainwright, P. E., Xing, H. C., Mutsaers, L., McCutcheon, D., and Kyle, D. (1997). Arachidonic acid offsets the effects on mouse brain and behavior of a diet with a low (n-6):(n-3) ratio and very high levels of docosahexaenoic acid. J. Nutr. *127*, 184–193.

Walch, L., de Montpreville, V., Brink, C., and Norel, X. (2001). Prostanoid EP(1)- and TP-receptors involved in the contraction of human pulmonary veins. Br. J. Pharmacol. *134*, 1671–1678.

Wang, H., Hitron, I. M., Iadecola, C., and Pickel, V. M. (2005). Synaptic and vascular associations of neurons containing cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase in rat somatosensory cortex. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *15*, 1250–1260.

Wang, J., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1999). The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. Exp. Neurol. *158*, 328–337.

Watkins, P. A., Hamilton, J. A., Leaf, A., Spector, A. A., Moore, S. A., Anderson, R. E., Moser, H. W., Noetzel, M. J., and Katz, R. (2001). Brain uptake and utilization of fatty acids: applications to peroxisomal biogenesis diseases. J. Mol. Neurosci. MN *16*, 87–92; discussion 151–157.

Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A., and Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. Front. Genet. *5*, 88.

Weimer, R. M., Richmond, J. E., Davis, W. S., Hadwiger, G., Nonet, M. L., and Jorgensen, E. M. (2003). Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. Nat. Neurosci. *6*, 1023–1030.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *72*, 1858–1862.

Wesson, D. W., Nixon, R. A., Levy, E., and Wilson, D. A. (2011). Mechanisms of neural and behavioral dysfunction in Alzheimer's disease. Mol. Neurobiol. *43*, 163–179.

White, B. (2009). Dietary fatty acids. Am. Fam. Physician *80*, 345–350.

Widagdo, J., Chai, Y. J., Ridder, M. C., Chau, Y. Q., Johnson, R. C., Sah, P., Huganir, R. L., and Anggono, V. (2015). Activity-Dependent Ubiquitination of GluA1 and GluA2 Regulates AMPA Receptor Intracellular Sorting and Degradation. Cell Rep.

Wielinga, P. Y., Harthoorn, L. F., Verschuren, L., Schoemaker, M. H., Jouni, Z. E., van Tol, E. A. F., Kleemann, R., and Kooistra, T. (2012). Arachidonic acid/docosahexaenoic acid-supplemented diet in early life reduces body weight gain, plasma lipids, and adiposity in later life in ApoE*3Leiden mice. Mol. Nutr. Food Res. *56*, 1081–1089.

Williams, J. H. (1996). Retrograde messengers and long-term potentiation: a progress report. J. Lipid Mediat. Cell Signal. *14*, 331–339.

Williams, J. H., Errington, M. L., Lynch, M. A., and Bliss, T. V. (1989). Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. Nature *341*, 739–742.

Williamson, T. G., Mok, S. S., Henry, A., Cappai, R., Lander, A. D., Nurcombe, V., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Small, D. H. (1996). Secreted glypican binds to the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease (APP) and inhibits APP-induced neurite outgrowth. J. Biol. Chem. *271*, 31215–31221.

Wilson, R. I., and Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. Science *296*, 678–682.

Wolfe, M. M., Lichtenstein, D. R., and Singh, G. (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. N. Engl. J. Med. *340*, 1888–1899.

Woodling, N. S., Wang, Q., Priyam, P. G., Larkin, P., Shi, J., Johansson, J. U., Zagol-Ikapitte, I., Boutaud, O., and Andreasson, K. I. (2014). Suppression of Alzheimer-associated inflammation by microglial prostaglandin-E2 EP4 receptor signaling. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 5882–5894.

Woodward, D. F., Jones, R. L., and Narumiya, S. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. Pharmacol. Rev. *63*, 471–538.

Wurtman, R. J. (2008). Synapse formation and cognitive brain development: effect of docosahexaenoic acid and other dietary constituents. Metabolism. *57 Suppl 2*, S6–S10.

Wurtman, R. J., Ulus, I. H., Cansev, M., Watkins, C. J., Wang, L., and Marzloff, G. (2006). Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. Brain Res. *1088*, 83–92.

Xia, M. Q., and Hyman, B. T. (1999). Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. J. Neurovirol. *5*, 32–41.

Xu, T., Yu, X., Perlik, A. J., Tobin, W. F., Zweig, J. A., Tennant, K., Jones, T., and Zuo, Y. (2009). Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. Nature *462*, 915–919.

Yagami, T. *et al.* (2004). Amyloid beta protein impairs motor function via thromboxane A2 in the rat striatum. Neurobiol. Dis. *16*, 481–489.

Yalcin, M., Cavun, S., Yilmaz, M. S., Cengiz, F., and Savci, V. (2005). Involvement of brain thromboxane A in hypotension induced by haemorrhage in rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *32*, 960–967.

Yamada, M. *et al.* (2005). Implanted cannula-mediated repetitive administration of Abeta25-35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory. Behav. Brain Res. *164*, 139–146.

Yamamoto, M., Kiyota, T., Horiba, M., Buescher, J. L., Walsh, S. M., Gendelman, H. E., and Ikezu, T. (2007). Interferon-γ and Tumor Necrosis Factor-α Regulate Amyloid-β Plaque Deposition and β-Secretase Expression in Swedish Mutant APP Transgenic Mice. Am. J. Pathol. *170*, 680–692.

Yamashita, A., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Ito, M., Oka, S., Tanikawa, T., Waku, K., and Sugiura, T. (2014). Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. Prog. Lipid Res. *53*, 18–81.

Yamashita, A., Sugiura, T., and Waku, K. (1997). Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. J. Biochem. (Tokyo) *122*, 1–16.

Yang, G., Pan, F., and Gan, W.-B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. Nature *462*, 920–924.

Yang, Z.-H., Miyahara, H., and Hatanaka, A. (2011). Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. Lipids Health Dis. *10*, 120.

Yan, H., Kong, Y., He, B., Huang, M., Li, J., Zheng, J., Liang, L., Bi, J., Zhao, S., and Shi, L. (2015). CYP2J2 rs890293 polymorphism is associated with susceptibility to Alzheimer's disease in the Chinese Han population. Neurosci. Lett. *593*, 56–60.

Yehuda, S. (2003). Omega-6/omega-3 ratio and brain-related functions. World Rev. Nutr. Diet. *92*, 37–56.

Yermakova, A. V., Rollins, J., Callahan, L. M., Rogers, J., and O'Banion, M. K. (1999). Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *58*, 1135–1146.

Yoon, Y. J., White, S. L., Ni, X., Gokin, A. P., and Martin-Caraballo, M. (2012). Downregulation of GluA2 AMPA receptor subunits reduces the dendritic arborization of developing spinal motoneurons. PloS One *7*, e49879.

Young, L. J., and Pfaff, D. W. (2014). Sex differences in neurological and psychiatric disorders. Front. Neuroendocrinol. *35*, 253–254.

Youssef, I., Florent-Béchard, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Bihain, B., Olivier, J.-L., Leininger-Muller, B., Kriem, B., Oster, T., and Pillot, T. (2008). N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. Neurobiol. Aging *29*, 1319–1333.

Yu, S., Levi, L., Casadesus, G., Kunos, G., and Noy, N. (2014). Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) regulates cognitive function both by decreasing anandamide levels and by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPARβ/δ) in the brain. J. Biol. Chem. *289*, 12748–12758.

Zarini, S., Hankin, J. A., Murphy, R. C., and Gijón, M. A. (2014). Lysophospholipid acyltransferases and eicosanoid biosynthesis in zebrafish myeloid cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *113-115*, 52–61.

Zetterberg, H., Andreasen, N., and Blennow, K. (2004). Increased cerebrospinal fluid levels of transforming growth factor-beta1 in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. *367*, 194–196.

Zhang, C., Li, A., Gao, S., Zhang, X., and Xiao, H. (2011). The TIP30 protein complex, arachidonic acid and coenzyme A are required for vesicle membrane fusion. PloS One *6*, e21233.

Zhang, F., and Jiang, L. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. Neuropsychiatr. Dis. Treat. *11*, 243–256.

Zhang, J., and Rivest, S. (2001). Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide. J. Neurochem. *76*, 855–864.

Zhao, D., Watson, J. B., and Xie, C.-W. (2004). Amyloid beta prevents activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor phosphorylation during hippocampal long-term potentiation. J. Neurophysiol. *92*, 2853–2858.

Zhao, J., Del Bigio, M. R., and Weiler, H. A. (2011). Maternal arachidonic acid supplementation improves neurodevelopment in young adult offspring from rat dams with and without diabetes. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *84*, 63–70.

Zhao, Z., Lu, R., Zhang, B., Shen, J., Yang, L., Xiao, S., Liu, J., and Suo, W. Z. (2012). Differentiation of HT22 neurons induces expression of NMDA receptor that mediates homocysteine cytotoxicity. Neurol. Res. *34*, 38–43.

Zhao, Z., and Zlokovic, B. V. (2014). Blood-brain barrier: a dual life of MFSD2A? Neuron *82*, 728–730.

Zheng, H., and Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. Mol. Neurodegener. *1*, 5.

Zhuang, J., Zhang, H., Zhou, R., Chen, L., Chen, J., and Shen, X. (2013). Regulation of prostaglandin F2α against β amyloid clearance and its inflammation induction through LXR/RXR heterodimer antagonism in microglia. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *106*, 45–52.

Zilly, F. E., Sørensen, J. B., Jahn, R., and Lang, T. (2006). Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. PLoS Biol. *4*, e330.

Zuo, X., Wu, Y., Morris, J. S., Stimmel, J. B., Leesnitzer, L. M., Fischer, S. M., Lippman, S. M., and Shureiqi, I. (2006). Oxidative metabolism of linoleic acid modulates PPAR-beta/delta suppression of PPAR-gamma activity. Oncogene *25*, 1225–1241.

(2011). In Vitro Neurotoxicology, Totowa, NJ: Humana Press.

Communications scientifiques

Articles scientifiques

2015 : Pinçon A, Thomas MH, Huguet M, Allouche A, Colin JC, Georges A, Derrien A, Lanhers MC, Malaplate-Armand C, Oster T, Corbier C, Pillot T, Olivier JL, Yen FT. Increased susceptibility of dyslipidemic $LSR^{+/-}$ mice to amyloid stress is associated with changes in cortical cholesterol levels. J. Alzheimers dis. 2015, 45 : 195-204.

2013 : Fabian J, Hanekamp W, Thomas MH, Olivier JL, Lehr M. Investigations on the metabolic stability of cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ inhibitors with 1-indolylpropan-2-one structure. Chem Biol Interact. 2013, 206 : 356-63.

Chapitres de livres

2014 : Thomas M, Pelleieux S, Allouche A, Colin J, Oster T, Malaplate-Armand C, Olivier JL. Control of intracellular levels of free arachidonic acid : a tool in therapeutic or preventive strategies against Alzheimer's disease? In Arachidonic Acid : Sources, Biosynthesis and Health Effects, ed J.M. O'Keefe, Nova Science Publishers.

Communications orales

2013 : Thomas MH, Pelleieux S, Yen FT, Olivier JL. Role of acyl CoA synthetases 4 and 6 in neurite growth. 16th Groupe d'Etude des Membranes / 10th Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique GEM/GERLI lipidomics meeting : From membranes to pathologies. 2013, 10-14 Novembre, Saint-Jean-Cap-Ferrat, France. Communication orale.

Communications par affiche

2015 : Thomas MH, Paris C, Yen FT, Olivier JL. Arachidonic acid-specific acyl-CoA synthetase 4 : a key enzyme for neuronal differentiation and distribution of phospholipid species? The 12th international conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases (AD/PD) : Mechanisms, clinical strategies, and promising treatments of neurodegenerative diseases, 2015, 18-22 mars, Nice, France. Communication par affiche.

2014 : Pinçon A, Allouche A, Derrien A, Lanhers MC, Thomas MH, Colin J, Malaplate-Armand C, Oster T, Olivier JL, Yen FT. Increased susceptibility of dyslipidemic $LSR^{+/-}$ mice to amyloid stress. Journées Thématiques de la Société des Neurosciences : Perturbations métaboliques dans les maladies neurologiques et mentales, 2014, 19-20 mai, Lille, France. Communication par affiche.

2014 : Thomas MH, Pelleieux S, Yen FT, Olivier JL. Rôle des Acyl-CoA synthétases 4 et 6 dans le développement neuronal. Séminaire de l'école doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E) 2014, Vandœuvre-lès-Nancy, France. Communication par affiche.

Résumé - Abstract

Mobilisation de l'acide arachidonique et sensibilité au peptide β-amyloïde

Résumé. La maladie d'Alzheimer (MA) est un problème majeur de santé publique. Elle se traduit par des atteintes de la mémoire reposant sur des dysfonctionnements synaptiques induits par les oligomères de peptide β-amyloïde (Aβ). Ceux-ci activent la phospholipase A_2 cytosolique ($cPLA_2$) qui libère l'acide arachidonique (ARA) des phospholipides (PL) membranaires neuronaux. L'acyl-CoA synthétase 4 (ACSL4) peut limiter cette libération en favorisant la réincorporation d'ARA dans les PL. Dans l'alimentation occidentale, il constitue une part croissante des apports lipidiques. Contrairement à l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'influence de l'ARA dans la MA a été peu étudiée. C'est pourquoi nous avons étudié la mobilisation de l'ARA et son effet sur la sensibilité au peptide Aβ. Nous avons montré dans un premier temps qu'un apport alimentaire en ARA affecte la mémoire à court terme et sensibilise les capacités d'apprentissage au peptide Aβ. Ces altérations sont associées à des diminutions d'expression des récepteurs AMPA et de l'ACSL4, une prolifération astrocytaire et une incorporation accrue en ARA dans les espèces de PL phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine (PE). D'autre part, la différenciation des cellules HT22 nous a permis de montrer que l'ACSL4 intervient dans l'incorporation de l'ARA et dans l'équilibre ARA/DHA, notamment dans les espèces PE. Cela indique qu'un excès en ARA dans l'alimentation peut constituer un facteur d'aggravation de la MA et que les enzymes assurant sa mobilisation, comme la $cPLA_2$ et l'ACSL4, peuvent moduler ce risque. La caractérisation de leurs niveaux d'expression pourrait permettre de définir des groupes d'individus à risque vis-à-vis de la MA.

Mots clés. Acide arachidonique, acyl-CoA synthétase 4, phospholipides, peptide β-amyloïde, maladie d'Alzheimer, alimentation

---

Mobilization of arachidonic acid and sensitivity to amyloid-β peptid

Abstract. Alzheimer's disease (AD) is a major public health problem. This disease is characterized by memory impairments which are caused by synaptic dysfunctions induced by the oligomers of amyloid-β peptide (Aβ). These activate the cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$) which releases arachidonic acid (ARA) from neuronal membrane phospholipids (PL) whereas acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4) potentially counteracts this release by favoring ARA reincorporation into PL. Western diets contain growing amount of ARA. Contrary to docosahexaenoic acid (DHA), a few studies were devoted to the influence of ARA in AD. This is why we decided to study the mobilization of ARA and its effects on the sensitivity to Aβ oligomers. First we showed that dietary ARA reduces short-term memory abilities and increases the deleterious effects of Aβ on learning abilities. These alterations of cognitive abilities are associated to reductions of expression levels of AMPA receptors and ACSL4, an astrocyte proliferation, and greater incorporation of ARA in PL species phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine. Secondly, we used differentiated HT22 to show that ACSL4 modulate ARA incorporation and ARA / DHA balance in the PE species. These results indicate that excessive dietary intake of ARA may be a worsening factor in AD and the enzymes regulating ARA mobilization, such as $cPLA_2$ and ACSL4, can modulate this risk. The characterization of their enzymatic activities could allow the identification of groups of individuals at AD risk.

Key words : arachidonic acid, acyl-CoA synthetase 4, phospholipids, amyloid-β-peptide, Alzheimer's disease, diet